

UNIVERSITÉ DE NANTES
UFR MEDECINE

ÉCOLE DOCTORALE BIOLOGIE SANTÉ

Année 2014

N° attribué par la bibliothèque

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

N° 27

Implication des lymphocytes T CD8⁺ à répertoire restreint dans la sclérose en plaques

THÈSE DE DOCTORAT

Discipline : Sciences de la vie et de la santé

Spécialité : Immunologie

Présentée et soutenue publiquement par

Marion SALOU

Le 21 octobre 2014, devant le jury ci-dessous

Président : Pr Patrick VERMERSCH, Lille
Rapporteurs : Pr Serge NATAF, Lyon
Pr Guy GOROCHOV, Paris
Examineurs : Dr Olivier LANTZ, Paris

Directeur de thèse : Pr David-Axel LAPLAUD, Nantes
Co-Directeur : Dr Arnaud NICOT, Nantes

REMERCIEMENTS

Après ces 4 années de thèse, voilà la partie que j'avais hâte d'écrire et qui signe la fin de ce travail, les remerciements !

Je remercie les professeurs Serge Nataf et Guy Gorochov d'avoir accepté d'être rapporteurs et d'évaluer ce travail. Merci aussi au Pr. Patrick Vermersch et au Dr. Olivier Lantz d'être examinateurs de cette thèse. Je remercie aussi les Dr. Klaus Dornmair et Didier Lefranc pour leur participation à mes comités de thèse et pour les nombreuses discussions qui en ont découlé.

Je remercie aussi le Dr. Ignacio Anegon pour son accueil dans l'unité.

Un merci tout particulier à David, mon directeur de thèse. Ca n'a pas toujours été facile (moi mauvais caractère ? Mais non...) mais merci pour ta patience et ta compréhension, ainsi que ta foi toujours intacte en la science et ton optimisme!

Je remercie aussi Arnaud, mon co-directeur, pour son aide et son œil critique.

Merci aussi Sophie, pour tes conseils et ta présence.

Un merci spécial à Jean-Paul, vous qui savez si bien faire partager votre passion de la recherche, votre curiosité de tout et vos conseils.

Et bien sûr, toute l'équipe "SEP" ! Les filles, et Bryan, on a commencé par être des collègues, puis des amis ! Alex, Laure, Annie, Athé, Bryan, Flora, Anne... que de souvenirs dans ces 5 années, au labo bien sûr, entre les touché coulé sur les plaques de PCR, les sessions danse ou théâtre pour les vidéos de thèse, les pauses café et les petits dèj, mais aussi les restos, les bars, les soirées, les déménagements... Un merci spécial à Alex, d'avoir été sacrément présente dans les moments les plus difficiles mais surtout les plus sympas, au travail comme en dehors. Merci Laure pour tes corrections et pour ces discussions sur l'avenir. Annie, pour ta

spontanéité et ton aide. Et puis Bryan, pour toute ton aide dans cette dernière année et surtout dans les derniers mois ! Ah et Ségo aussi, merci pour ton aide précieuse au début de cette thèse !

Nico D, merci d'avoir été à l'écoute, et toujours prêt à prendre du temps pour me donner ton avis, ton aide et tes conseils.

Merci aussi à toute l'équipe 4, pour les conseils, les papotages, les coups de main. On est tellement nombreux que je ne citerai pas tout le monde : Chloé (que de discussions sur la PCR, merci), Gwen, Apo, Daniel, Richard, Annaïck, Michelle, Françoise, Sophie, Jean...

L'équipe 10 ! Eh oui, cette équipe qui n'est pas sur l'organigramme mais sans qui on n'irait pas bien loin. Ma vie nantaise a été bien animée grâce à vous, et la vie au labo rendue plus facile dans les moments de doutes. J'espère n'oublier personne : Laetitia (ma mamie-jumelle-mouette-chanteuse), Laura (mon espagnole préférée, et Nico bien sûr, c'est tellement évident avec vous ! Faut qu'on se le fasse ce barbecue, très vite), Angélique (râlouse adorable et toujours présente), Antoine (et Giedré), Elo M (et Thomas, il est bon le pain aux US ?), Méla N, Gaëlle P, Elo P, Séverine B (merci pour la correction du titre !), Juju, Méla C, PJ, Vaness, Angèl, Joëlle (et Chris), Virginie, Cécilia, Jean-Paul, Faouzi, Julie, Sylvain, Nahzli, Macha, Sarah, Marion, Laetitia LTX et je suis sûre que j'en oublie.

Merci aussi à mon bureau, Nico P, Laetitia et Annie, Valentin, Rozenn... On travaille, mais qu'est-ce qu'on peut rire et refaire le monde aussi !

Un grand merci à tout l'U1064, c'est vraiment un plaisir de venir le matin et de savoir qu'il y aura toujours quelqu'un de disponible. Dédicaces particulières à Laurent (McGuyver-psy-biomoleux en or-volleyeur... et breton !), Cédric (psy bis-smatchator-biomoleux-réorganisateur de la recherche mondiale), Laurence (pro de la cytométrie, et tellement gentille), Reynald (t'en auras bavé avec moi et la PCR !), Véro, Fred, Gaëlle, Flora, Fabie, Franck, Michèle, Mathias... Merci à tous.

Ce n'est pas facile de se lancer devant une classe, mais c'est vraiment une expérience enrichissante, surtout avec des collègues très à l'écoute : Fabienne et Barbara, Janic, Agnès...

Merci à tous mes amis. Bien sûr on ne s'est pas toujours compris, "mais qu'est-ce qu'elle peut bien faire tous les jours ?", mais on a toujours réussi à se retrouver. Chouch, toujours là, pour tout, pour rien, Fabien, tu dois être un de ceux qui savent le mieux, Amandine, Mag, Guillaume, Mick, Toph, Benoît, Céline, Ludo, Vincent, Jim, Alex... J'espère qu'on arrivera à garder tout ça très longtemps encore. Sans oublier les amis de prépa ou de Lyon, Colette, Maëla, Cécilia, Lisa, Fred, Laura, Juliana, Mercedes... Et Gwen et Matth, toujours là !

Petite dédicace au club de volley du CHU, et surtout à la super trop forte équipe 3 !

Merci à ma famille, tous, à ma belle-famille, mention spéciale à Safy pour les tableaux croisés-dynamique, j'en ai converti plus d'un depuis !

Laure, tu me manques. Thib j'attends ton briefing pour l'oral ! Par contre je ne suis pas sûre que fin de thèse rime avec fin de "râlage" ! En tout cas je suis super fière de vous avoir comme frère et sœur.

Jérôme, tu es celui qui en a le plus bavé ces derniers mois, mais tu as toujours été là, toujours de bon conseil et d'une patience à toute épreuve (ben oui, il en faut de la patience pour m'aider à compter des cellules !). Merci pour ta prévenance, pour ces évidences, et tous les beaux projets qu'on a ensemble.

Papa et Maman, merci pour tout. Sans vous je n'aurais jamais fait tout ça (en fait je n'aurais même pas été là, mais passons). Maman, tu as d'ailleurs été ma première enseignante en biologie ! Vous avez toujours été là, pour me relever, pour m'encourager, pour me supporter (et pour me dire stop), pour me laisser choisir ma route mais sans jamais être bien loin. Merci.

PRODUCTION SCIENTIFIQUE

ARTICLES SCIENTIFIQUES

Salou M.[¶], Garcia A.[¶], Michel L.[¶], Gainche-Salmon A., Loussouarn D., Nicol B., Guillot F., Hulin P., Nedellec S., Baron D., Ramstein G., Soullillou JP., Brouard S., Nicot A., Degauque N.*, Laplaud DA*. Expanded CD8 T cell sharing between periphery and CNS in multiple sclerosis. *Soumis*

Salou M.[¶], Nicol B.[¶], Garcia A., Baron D., Michel L., Elong Ngono A., Hulin P., Nedellec S., Jacq-Foucher M., Le Frère F., Jousset N., Wiertlewski S., Soullillou JP., Brouard S., Nicot A., Degauque N.*, Laplaud DA*. Dysregulation of Mucosal Associated Invariant T cells in patients with multiple sclerosis. *Papier en préparation*

Michel L, Chesneau M, Manceau P, Genty A., Garcia A., **Salou M.**, Elong Ngono A., Pallier A., Jacq-Foucher M., Lefrère F., Wiertlewski S., Soullillou JP., Degauque N., Laplaud DA. Unaltered regulatory B cell frequency and function in patients with Multiple Sclerosis. *En révision*

Elong Ngono A., Lepetit M., Reindl M., Garcia A., Guillot F., Genty A., Chesneau M., **Salou M.**, Michel L., Lefrère F., Schanda K., Imbert-Marcille BM., Degauque N., Nicot A., Brouard S., Laplaud DA., Soullillou JP. Decreased frequency of circulating Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein B lymphocytes in Patients with Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis. *Soumis*

REVUES SCIENTIFIQUES

Salou, M., Elong Ngono, A., Garcia, A., Michel, L., and Laplaud, D.-A. (2013). [Adaptative immunity and pathophysiology of multiple sclerosis]. *Rev. Médecine Interne Fondée Par Société Natl. Française Médecine Interne* 34, 479–486.

Elong Ngono A., Pettré S., **Salou M.**, Bahbouhi B., Soullillou JP., Brouard S., Laplaud DA. Frequency of circulating autoreactive T cells committed to myelin determinants in relapsing-remitting multiple sclerosis patients. *Clin Immunol.* 2012 Aug;144(2):117-26.

PRESENTATIONS ORALES

Journées Nantaises de la Sclérose en Plaques, 2012 et 2014, Nantes, France
Journées scientifiques de l'Ecole Doctorale Biologie Santé, 2012, Angers, France
Congrès NAT (Nantes Actualités Transplantation, 2014, Nantes
Congrès scientifique de la fondation ARSEP, 2013, Paris, France
Congrès SFN, 2014, Paris, France

POSTERS

EwiMID, 2010, Barcelone, Espagne
CFNI, 2010, Paris, France
FOCIS, 2013, Boston, USA
ICI, 2013, Milan Italie
Ectrims, 2014, Boston, USA
Congrès SFN, 2014, Paris, France

SOMMAIRE

Abréviations	1
Introduction	2
I. La Sclérose En Plaques	3
A. Historique et définitions.....	3
B. Epidémiologie et étiologie de la SEP	3
1. Epidémiologie de la SEP	4
2. Facteurs environnementaux	4
3. Facteurs génétiques.....	5
C. La SEP, une maladie auto-immune.....	5
1. Les lymphocytes T, des acteurs majeurs de la maladie.	6
a. Les lymphocytes T CD4 ⁺ helper Th1 et Th17	6
b. Les lymphocytes T CD8 ⁺	9
2. Les lymphocytes B et les anticorps : des acteurs émergents.....	11
3. Les lymphocytes régulateurs	12
4. L'immunité innée dans la maladie	12
D. Des zones d'ombre persistent dans la compréhension de la SEP.....	12
1. Quels sont les auto-antigènes impliqués ?	13
2. Comment et pourquoi les LT auto-réactifs en périphérie s'activent-ils et deviennent-ils pathogènes ?	14
3. Comment les cellules immunitaires migrent-elles à travers la BHE ? Quelles sont les premières cellules qui migrent ?	14
II. Les lymphocytes T pathogéniques à repertoire polyclonal dans la SEP	16
A. Génération du repertoire polyclonal	16
1. Génération du TCR	16
2. Mécanismes de tolérance	17
a. La tolérance centrale.....	17
b. La tolérance périphérique	20
B. Activation des LT autoréactifs dans la SEP	24
1. La réactivité croisée ou le mimétisme moléculaire	25
a. Le mimétisme moléculaire et le déclenchement de l'EAE	26
b. Le mimétisme moléculaire chez les patients SEP	26

2.	Les LT portant deux TCR.....	27
3.	Les superantigènes.....	28
4.	Les phénomènes d' <i>epitope spreading</i> et d'activation <i>bystander</i>	28
5.	Défaut de régulation périphérique	29
a.	Implication des LTregs naturels.....	29
b.	Implication des LBregs.....	30
C.	Identification de LT pathogéniques et de leurs antigènes dans la SEP	30
1.	LT spécifiques d'antigènes prédéterminés	31
2.	L'étude du répertoire (pas d'antigène connu)	31
a.	Biais dans l'utilisation d'un V β	31
b.	Etude des longueurs de CDR3 dans la SEP	32
c.	Le séquençage à haut débit.....	34
3.	Identification des antigènes reconnus.....	35
III.	Les LT invariants et leur implication dans la SEP	37
A.	Les lymphocytes T innés.....	37
B.	Les cellules MAIT	37
1.	Définition et historique.....	37
2.	Phénotype et caractéristiques des cellules MAIT	38
a.	Le TCR et le co-récepteur des cellules MAIT	38
b.	Des cellules productrices d'IL-17 ?	39
c.	Des cellules effectrices mémoires	40
d.	Un homing vers les tissus	41
e.	Autres caractéristiques.....	41
3.	Développement.....	42
4.	L'activité antimicrobienne des cellules MAIT	45
a.	Activité antimicrobienne <i>in vitro</i>	45
b.	Activité antimicrobienne <i>in vivo</i>	49
5.	MR1	51
a.	Conservation.....	51
b.	Expression de MR1	51
c.	Chargement de MR1 et présentation à la surface	52
d.	Présentation	53
e.	Structure/reconnaissance stucturale	55
6.	Les cellules MAIT chez les volontaires sains	56

7. Les cellules MAIT dans les maladies non microbiennes	56
a. Implication dans les cancers et les infections virales	57
b. Implication dans l'auto-immunité	58
Objectifs	63
Résultats	64
I. Article 1 : Comparaison des répertoires T dans le sang, le LCR et le SNC de patients atteints de SEP – Article soumis	65
II. Article 2 : Dérégulation des cellules MAIT dans la SEP – Article en préparation	100
Discussion et perspectives	137
A. Etude du répertoire et caractérisation de LT autoréactifs dans la SEP	137
B. Implication des cellules MAIT et du microbiote intestinal dans la SEP	139
C. Implication des LT CD8 ⁺ producteurs d'IL-17 dans la SEP	141
D. La SEP, une maladie du SNC	144
E. Différentes hypothèses de développement de la maladie	144
Références.....	148
Annexe	184

ABRÉVIATIONS

Ag : Antigène	LTregs : LT régulateurs
AICD : Activation Induced Cell Death	MAG : <i>Myelin Associated Glycoprotein</i>
AIRE : <i>Auto-Immune REgulator</i>	MAIT : <i>Mucosal Associated Invariant T</i>
BHE : Barrière HématoEncéphalique	MBP : <i>Myelin Basic Protein</i>
CCR : <i>Chemokine Receptor</i>	MCAM : <i>Melanoma Cell Adhesion Molecule</i>
CDR3 : Complementary Determining Region 3	MOG : <i>Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein</i>
CMH-I/II : Complexe Majeur d'Histocompatibilité de classe I/II	mTEC : Cellules Epithéliales Thymiques médullaires
CPA : Cellule Présentatrice d'Antigène	nTregs : LT régulateurs naturels
cTEC : Cellules Epithéliales Thymiques Corticales	PBMC : <i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i>
CTLA-4 : <i>Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated Protein 4</i>	PD-1 : <i>Programmed cell Death 1</i>
DC : Cellule Dendritique	PLP : <i>ProteoLipid Protein</i>
DN : Double négative	PLZF : <i>Promyelocytic Leukaemia Zinc Finger protein</i>
DP : Double Positive	PSGL1 : <i>P-Selectin Glycoprotein Ligand-1</i>
E. coli : <i>Escherichia coli</i>	Pten : <i>Phosphatase and TENsin homolog</i>
EAE : Encéphalomyélite Autoimmune Expérimentale	RAG : <i>Recombination Activation Genes</i>
EBV : Virus Epstein Barr	Régions V/D/J/C : Régions Variable/de Diversité/de Jonction/Constante
FoxP3 : <i>Forkhead box P3</i>	RORYT : <i>Retinoic acid receptor-related Orphan Receptor Gamma T</i>
GZM : Granzyme	RSS : Séquences Signal de Recombinaison
HIV : Virus de l'Immunodéficience Humaine	SEP : Sclérose En Plaques
IFN : Interféron	SNC : Système Nerveux Central
IL : interleukine	SP : Simple Positif
iNKT : Invariant Natural Killer T	TEMRA : <i>Terminally Effector Memory 45RA⁺</i>
LAG3 : <i>Lymphocyte-Activation Gene 3</i>	TCR : Récepteur de Cellule T
LB : Lymphocyte B	TdT : Désoxynucléotidyl Transférase Terminale
LBregs : LB régulateurs	TGF : <i>Transforming Growth Factor</i>
LCR : Liquide CéphaloRachidien	TLR : Toll-Like Récepteurs
LLT1 : <i>Lectin-Like Transcript-1</i>	TMEV : <i>Theiler's Murine Encephalitogenic Virus</i>
LT : Lymphocyte T	TNF : <i>Tumor Necrosis Factor</i>
LTh/c : LT helper/cytotoxiques	

INTRODUCTION

I. LA SCLEROSE EN PLAQUES

Cette partie a été adaptée de la revue "Immunité adaptative et physiopathologie de la Sclérose en Plaques", écrite pour la Revue de Médecine interne et présentée en annexe.

A. HISTORIQUE ET DEFINITIONS

Bien que la Sclérose En Plaques (SEP) ait été décrite pour la première fois au 19^e siècle, la physiopathologie de cette maladie reste encore obscure. Il s'agit d'une maladie chronique inflammatoire démyélinisante du Système Nerveux Central (SNC) entraînant un handicap parfois sévère. En France, elle touche 1 personne sur 1000, et affecte principalement les femmes entre 20 et 40 ans avec un sex ratio de 2,6/1 (Fromont et al., 2010). Les symptômes sont très variables, et se traduisent généralement par des atteintes motrices, sensorielles, visuelles ou même cognitives (Compston and Coles, 2008). Il existe plusieurs formes évolutives de la SEP. Ainsi, 85% des patients présentent tout d'abord une forme rémittente, caractérisée par des poussées correspondant à l'apparition d'un handicap d'intensité et de durée variables, suivies de périodes de rémissions. Après en moyenne 15 années, cette forme rémittente évolue en une forme secondairement progressive, au cours de laquelle le handicap s'accumule progressivement et les poussées s'espacent. Pour environ 15% des patients, la maladie est primitivement progressive, avec un handicap présent dès le début de la maladie et qui s'accumule ensuite progressivement en l'absence de phénomènes inflammatoires surajoutés (Compston and Coles, 2008; Nylander and Hafler, 2012).

Sur le plan physiopathologique, la maladie se caractérise par l'apparition de plaques de démyélinisation au sein de la substance blanche, responsables d'une altération de la conduction nerveuse. Une dégénérescence axonale peut aussi survenir de manière secondaire. Ces plaques sont caractérisées par la présence d'un infiltrat de cellules immunitaires essentiellement composé de macrophages et dans une moindre mesure de lymphocytes T (LT) (Compston and Coles, 2008; Noseworthy et al., 2000; Sospedra and Martin, 2005).

B. EPIDEMIOLOGIE ET ETIOLOGIE DE LA SEP

L'étiologie de la SEP est mal comprise, mais la maladie est considérée comme multifactorielle, résultant de la conjonction de facteurs génétiques et environnementaux.

1. Épidémiologie de la SEP

La distribution de la SEP est très hétérogène dans le monde, et aussi au sein d'un même pays. Dans l'hémisphère nord, la prévalence¹ diminue selon un gradient nord-sud. En Afrique, Asie (excepté au Japon) et Amérique du Sud, la prévalence est faible (Kurtzke, 1975; Melcon et al., 2014). En France, la prévalence (estimée à 94.7/100 000 au 31 octobre 2004) est considérée comme moyenne à élevée, avec des valeurs de prévalence et d'incidence² plus élevées dans le Nord-Est (Fromont et al., 2010, 2012). Ces variations géographiques semblent être liées à des facteurs environnementaux et génétiques.

2. Facteurs environnementaux

Le rôle de l'environnement a été proposé suite à des études de migration des populations et à l'apparition d'épidémies de SEP dans certaines régions du monde (Cabre et al., 2005; Compston and Coles, 2008; Kurtzke and Hyllested, 1987). Les prévalence et incidence élevées de la SEP dans les pays développés par rapport aux pays sous-développés a conduit à la mise en place de l'hypothèse "hygiéniste" : dans les pays développés, le système immunitaire rencontre moins ou du moins plus tardivement des agents infectieux, et aurait donc une propension plus élevée à développer des maladies auto-immunes (Compston and Coles, 2008; Laplaud and Confavreux, 2006). Différents facteurs environnementaux ont été impliqués dans le développement de la SEP (Compston and Coles, 2008; Laplaud and Confavreux, 2006). L'association entre les agents infectieux, notamment le virus Epstein-Barr (EBV), et la SEP a fait l'objet de nombreuses études. Bien qu'un rôle clair de causalité n'ait pas été démontré entre l'infection à l'EBV et la maladie, la présence quasi-constante d'anticorps anti-EBV et les signes de réactivation du virus chez les patients SEP renforcent l'idée d'une implication du virus dans la pathologie. Différentes hypothèses reliant l'EBV et la composante immunitaire de la SEP ont été développées, impliquant les lymphocytes T et B (LB) (Libbey et al., 2014; Owens and Bennett, 2012; Pender, 2012; Salvetti et al., 2009). La carence en vitamine D, reliée à une faible exposition au soleil, semble aussi être associée à un risque augmenté de développer une SEP (Pierrot-Deseilligny and Souberbielle, 2010). Il existe ainsi une corrélation inverse entre le niveau sérique de vitamine D et l'activité clinique de la SEP (Soilu-Hänninen et al., 2008; Tremlett et al., 2008). L'obésité dans l'enfance et

¹ La prévalence est le nombre d'individus malades dans une population à un instant donné

² L'incidence correspond au nombre de nouveaux cas dans une population donnée, dans une période donnée

l'adolescence, et la consommation de tabac sont aussi des facteurs de risque (Hedström et al., 2012; Munger et al., 2013; O’Gorman and Broadley, 2014).

3. Facteurs génétiques

Une susceptibilité génétique a été démontrée suite à des études épidémiologiques familiales. Ainsi, le risque de développer la maladie lorsque le jumeau monozygote l'a déjà contractée est d'environ 30%, mais diminue à 7% pour des jumeaux dizygotes, et à moins de 5% pour des frères et sœurs (Compston and Coles, 2008; Oksenberg and Baranzini, 2010). De nombreuses études génétiques et d'associations pangénomiques ont permis de mettre en évidence plus d'une centaine de gènes de susceptibilité (Bahlo et al., 2010; Baranzini et al., 2009; International Multiple Sclerosis Genetics Consortium et al., 2007, 2011; Patsopoulos et al., 2011). La plupart des gènes sont associés à la réponse immunitaire, et la majorité des variants se trouve dans les zones régulatrices non codantes. L'interaction de différents variants à risque pourrait aussi avoir un impact sur le développement de la maladie (Sawcer et al., 2014). Parmi les variants associés à un risque accru de SEP, le variant HLA-DRB1*15:01 du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH-II) est le plus significatif, avec un Odds ratio³ de 3. Dans les gènes associés à la réponse immunitaire, on retrouve notamment les gènes codant les chaînes α des récepteurs à l'interleukine 7 (IL-7) et à l'IL-2, ainsi que le CD58 (LFA3) (International Multiple Sclerosis Genetics Consortium et al., 2007; De Jager et al., 2009; Sawcer et al., 2014). Enfin, certains variants du CMH-I semblent responsables d'un effet protecteur (Sawcer et al., 2014).

C. LA SEP, UNE MALADIE AUTO-IMMUNE

Sur un plan mécanistique, la SEP est considérée comme une maladie auto-immune, comme le montrent les modèles animaux d'Encéphalite Auto-immune Expérimentale (EAE). En effet, l'injection d'extraits de cerveaux de lapin chez le singe est suivie, dans le SNC de certains sujets, d'une infiltration de cellules immunitaires et d'une démyélinisation périvasculaire, ressemblant à ce qui est observé dans la maladie humaine (Rivers et al., 1933). L'EAE a ensuite été étudiée de façon systématique chez les rongeurs et d'autres animaux, et peut être induite activement, par injection d'épitopes de la myéline ou passivement, par injection de LT réactifs contre ces mêmes épitopes (Lassmann, 2007). Ces modèles animaux, bien

³ L'Odds ratio permet de quantifier avec quelle force un facteur A est associé à un facteur B, dans une population donnée.

qu'imparfaits, ont permis d'étendre la compréhension de la physiopathologie de la maladie. D'autres arguments forts étayant le rôle de l'auto-immunité dans le développement de la SEP proviennent des études neuropathologiques, génétiques et immunologiques, mais aussi de l'utilisation de molécules immunomodulatrices comme traitements de la maladie, et seront détaillés par la suite. Je me concentrerai ici sur l'implication des cellules immunitaires adaptatives dans la maladie.

1. Les lymphocytes T, des acteurs majeurs de la maladie.

L'implication des LT dans la SEP est depuis longtemps avérée. En effet, ces cellules sont présentes au sein des lésions de SEP avec une répartition oligoclonale évoquant une sélection dépendante d'un antigène (Ag) (Babbe et al., 2000; Junker et al., 2007; Montes et al., 2009). Un autre argument est la présence de LT réactifs contre des épitopes de la myéline dans le sang de patients. Néanmoins, cette autoréactivité périphérique est aussi décrite chez des témoins sains chez qui elle n'induit pas de pathologie particulière (Sospedra and Martin, 2005).

a. Les lymphocytes T CD4⁺ helper Th1 et Th17

La SEP est décrite comme médiée principalement par les LT CD4⁺, notamment grâce aux études sur l'EAE. De plus, certains variants du CMH-II ont été fortement associés à la maladie, en particulier HLADRB1*15:01, avec un Odds ratio de 3, ce qui conforte l'implication de ces cellules (International Multiple Sclerosis Genetics Consortium et al., 2011; Olerup and Hillert, 1991; Sawcer et al., 2014). Cela a par la suite été confirmé dans des modèles d'EAE, car des souris humanisées exprimant ce variant ainsi qu'un TCR (Récepteur de Cellule T) spécifique d'un épitope de la MBP⁴ (*Myelin Basic Protein*) développent spontanément une EAE (Ellmerich et al., 2004; Madsen et al., 1999).

Une sous-population particulière de LT CD4⁺, les Th1, a été la première impliquée dans la physiopathologie de la maladie. La figure 1 à la page suivante présente les caractéristiques de différenciation de ces cellules. Dans l'EAE, l'immunisation active par des épitopes de la myéline entraîne la mise en place d'une réponse Th1, comme en témoigne la présence de LT producteurs d'Interféron γ (IFN γ) et d'IL-2 dans les lésions (Goverman, 2009; Merrill et al., 1992). De plus, le transfert adoptif de LT CD4⁺ Th1 activés spécifiques de la myéline suffit à

⁴ Protéine représentant 30% des protéines de la myéline du SNC (Baumann and Pham-Dinh, 2001)

induire une EAE (Goverman, 2009; Ben-Nun et al., 1981) alors que les souris déficientes en facteur de transcription Tbet sont résistantes, tout comme celles ne générant pas de Th1 (Bettelli et al., 2004; Segal and Shevach, 1996). Chez l'homme, de l'IL-12 est retrouvé dans le liquide céphalorachidien (LCR) et dans le SNC de patients, et semble même corrélé à l'activité de la maladie (Drulović et al., 1997; Goverman, 2009; Lovett-Racke et al., 2011; Windhagen et al., 1995). De plus, l'administration d'IFN γ exacerbe la maladie (Fletcher et al., 2010; Panitch et al., 1987). Cette cytokine est probablement impliquée directement dans la pathologie en induisant l'apoptose des oligodendrocytes (Horiuchi et al., 2006; Vartanian et al., 1995).

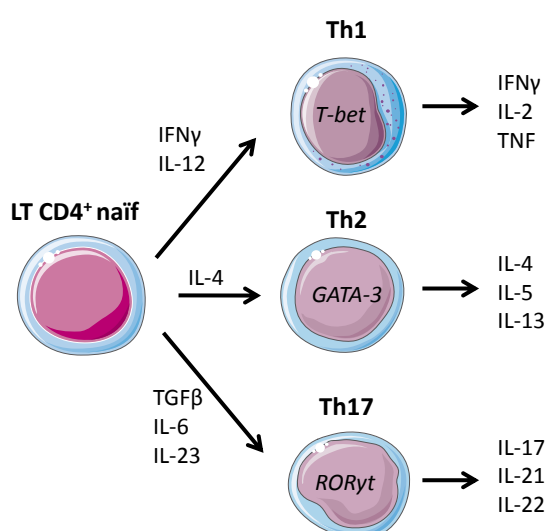


Figure 1 : Différenciation des LT CD4⁺ naïfs en LT Helper. Les LT CD4⁺ naïfs se différencient en différentes sous-populations "helper" sous l'action de cytokines et de facteurs de transcription particuliers. Ils sécrètent ensuite des cytokines effectrices propres à chaque sous-population. Dans la SEP, les LT CD4⁺ Th1 et Th17 sont les acteurs les plus décrits. Les facteurs de transcription sont en italique.

Dans les années 90, certaines observations ont suggéré que les LT Th1 n'étaient pas les seuls LT CD4⁺ impliqués dans la maladie. En effet, les souris déficientes en IFN γ , traitées avec un anticorps anti-IFN γ ou déficientes en sous-unité p35 de l'IL-12 n'étaient pas résistantes mais plutôt hyper-susceptibles à l'induction de l'EAE (Becher et al., 2002; Ferber et al., 1996; Lovett-Racke et al., 2011). Par contre, les souris déficientes en sous-unité p40, appartenant à la fois à l'IL-12 et à l'IL-23, étaient effectivement résistantes au développement de la maladie, de même que les souris déficientes en IL-23 ou traitées avec un anti-IL-23 (Cua et al., 2003). Ces données suggèrent l'implication d'une autre sous-population de LT, les Th17 (caractéristiques de différenciation en figure 1). Ainsi en 2005, une étude a montré que des LT Th17 spécifiques de la PLP⁵ (*ProteoLipid Protein*) induisaient l'EAE (Langrish et al., 2005). De plus, les Th17 sont présents dans le SNC d'EAE en phase aiguë (Hofstetter et al., 2007;

⁵ Avec son isoforme DM20, la PLP représente 50% des protéines de la myéline (Baumann and Pham-Dinh, 2001)

Jadidi-Niaragh and Mirshafiey, 2011). Chez l'homme, le nombre de cellules exprimant soit l'ARN messager de l'IL-17 soit la protéine est augmenté dans le sang et dans le LCR des patients, d'autant plus durant les phases actives de la maladie (Brucklacher-Waldert et al., 2009; Durelli et al., 2009; Matusevicius et al., 1999). Après stimulation *in vitro* des cellules sanguines, la fréquence des Th17 est aussi plus importante chez les patients que chez les témoins (Wang et al., 2011). Au niveau anatomopathologique, les LT producteurs d'IL-17 sont présents en grande quantité dans le cerveau des patients, et plus particulièrement dans les lésions actives ou en bordure des lésions chroniques actives (80% des LT produisent de IL-17, contre 20% dans les lésions inactives) (Tzartos et al., 2008). On retrouve aussi de l'IL-23 au niveau de ces lésions (Li et al., 2007). De plus, parmi les traitements utilisés couramment dans la SEP, le Fingolimod entraînerait une baisse des Th17 circulants et l'IFN β augmenterait leur apoptose (Durelli et al., 2009; Mehling et al., 2010). Cependant, des essais cliniques ciblant notamment les Th17 par l'utilisation d'un anticorps anti-sous-unité p40 de l'IL-12/23 n'ont pas donné de résultats probants (Segal et al., 2008; Vollmer et al., 2011). Des essais ciblant plus précisément la voie Th17 sont actuellement en cours dans la SEP.

A l'heure actuelle, il est encore difficile d'attribuer un rôle précis à chacune des sous-populations Th1 et Th17. On sait ainsi que les Th17 ne semblent pas nécessaires pour déclencher la maladie. En effet, une EAE modérée se développe chez des souris déficientes en IL-17 (Becher and Segal, 2011; Fletcher et al., 2010; Komiyama et al., 2006). De plus, le transfert de Th17 induit l'EAE seulement en présence de cellules productrices d'IFN γ (O'Connor et al., 2008). Malgré ces données contradictoires, il est tout de même généralement accepté que les Th17 jouent un rôle important dans la maladie. De plus, ces cellules ne sont pas définies par la sécrétion d'une seule cytokine, et parmi les cytokines produites par les Th17, le GM-CSF ou l'IL-23 notamment semblent avoir un rôle central (Becher and Segal, 2011; Jadidi-Niaragh and Mirshafiey, 2011; Petermann and Korn, 2011).

Il existe aussi des LT sécrétant à la fois de l'IL-17 et de l'IFN γ . Ces cellules représentent-elles une vraie sous-population ou une population transitoire entre les Th1 et les Th17 ? Les Th17 peuvent acquérir un phénotype mixte ou un phénotype Th1 en fonction du microenvironnement cytokinique et inflammatoire (Lee et al., 2009; Sie et al., 2014). Ainsi, des LT spécifiques de la myéline dérivés *in vitro* grâce à de l'IL-23 produisent à la fois de l'IL-17 et de l'IFN γ , et leur transfert induit une EAE dépendante seulement de l'IFN γ (Kroenke

and Segal, 2011). Dans un autre modèle, les Th17 sont les producteurs majoritaires d'IFN γ dans la moelle épinière de souris EAE suite à leur conversion via l'IL-23 (Hirota et al., 2011). Chez l'homme, des CD4 $^{+}$ issus de PBMC (*Peripheral Blood Mononuclear Cells*) de patients en phase active de la maladie se différencient plus en Th17 producteurs d'IFN γ sous l'action d'IL-23, et ces cellules ont une capacité plus élevée à traverser une barrière hématoencéphalique (BHE) *in vitro*. Enfin, dans le SNC de patients, la majorité des LT producteurs d'IL-17 produisent aussi de l'IFN γ , sans que l'on sache si ces LT sont des CD4 ou des CD8 (Kebir et al., 2009).

Les interactions entre LT Th1 et Th17, ainsi que leur implication respective dans la physiopathologie de la maladie reste encore peu claire et nécessite d'autres investigations. Néanmoins, un essai clinique avec un anticorps monoclonal anti-CD4, bien que déplétant les LT CD4 $^{+}$ circulants, n'a prouvé son efficacité ni en regard du score EDSS ni en regard de l'activité IRM, suggérant l'implication d'autres populations cellulaires dans le développement de la SEP (van Oosten et al., 1997).

b. Les lymphocytes T CD8 $^{+}$

Les LT CD8 $^{+}$, par leurs effets cytotoxiques, semblent mieux armés que les LT CD4 $^{+}$ pour induire directement des lésions au sein du SNC. De plus, les dernières études pangénomiques ont montré que le variant du CMH-I HLA-A*02:01 conférait un effet protecteur indépendant (Sawcer et al., 2014). Ces 10-15 dernières années, des modèles EAE par transfert de CD8 $^{+}$ spécifiques de la MBP ou de la MOG⁶ (*Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein*) ont été développés (Lassmann, 2007; Sun et al., 2001). La majorité des modèles CD8 $^{+}$ restent cependant des modèles de transfert de LT portant des TCR spécifiques d'épitopes exprimés de façon transgénique sur les oligodendrocytes (Lassmann, 2007). Chez l'homme, les LT CD8 $^{+}$ sont retrouvés au sein des lésions de SEP en plus grande proportion que les CD4 $^{+}$ (Babbe et al., 2000; Booss et al., 1983; Hauser et al., 1986), bien que cela soit encore controversé (Iferrgan et al., 2011). Ces LT CD8 $^{+}$ infiltrants ont une répartition oligoclonale, et les mêmes clones peuvent être retrouvés dans différents endroits du cerveau (Babbe et al., 2000; Junker et al., 2007; Montes et al., 2009). De plus, certains de ces clones portent des mutations silencieuses (Junker et al., 2007). Toutes ces données évoquent une sélection dépendante de l'Ag et suggèrent l'implication de ces clones CD8 $^{+}$

⁶ Protéine de la myéline (<1%) (Baumann and Pham-Dinh, 2001)

dans la maladie. La présence de LT CD8 exprimant le granzyme B (GZM-B) et l'IFN γ au sein des lésions va aussi dans ce sens (Annibali et al., 2011; Ifergan et al., 2011). Dans le SNC de patients atteints de SEP, les astrocytes, les oligodendrocytes, les neurones et les axones surexpriment le CMH-I en fonction de l'activité de la maladie et des lésions, ce qui en fait des cibles potentielles pour la lyse par les LT CD8⁺ (Höftberger et al., 2004). Cette lyse peut être médiée par différents mécanismes : sécrétion de granules cytotoxiques ou de cytokines comme le *tumor necrosis factor* (TNF) α , mécanismes dépendants de Fas (Denic et al., 2013; Neumann et al., 2002; Sauer et al., 2013). Il a été montré *in vitro* que la transection axonale pouvait être réalisée par les CD8⁺ cytotoxiques (Medana et al., 2001; Neumann et al., 2002; Sauer et al., 2013). Enfin, certains auteurs ont trouvé une corrélation entre le nombre de CD8⁺, mais pas celui de CD3⁺, présents dans les lésions et les atteintes axonales (Bitsch et al., 2000).

Des CD8⁺ oligoclonaux sont aussi retrouvés dans le LCR de patients SEP (Jacobsen et al., 2002). Au tout début de la maladie, le LCR est enrichi en cellules hautement différenciées (effectrices mémoires avec ou sans expression de CD45RA) qui sont CD8⁺ et non CD4⁺, suggérant là aussi un rôle dans le développement de la maladie (Jilek et al., 2007). De plus, les niveaux de GZM-B sont élevés dans le LCR de patients en poussée par rapport aux patients en rémission et aux contrôles, de même que le LCR de patients SEP est enrichi en cellules CD8⁺ productrices de GZM-B par rapport au sang (Ifergan et al., 2011; Malmeström et al., 2008). Enfin, il semble que l'activité cytotoxique des LT CD8⁺ contre la MBP soit augmentée chez les patients SEP (Zang et al., 2004). Ces données impliquent les LT CD8⁺ dans la physiopathologie de la SEP (Denic et al., 2013; Saxena et al., 2011).

De la même façon que pour les CD4⁺, des CD8⁺ produisant de l'IL-17 ont été décrites. Les cellules produisant de l'IL-17 au sein du SNC sont autant CD4⁺ que CD8⁺, et sont présentes majoritairement dans les lésions actives (80% des LT) (Tzartos et al., 2008). Après stimulation *in vitro* d'échantillons sanguins, il a été montré que le sang des patients contenait plus de LT CD8⁺ IL-17⁺ que le sang de témoins (Wang et al., 2011). Une équipe a par ailleurs observé un enrichissement en LT CD8⁺CD161^{hi} dans le sang de patients atteints de SEP, cette population regroupant toutes les cellules productrices d'IL-17 (Annibali et al., 2011; Maggi et al., 2010). De plus, ces cellules expriment CCR6 (*Chemokine Receptor 6*), qui est impliqué dans le passage de la BHE par les Th17 (Annibali et al., 2011; Reboldi et al., 2009). Des cellules

CD8⁺CD161⁺ ont ainsi été retrouvées dans des lésions du SNC de patients SEP, et la majorité de ces cellules semble exprimer l'IFN γ (Annibali et al., 2011). Des données récentes ont montré que 80% de ces cellules CD8⁺ CD161^{hi} étaient en fait des cellules MAIT (*Mucosal Associated Invariant T*), LT particuliers portant un TCR semi-invariant et décrits en détail plus tard dans ce manuscrit.

2. Les lymphocytes B et les anticorps : des acteurs émergents

Bien que longtemps sous estimé, le rôle des LB et des anticorps dans la physiopathologie de la SEP est de plus en plus reconnu. L'un des premiers arguments est la présence de bandes oligoclonales d'immunoglobulines dans le LCR de plus de 95% des patients (von Büdingen et al., 2011; Lassmann et al., 2001; Lucchinetti et al., 2000). De plus, les LB et les anticorps sont présents dans les lésions actives et aux marges des lésions chroniques actives, mais très peu dans les inactives (Meier et al., 2012). Certains auteurs ont aussi montré la présence de follicules ectopiques B dans les méninges de 41% des patients atteints de SEP de forme secondairement progressive (Magliozzi et al., 2007). La présence de ces follicules semble être corrélée avec des dommages tissulaires sévères du SNC (Disanto et al., 2012; Magliozzi et al., 2007). Ces follicules semblent être, tout comme les lésions actives, des sites de réactivation du virus de l'EBV, renforçant donc leur implication dans la physiopathologie de la maladie (Serafini et al., 2007). Ces résultats n'ont cependant pas été répliqués, sauf dans une étude récente qui a retrouvé des marqueurs d'EBV latent dans les lésions actives de SEP (Tzartos et al., 2012). De plus, certains clones de LB sont retrouvés à la fois dans le SNC, le LCR et les follicules, suggérant leur importance dans la maladie (Lovato et al., 2011). Enfin, le traitement par rituximab, un anticorps monoclonal anti-CD20 qui déplete les LB, permet de réduire les lésions inflammatoires visibles à l'IRM ainsi que les poussées chez les patients rémittents (von Büdingen et al., 2011; Hauser et al., 2008). Il faut aussi noter que bien que le transfert d'anticorps reconnaissant des épitopes de la myéline n'induit pas l'EAE, il pourrait aggraver la démyélinisation, suggérant ainsi que les lésions observées ne peuvent être dues au seul potentiel pathogénique de ces anticorps (Zhou et al., 2006).

En dehors de la production d'anticorps via leur différenciation en plasmocytes, les LB remplissent en effet d'autres fonctions certainement impliquées dans la physiopathologie de la SEP. Ils peuvent par exemple présenter des Ags aux LT. Ainsi, une étude a montré que les LB mémoires de patients pouvaient induire une prolifération et une production d'IFN γ par

les LT CD4⁺ en réponse à une stimulation par des Ags de la myéline (Harp et al., 2010). D'autres études chez la souris soulignent aussi l'importance de cette fonction (Molnarfi et al., 2013). De plus, ils peuvent produire cytokines et chémokines, modulant ainsi la réponse et le recrutement des LT (von Büdingen et al., 2011; Duddy et al., 2004; Pierson et al., 2014). L'effet thérapeutique du rituximab joue certainement sur ces fonctions des LB, car les taux d'anticorps sont inchangés sous ce traitement (Hauser et al., 2008).

3. Les lymphocytes régulateurs

La présence de LT autoréactifs chez les témoins sains suggère l'existence de mécanismes contrôlant leur possible action délétère. Ainsi, l'action de cellules suppressives, telles que les LT ou LB régulateurs (LTregs ou LBregs), peut être centrale dans le développement ou non de la maladie. Ces mécanismes ainsi que leur implication dans la SEP seront décrits dans le chapitre suivant (paragraphe II.B.5).

4. L'immunité innée dans la maladie

Les cellules de l'immunité innée, telles que les cellules dendritiques (DC), les *natural killer*, les macrophages, les LT *natural killer* (NKT) et les LT $\gamma\delta$, semblent impliquées dans le développement et la progression de la maladie (Mayo et al., 2012). Les macrophages représentent d'ailleurs la majorité des cellules infiltrant les lésions de SEP (Lucchinetti et al., 2000). A ces cellules s'ajoutent aussi la microglie et les astrocytes, cellules résidentes du SNC. Ces cellules de l'immunité innée agissent principalement sur l'immunité adaptative, mais aussi sur les neurones et les oligodendrocytes, et ont des effets bénéfiques et/ou délétères sur la maladie. Elles ont d'une part un rôle pro-inflammatoire, entraînant la différenciation des LT vers un phénotype effecteur Th1 et Th17 et menant ainsi à la démyélinisation et à la destruction des neurones et des oligodendrocytes. D'autre part, elles ont aussi un rôle anti-inflammatoire ou régulateur, et contrôlent l'inflammation, en orientant la différenciation des LT vers un phénotype régulateur notamment. Différents facteurs leur permettent aussi de promouvoir la remyélinisation (Mayo et al., 2012). Leur fort potentiel immunomodulateur en fait d'ailleurs des cibles thérapeutiques clés.

D. DES ZONES D'OMBRE PERSISTENT DANS LA COMPREHENSION DE LA SEP

Bien que la littérature soit abondante concernant l'implication de l'immunité dans la SEP, de nombreuses zones d'ombres persistent. La figure 2 reprend les grandes lignes de la

physiopathologie de la maladie et souligne les questions encore en suspens. Répondre à ces questions permettra de grandes avancées dans la compréhension de la maladie.

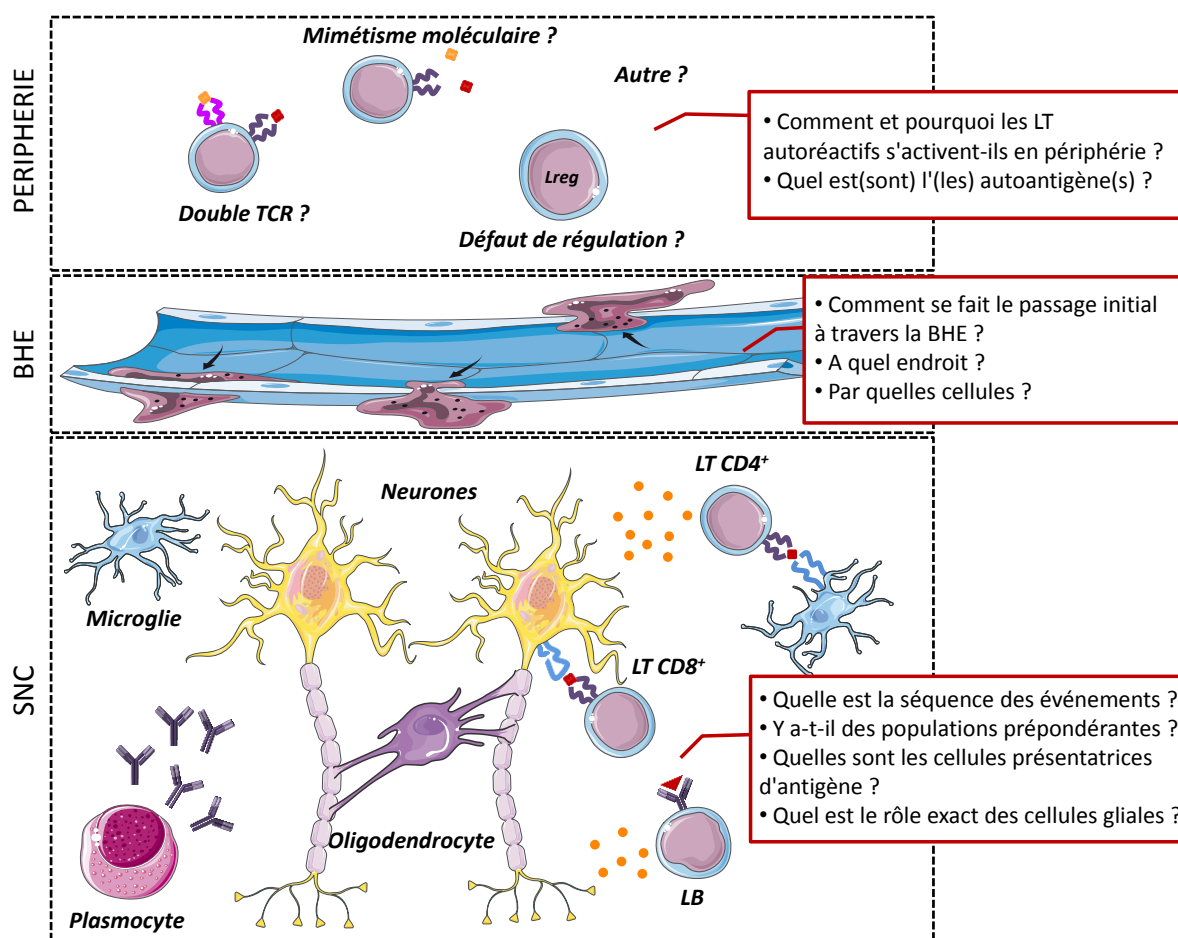


Figure 2 : Physiopathologie de la maladie et questions en suspens. Au sein du système nerveux central, les acteurs de l'immunité entraînent une démyélinisation ainsi qu'une dégénérescence axonale lorsque la maladie se chronicise. Bien que les mécanismes ne soient pas encore complètement décrits, les études mettent en jeu différentes sous-populations cellulaires telles que les LT, les LB et la microglie. Ces cellules exerceraient leur pouvoir pathogénique via la production de cytokines ou de molécules cytotoxiques. Elles créent ainsi un environnement inflammatoire entretenant la réponse immunitaire et la démyélinisation au sein du SNC. Le SNC étant un endroit immunoprivilégié, la question de savoir comment et pourquoi les premières cellules traversent la barrière hémato-encéphalique est cruciale pour la compréhension de la maladie. De même, la question de l'activation périphérique de cellules potentiellement autoréactives reste actuellement en suspens.

1. Quels sont les auto-antigènes impliqués ?

De nombreux Ags candidats reconnus par les LT autoréactifs ont été proposés. Ce sont principalement des épitopes de protéines de la myéline, mais aussi d'autres Ags non-myéliniques, comme l' α - β cristalline ou une transaldolase exprimée notamment par les oligodendrocytes (Nylander and Hafler, 2012; Sospedra and Martin, 2005). Les auteurs semblent s'accorder sur le fait qu'il n'y aurait pas un seul mais plusieurs Ags impliqués dans la maladie, qui pourraient varier d'un individu à l'autre et au cours du temps. Même si le

déclenchement initial se fait grâce à un épitope particulier, les phénomènes de glissement d'épitope⁷ et d'activation *bystander*⁸ peuvent expliquer que l'on retrouve des LT autoréactifs contre plusieurs protéines différentes (Laplaud and Confavreux, 2006; Nylander and Hafler, 2012). Ces points seront abordés dans le chapitre suivant.

La spécificité des anticorps retrouvés dans les lésions et le LCR de patients atteints de SEP reste elle aussi incertaine (von Büdingen et al., 2011; Disanto et al., 2012). Certains anticorps ont été décrits comme reconnaissant des protéines de la myéline, d'autres des protéines astrocytaires ou neuronales (von Büdingen et al., 2011). Récemment, une étude a montré que KIR4.1, un canal potassique exprimé sur les cellules gliales, était la cible d'autoanticorps sériques trouvés chez presque la moitié des patients étudiés (Srivastava et al., 2012). Ces données n'ont pas été confirmées, avec seulement 7,5% ou 1% des patients SEP qui présentent ces anticorps dans d'autres études, ce qui n'est pas statistiquement différent chez les témoins (Brickshawana et al., 2014; Nerrant et al., 2014).

2. Comment et pourquoi les LT auto-réactifs en périphérie s'activent-ils et deviennent-ils pathogènes ?

Cette question sera abordée en détails dans le chapitre suivant (paragraphe II.B).

3. Comment les cellules immunitaires migrent-elles à travers la BHE ? Quelles sont les premières cellules qui migrent ?

La question de la migration des cellules à travers la BHE est cruciale dans la compréhension de la maladie. En effet, le SNC est un site immuno-privilegié, et bien qu'au cours de la maladie la barrière soit inflammée et plus perméable, ce n'est pas le cas au tout début. Il est donc important de comprendre les mécanismes initiaux de migration à travers la BHE. Les lymphocytes doivent être activés pour pouvoir traverser la BHE. Il a été proposé que les Th1 ont d'abord accès au SNC non-inflammatoire et induisent le recrutement des Th17, mais cela ne fait pas consensus (Fletcher et al., 2010; Goverman, 2009; O'Connor et al., 2008). Dans un modèle de BHE *in vitro*, il a été montré que les Th17 humaines migraient mieux que les Th1 (Kebir et al., 2007). De plus, la BHE semble plus perméable à la migration de LT CD4⁺ en réponse à IL-17 et à l'IL-22, notamment par une déstabilisation des jonctions serrées entre

⁷ Reconnaissance d'autres Ags de la même protéine ou d'une protéine différente suite à un relargage anormal dans un contexte d'inflammation

⁸ Activation non spécifique dans un contexte d'inflammation

les cellules endothéliales (Becher and Segal, 2011; Kebir et al., 2007; Lovett-Racke et al., 2011). De plus, les souris déficientes en CCR6, marqueur de homing des Th17, sont résistantes à l'EAE, et la susceptibilité est restaurée par le transfert adoptif de cellules non déficientes (Fletcher et al., 2010; Reboldi et al., 2009). L'IL-17 entraîne aussi une augmentation de l'expression de CCL20, ligand de CCR6, sur les astrocytes, permettant ainsi le passage des Th17 CCR6⁺ à travers la BHE (Petermann and Korn, 2011). Enfin, les Th17 permettent le recrutement de neutrophiles qui sécrètent des molécules impliquées dans la perméabilisation de la BHE (Petermann and Korn, 2011).

La SEP est donc une maladie complexe, résultant de différents facteurs et dans laquelle les LT semblent jouer un rôle central, que ce soit pour l'initiation de la maladie, mais aussi pour son développement ainsi que le maintien de l'inflammation.

II. LES LYMPHOCYTES T PATHOGENIQUES A REPERTOIRE POLYCLONAL DANS LA SEP

L'implication des LT n'est plus à démontrer dans la SEP. Ces LT peuvent être polyclonaux, présentant un répertoire⁹ étendu, ou invariants, avec un répertoire limité. Ces derniers seront traités dans la partie suivante. Au sein des LT polyclonaux se trouvent des LT autoréactifs ou autoaggressifs, dont l'activation est délétère. Comment ces LT sont-ils générés ? Comment sont-ils activés dans la SEP ? Comment peut-on les repérer ? Ces points seront abordés dans ce chapitre.

A. GENERATION DU REPERTOIRE POLYCLONAL

1. Génération du TCR (Figure 3)

Les LT sont caractérisés par un TCR constitué de deux chaînes, α et β . Les gènes codants ces chaînes sont formés par recombinaison somatique de segments d'ADN : régions V (variabilité), D (diversité) et J (jonction) et C (constante).

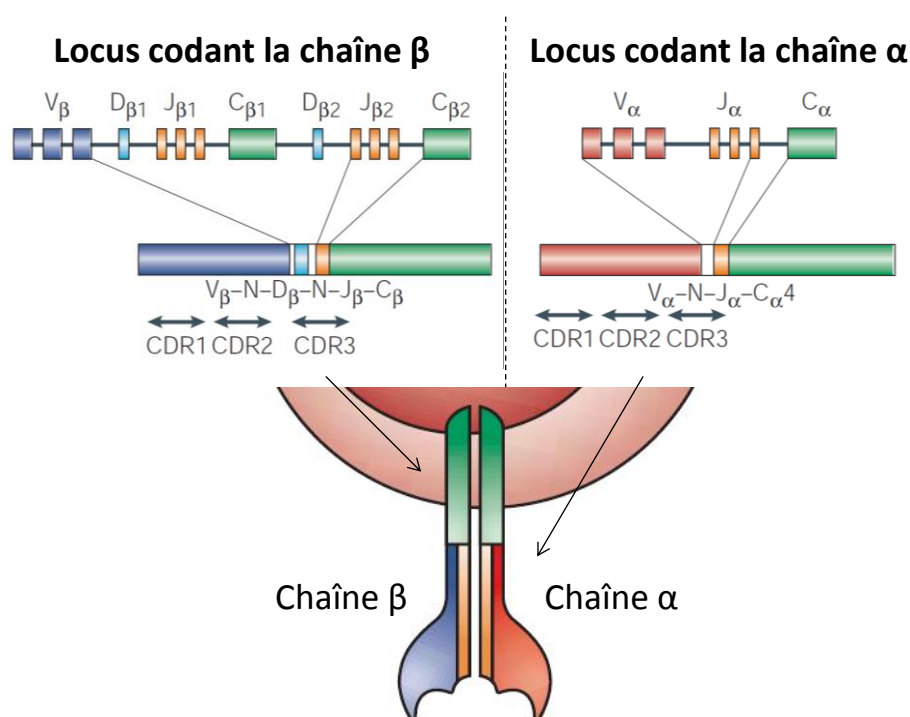


Figure 3 : Organisation des loci codant les chaînes du TCR et structure du TCR. Le TCR est constitué d'une chaîne α et d'une chaîne β , réarrangées au niveau génomique. Chaque chaîne est constituée d'une région constante (vert) et d'une région variable (bleu/orange et rouge/orange). D'après Nikolich-Zugich et al., 2004.

⁹ Le répertoire T est l'ensemble des TCR portés par un individu

Le réarrangement aléatoire de ces différents segments mène à la génération d'une chaîne α (VJ) et d'une chaîne β (VDJ) au cours du développement thymique. Chez l'homme, il existe 54 gènes $V\alpha$, 61 $J\alpha$ et 1 $C\alpha$ ainsi que 64-67 $V\beta$, 2 $D\beta$, 14 $J\beta$ et 2 $C\beta$ (Lefranc et al., 2009). La recombinaison s'effectue par les enzymes de recombinaison RAG-1 et RAG-2 (*Recombination Activation Genes*) grâce aux séquences signal de recombinaison (RSS). Lors de ce processus, des nucléotides peuvent être ajoutés - additions P générant des séquences palindromiques et additions N catalysées par une désoxynucléotidyl transférase terminale (TdT) - et délétés (Kuby et al., 2008; Kuklina, 2006). La région hypervariable CDR3 (*Complementary Determining Region 3*) ainsi créée est cruciale dans la reconnaissance de l'Ag. Ces mécanismes sont décrits en détails dans différentes revues et livres d'immunologie, c'est pourquoi je ne m'étendrai pas dessus. Cette variabilité de génération des chaînes, associée à la variabilité d'appariement entre les chaînes α et β produit théoriquement plus de 10^{15} LT différents (Davis and Bjorkman, 1988; Sewell, 2012). Ces LT peuvent reconnaître la grande majorité d'Ag étrangers présentés.

2. Mécanismes de tolérance

Toutes les recombinaisons possibles ne mènent cependant pas à la génération d'un LT fonctionnel. En effet, il faut que ces TCR soient capables de reconnaître un Ag présenté dans le contexte du CMH. De plus, la génération aléatoire des TCR implique une reconnaissance potentielle à la fois d'Ags étrangers et du soi. Dans le thymus, des mécanismes permettent la génération d'un répertoire T capable de reconnaître une quantité potentiellement infinie d'Ags étrangers, sans pour autant (théoriquement) reconnaître d'Ag du soi.

a. La tolérance centrale

Les précurseurs de LT $CD3^+$, générés dans la moelle osseuse, migrent dans le cortex thymique par la jonction cortico-médullaire. Ces précurseurs prolifèrent et subissent des changements phénotypiques (notamment pour les molécules CD44 et CD25) sans pour autant exprimer le CD4 ou le CD8 (cellules doubles négatives, DN). Le réarrangement de la chaîne β du TCR, puis de la chaîne α , commence lors de ces changements (figure 4).

La sélection positive (Griesemer et al., 2010; Kuby et al., 2008; Moran and Hogquist, 2012; Starr et al., 2003) (Figure 4) : Suite au réarrangement du TCR, le thymocyte exprimant à la fois le CD4 et le CD8 (double positif, DP), est programmé pour entrer en apoptose dans les

trois-quatre jours. En cas d'interaction faible ou moyenne du TCR avec un CMH du soi exprimé par les cellules épithéliales thymiques corticales (cTEC), le signal d'apoptose est contrebalancé par l'expression du facteur anti-apoptotique Bcl-X_L notamment. Pendant cette période, la chaîne α est réarrangée successivement, ce qui permet d'augmenter la probabilité de générer un TCR reconnaissant un CMH du soi (Petrie et al., 1993). Seuls 5 à 20% des LT reconnaissent un CMH et échappent à la mort "par négligence" (Yates, 2014). L'expression de différents allèles du CMH limite ainsi le répertoire exprimé par un individu donné, ce qui explique au moins en partie l'implication de certains allèles dans les maladies auto-immunes (Tsai and Santamaria, 2013). Lors de cette reconnaissance, la cascade de signalisation entraîne une maturation des thymocytes DP vers un stade simple positif (SP) c'est-à-dire exprimant le CD4 ou le CD8 en fonction du CMH reconnu (Singer et al., 2008; Teh et al., 1988). En parallèle, différentes chémokines vont permettre la migration des LT vers la médulla thymique, comme CCL19 et CCL21, ligands de CCR7 qui est exprimé par les thymocytes SP (Takahama, 2006; Ueno et al., 2004).

La sélection négative (Griesemer et al., 2010; Kuby et al., 2008; Moran and Hogquist, 2012; Starr et al., 2003) (figure 4) : Les thymocytes qui migrent dans la médulla présentent donc un fort taux d'auto-réactivité, car sélectionnés sur la reconnaissance d'un CMH du soi. La sélection négative consiste en la délétion des thymocytes SP ayant une haute affinité pour le complexe CMH-peptide du soi. Pour cela, des centaines voire des milliers de peptides du soi, y compris des peptides spécifiques de tissus autres que le thymus, comme la MOG par exemple, sont exprimés par les cellules épithéliales thymiques médullaires (mTEC) (Klein et al., 2009). Ces peptides sont présentés par les mTEC elles-mêmes, mais surtout par les DC, qui peuvent acquérir les Ags grâce aux mTEC (Derbinski et al., 2001; Gotter et al., 2004; Koble and Kyewski, 2009). Le gène de régulation de l'auto-immunité, *AIRE* (*Auto-Immune REgulator*), est essentiel dans l'expression de ces Ags. En effet, les souris et les hommes déficients pour ce gène présentent de graves désordres auto-immunitaires systémiques (Anderson et al., 2002; Finnish-German APECED Consortium, 1997; Nagamine et al., 1997). Bien que la fonction du facteur de transcription AIRE ne soit pas totalement décrite, il semble qu'il agisse ainsi comme un inhibiteur ou un amplificateur d'expression génique (Akirav et al., 2011). Ainsi, la MOG et la PLP (isoforme DM20) sont exprimées dans le thymus, mais l'expression de la MBP est plus controversée (Goverman, 2011; Szczepanik, 2011).

L'interaction forte du TCR avec le complexe CMH-peptide entraîne l'apoptose des LT naïfs de manière dépendante de Fas, récepteur appartenant à la famille des TNF. Les molécules de co-stimulation telles que CD28, CTLA-4 et PD-1 jouent aussi un rôle important dans la délétion clonale, en association avec la stimulation TCR (Bour-Jordan et al., 2011; Griesemer et al., 2010).

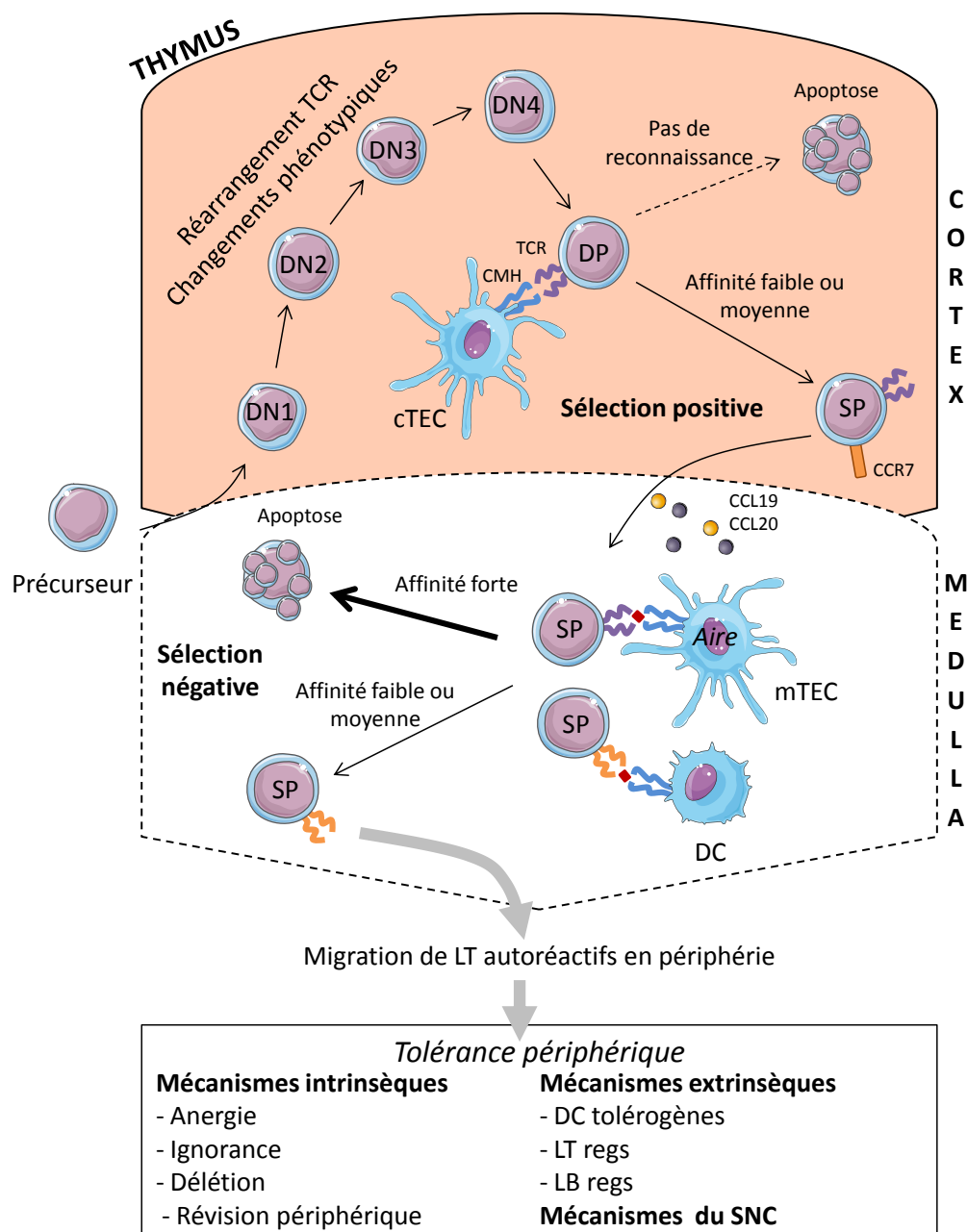


Figure 4 : Mécanismes de tolérance centrale et périphérique. Dans le cortex, les thymocytes DP reconnaissant des CMH du soi avec une affinité faible ou moyenne échappent à la mort par négligence, c'est la sélection positive. Ils migrent ensuite dans la médulla, au sein de laquelle la reconnaissance d'un complexe CMH-peptide du soi avec une affinité forte entraîne leur apoptose, c'est la sélection négative. Certains LT autoréactifs échappent à la tolérance centrale et migrent en périphérie où des mécanismes de tolérance existent aussi.

Les LT régulateurs se développent aussi dans le thymus et présentent une affinité moyenne ou élevée pour les Ags du soi. Les mécanismes mis en jeu pour contourner la sélection négative sont encore peu connus (Griesemer et al., 2010; Jordan et al., 2001; Klein et al., 2009)

b. La tolérance périphérique

Les études s'accordent sur le fait que seulement 2 à 5% des précurseurs T à l'entrée du thymus recirculent en périphérie (Yates, 2014). Parmi ces LT, un certain degré d'auto-réactivité subsiste encore. Ces LT reconnaissent des complexes CMH-peptides avec des affinités assez faibles ou sont spécifiques de peptides présents en trop faible quantité dans le thymus. Des mécanismes sont en place en périphérie pour éviter le développement de pathologies auto-immunes, comme le montre la présence de LT reconnaissant des Ags de la myéline chez les volontaires sains par exemple (Burns et al., 1983; Sospedra and Martin, 2005). Des défaut génétiques affectant ces mécanismes de tolérance périphérique et des désordres auto-immuns sont clairement associés (Walker and Abbas, 2002).

Les mécanismes intrinsèques :

Ignorance clonale : un des mécanismes permettant la tolérance périphérique est la séparation physique entre les LT autoréactifs et les tissus contenant leurs Ags. Les LT naïfs circulent du sang dans les organes lymphoïdes secondaires qui contiennent de nombreux Ags tissulaires. Cette migration se fait grâce au gradient d'expression des ligands du récepteur de chémokines CCR7 et grâce à la liaison de la sélectine L CD62L à ses ligands à la surface des ganglions lymphatiques. En l'absence de reconnaissance d'un complexe CMH-peptide porté par les DC présentes dans ces organes, l'expression de CCR7 diminue. Les LT migrent alors via la lymphe efférente dans le compartiment sanguin, où ils ont moins de chances d'entrer en contact avec leur Ag. En revanche, les LT ayant reconnu le complexe CMH-peptide expriment des récepteurs de homing, tels que PSGL1 (*P-Selectin Glycoprotein Ligand-1*) ou certaines intégrines comme l' $\alpha 4 \beta 1$, et expriment moins de CCR7 et de CD62L, ce qui leur permet de migrer dans les tissus. La migration dans un tissu contenant les Ags reconnus par les LT autoréactifs a donc de fortes chances d'entraîner la différenciation de ces LT en effecteurs (Mueller, 2010; Walker and Abbas, 2002). Un contexte d'inflammation, d'infection ou de blessure tissulaire est cependant nécessaire à la pleine activation de ces LT.

Anergie clonale : la stimulation d'un LT par le complexe CMH-peptide seul ne suffit pas à engager sa différenciation en LT effecteur : un deuxième signal est nécessaire, médié par des molécules de co-stimulation comme le CD28 (Harding et al., 1992). L'absence de co-engagement de CD28 entraîne une inactivation fonctionnelle du LT, caractérisée par une absence de prolifération et de production d'IL-2 en réponse à la stimulation antigénique. D'autres récepteurs de co-stimulation, mais cette fois-ci négatifs, tels que CTLA-4 (*Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated Protein 4*) ou PD-1 (*Programmed cell Death 1*), entraînent une inactivation fonctionnelle des LT lors de leur engagement. (Allen et al., 2011; Alpdogan and van den Brink, 2012; Bour-Jordan et al., 2011; Jenkins and Schwartz, 1987; Mueller, 2010).

Délétion clonale : l'engagement répété de LT autoréactifs par des complexes CMH-peptides entraîne la mort cellulaire induite par l'activation (AICD : *Activation-Induced Cell Death*). La délétion clonale est mise en place via des mécanismes dépendants à la fois de la voie Fas/FasL et de la voie mitochondriale dépendante de Bim, molécule proapoptotique de la famille de Bcl-2 (Allen et al., 2011; Alpdogan and van den Brink, 2012; Mueller, 2010; Walker and Abbas, 2002). En effet, chez l'homme comme chez la souris, des défauts dans la voie de signalisation de Fas conduisent à des syndromes lymphoprolifératifs associés à des désordres auto-immuns (Fisher et al., 1995; Watanabe-Fukunaga et al., 1992). De même, les LT des souris déficientes pour Bim résistent à l'apoptose et ces souris succombent à des maladies auto-immunes du rein (Bouillet et al., 1999). D'autres molécules, telles que Pten (*Phosphatase and TENsin homolog*), l'IL-2 et le TGF- β (*Transforming Growth Factor*), ont été impliquées dans la signalisation responsable de l'AICD (Lenardo, 1991; Suzuki et al., 2001; Walker and Abbas, 2002).

Révision périphérique : Bien que controversé, ce mécanisme entraînerait le réarrangement des TCR en dehors du thymus, entraînant ainsi la perte de TCR autoréactifs. La révision, décrite principalement dans différents modèles murins *in vitro* et *in vivo*, est initiée par la perte d'expression du TCR et est dépendante de la réexpression des enzymes RAG et TdT (Hale and Fink, 2010; Kuklina, 2006).

Les mécanismes extrinsèques : Ce sont des mécanismes médiés par d'autres types cellulaires et qui permettent d'inhiber l'activation des LT autoréactifs.

Les DC tolérogènes (Mueller, 2010; Walker and Abbas, 2002) : Les premières descriptions du rôle des DC dans la tolérance périphérique viennent d'études de transfert de DC immatures dans des modèles murins d'allogreffe cardiaque. Ces transferts permettent de prolonger la survie du greffon (Fu et al., 1996; Lu et al., 1997). En absence d'inflammation, la présentation par des DC immatures induit donc une tolérance pour les LT naïfs portant un TCR avec une haute avidité. De plus, l'ingestion de peptides dérivés de cellules apoptotiques semble diminuer l'activation via les TLR (Toll-Like Récepteurs) et induire un phénotype tolérogénique des DC. L'induction de la tolérance aux Ags du soi passe par diverses mécanismes, dont l'anergie et la délétion clonale par le biais de Fas ou IDO (*Indoleamine-pyrrole 2,3-dioxygenase*)¹⁰, mais aussi le développement de LTregs (Chung et al., 2013). Les DC tolérogènes sont aujourd'hui utilisées dans de nombreux essais cliniques. Dans la SEP, une étude récente développe de telles DC à partir de monocytes de patients (Raïch-Regué et al., 2012). Ces DC chargées avec des peptides de la myéline sont capables de diminuer de façon stable *in vitro* la réponse de LT spécifiques issus de patients SEP.

Les LTregs : De nombreuses populations de LTregs ont été décrites, des LT CD4⁺ naturels, en passant par les LT CD4⁺ induits, sans oublier certaines sous-populations de LT CD8⁺, ainsi que les LTγδ et les NKT. Les LTregs naturels (nTregs) CD4⁺CD25⁺ sont caractérisés par l'expression de FoxP3 (*Forkhead box P3*), se développent dans le thymus et sont anergiques à la reconnaissance d'un Ag par le TCR (Fletcher et al., 2010; Wing and Sakaguchi, 2010). Des mutations dans le gène codant le facteur de transcription FoxP3 sont à l'origine de l'IPEX (dérégulation immunitaire, polyendocrinopathie, entéropathie liées à l'X), un syndrome auto-immun sévère (Wildin et al., 2002). Les populations de LTregs inhibent la prolifération des autres LT, entraînent leur anergie ou leur apoptose. Les mécanismes mis en jeu sont variés, de l'engagement de molécules de co-stimulation inhibitrices telle que CTLA-4, à la production de médiateurs solubles tels que la cytokine anti-inflammatoire IL-10 ou encore à la cytotoxicité médiée par le GZM et la perforine. Ces mécanismes peuvent aussi agir en synergie (Alpdogan and van den Brink, 2012; Wing and Sakaguchi, 2010).

Les LB regs : Les LB régulateurs constituent une population décrite récemment et dont l'action est médiée par la production d'IL-10 (Fillatreau et al., 2002; Mauri and Bosma, 2012).

¹⁰ Enzyme catalysant la dégradation du tryptophane

Mécanismes spécifiques au SNC : Des mécanismes spécifiques au SNC existent afin d'éviter l'activation de LT reconnaissant des Ags du cerveau. Le premier mécanisme est la présence de la BHE, qui permet de séquestrer les Ags spécifiques du SNC. Les différentes protéines constitutives de la myéline sont quant à elles exprimées soit seulement dans le SNC (MOG par exemple), ou dans les systèmes nerveux périphérique et central (MBP, MAG¹¹, PLP) (Baumann and Pham-Dinh, 2001). Leur accès par les LT autoréactifs est donc limité. D'autres mécanismes existent aussi *in situ*. Parmi les LT issus du SNC de souris naïves portant des TCR transgéniques spécifiques soit de la MBP, soit du virus de la méningite lymphocytaire, seuls les LT spécifiques de la MBP sont insensibles à la stimulation antigénique *in vitro*. Ce mécanisme, certainement médié par les cellules mononucléées du SNC, n'est pas suffisant pour éviter la démyélinisation lorsque les LT sont préalablement activés en périphérie (Brabb et al., 2000). Dans un autre modèle murin exprimant un peptide de l'ovalbumine sur les oligodendrocytes, le transfert de LT CD8⁺ spécifiques de l'ovalbumine n'est délétère qu'en cas d'infection du SNC. Sinon, et si les LT autoréactifs traversent la BHE suite à leur activation par exemple, ils prolifèrent puis subissent une apoptose dépendante de Fas, permettant ainsi le maintien de la tolérance dans le SNC (Na et al., 2012). Dans un autre modèle semblable, la tolérance est mise en place par des DC immatures présentant des Ags gliaux dans les organes lymphoïdes secondaires (Schildknecht et al., 2009). Chez la souris, des DC du SNC pourraient migrer dans les ganglions lymphatiques cervicaux via le flux migratoire rostral (à travers la lame criblée de l'ethmoïde et/ou le long des nerfs craniens) et empêcher la migration des LT pathogéniques via l'activation de Tregs (Mohammad et al., 2014). L'expression de Fas et de PDL1 par la microglie et les astrocytes semble aussi important pour éviter les conséquences délétères d'une neuroinflammation non contrôlée (Galea et al., 2007; Schachtele et al., 2014).

En conclusion, les réarrangements du TCR génèrent un pool de LT conséquent permettant la protection contre tout type d'agression. Le nombre de TCR présents dans un individu a été estimé autour de 10⁶, ce qui est dans la même gamme que les dernières estimations extrapolées d'études de séquençage à haut débit (Arstila et al., 1999; Woodsworth et al., 2013). La présence de LT autoréactifs est inhérente à ces mécanismes, et de nombreux

¹¹ La MAG, glycoprotéine associée à la myéline, représente 1% des protéines de la myéline du SNC (Baumann and Pham-Dinh, 2001)

mécanismes centraux et périphériques existent pour minimiser l'impact de ces LT sur l'organisme. Cependant, ces mécanismes ne sont pas toujours suffisants.

B. ACTIVATION DES LT AUTOREACTIFS DANS LA SEP

Les LT autoréactifs semblent échapper à la sélection négative en raison d'une affinité relativement faible pour le complexe CMH-peptide. Les études structurales réalisées jusqu'à présent sur ces LT concernent majoritairement des LT issus de patients SEP ou d'animaux EAE, qui reconnaissent des peptides de la myéline (MBP). Ces études, bien que réalisées sur peu de complexes, suggèrent que la reconnaissance structurale est sous optimale (Yin et al., 2012). De plus, d'autres auteurs proposent que la formation de la synapse immunologique pourrait être altérée dans le cas de LT autoréactifs, entraînant là encore une affinité faible pour le complexe CMH-peptide (Schubert et al., 2012). Etant donné la faible affinité de ces TCR, comment peut-on expliquer leur activation dans le cas de maladies auto-immunes ? Différentes pistes existent, dont une présentation accrue par les cellules présentatrices d'Ag (CPA) de l'organe cible en comparaison au thymus, ce qui permet aux LT de faible affinité de s'activer tout de même (Wucherpfennig and Sethi, 2011; Yin et al., 2012). L'altération du peptide par des modifications post-traductionnelles pourraient aussi permettre d'augmenter l'affinité du TCR (Yin et al., 2012). La réactivité croisée, les superantigènes, la présence de deux TCR ou un défaut de régulation périphérique constituent aussi des pistes pour expliquer l'activation de ces LT autoréactifs. Certains de ces mécanismes sont présentés dans la figure suivante.

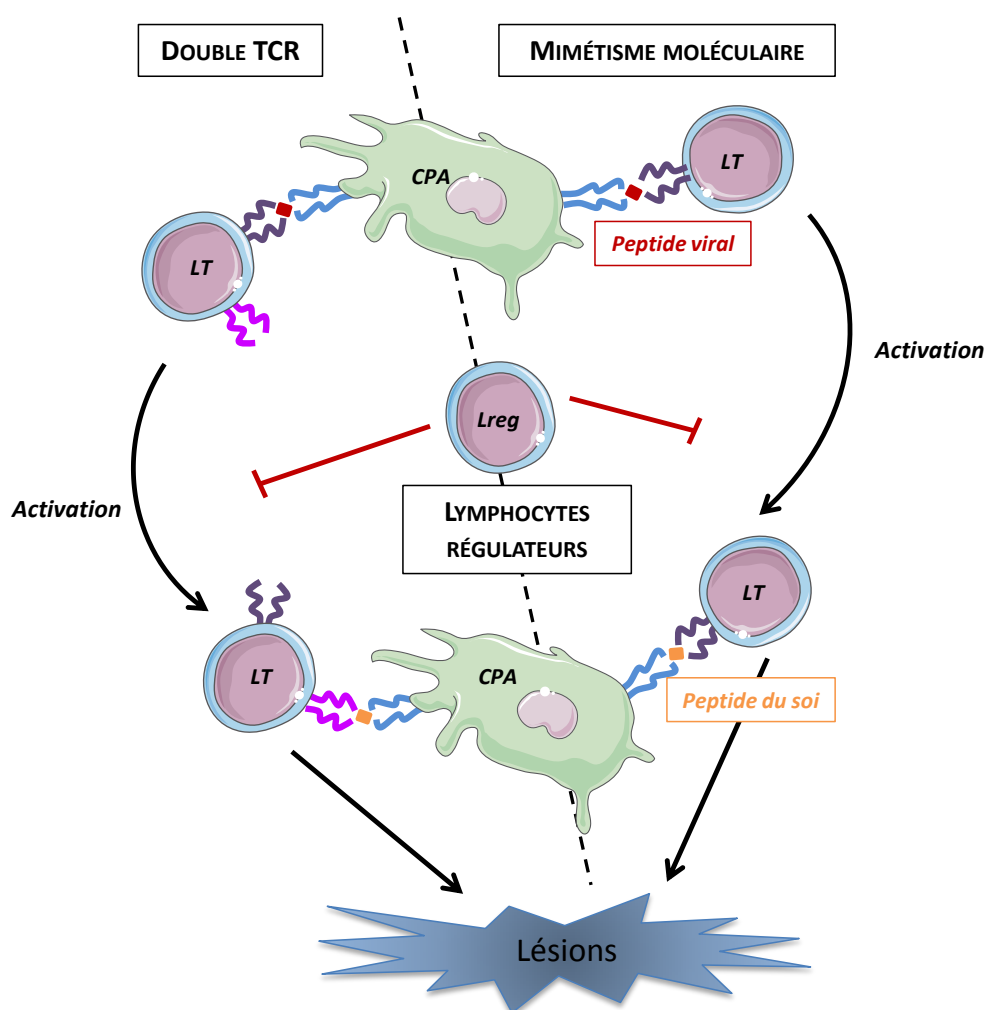


Figure 5 : Mécanismes possibles d'activation périphérique de cellules potentiellement autoréactives. Différents mécanismes ont été proposés pour l'activation de LT autoréactifs en périphérie. La première est celle du double TCR, c'est-à-dire que certains LT pourraient porter deux TCR, l'un reconnaissant un peptide viral, et l'autre un épitope de la myéline. La deuxième est celle du mimétisme moléculaire, à savoir que le TCR porté par la cellule pourrait reconnaître deux épitopes proches. Enfin, il a aussi été proposé un défaut de régulation des cellules potentiellement autoréactives.

1. La réactivité croisée ou le mimétisme moléculaire (figure 5)

Depuis les années 90, le dogme d'un TCR-un complexe CMH-peptide a été peu à peu abandonné. De nombreux arguments plaident en faveur de la polyspécificité des LT, c'est-à-dire de leur capacité à reconnaître plusieurs complexes CMH-peptides (Sewell, 2012; Wucherpfennig et al., 2007). La première démonstration de l'implication de la réactivité croisée dans la SEP date de 1985, grâce à un peptide de la polymérase du virus de l'hépatite B partageant 6 acides aminés consécutifs avec un peptide de la MBP, et dont l'injection entraîne des atteintes histologiques proches de celles obtenues avec le peptide de la MBP (Fujinami and Oldstone, 1985). Une autre étude a montré 10 ans plus tard que des clones T issus de patients SEP et spécifiques d'un peptide de la MBP pouvaient être activés par un

peptide bactérien et sept peptides viraux, dont un de l'EBV. Un modèle de mimétisme moléculaire a alors été décrit, dans lequel des LT autoréactifs seraient activés en périphérie lors de l'infection par un pathogène possédant un Ag à caractéristiques structurales proches de cellules d'épitopes de la myéline. Ces clones activés peuvent alors traverser la BHE et induire une inflammation du SNC. Ce mécanisme est d'autant plus probable que différents pathogènes ont été associés à la SEP et aux poussées, même si aucun pathogène n'a été formellement démontré comme déclencheur de la maladie (Compston and Coles, 2008; Libbey et al., 2014). Le mimétisme moléculaire semble plus dépendre d'une similarité structurale liée à la conservation des sites d'ancrage plutôt que d'une similarité de séquence stricte (Birnbaum et al., 2014; Ercolini et al., 2007; Harkiolaki et al., 2009; Wucherpfennig and Strominger, 1995; Zhang et al., 2008).

a. Le mimétisme moléculaire et le déclenchement de l'EAE

Différents peptides viraux proches de peptides de la MBP ou de la PLP ont été montrés comme induisant l'EAE. Ainsi, l'EAE est déclenchée chez des rongeurs par injection de peptides issus soit du virus JC soit d'une amibe. La maladie est alors associée à des LT de type Th1 et Th17 reconnaissant à la fois les deux peptides et dont le transfert chez des animaux naïfs induit la maladie (Mao et al., 2007; Massilamany et al., 2011). L'infection de souris par un variant non pathogène du virus TMEV (*Theiler's Murine Encephalitogenic Virus*) induit une EAE lorsque le virus exprime des épitopes similaires de la PLP, de *Haemophilus influenza* ou du virus murin hépatique. La maladie est caractérisée par le développement de LT CD4⁺ Th1 spécifiques de la PLP qui peuvent être activés lors de l'infection en périphérie (Croxford et al., 2005, 2006a; Olson et al., 2001, 2002). Des observations similaires sur le mimétisme ont été faites chez des souris transgéniques humanisées exprimant à la fois un TCR spécifique de la MBP et HLA-DR2, en leur injectant des peptides mimant la MBP issus de différentes bactéries et virus (Greene et al., 2008).

b. Le mimétisme moléculaire chez les patients SEP

Chez des patients SEP, mais aussi chez les volontaires sains, certains clones lymphocytaires spécifiques de la MBP ou de la PLP peuvent être activés en présence de peptides dérivés de différents virus dont l'EBV, voire en présence de peptides de levure (Boucher et al., 2007; Cheng et al., 2012; Cirone et al., 2002; Holmøy et al., 2004; Honma et al., 1997; Lünemann et al., 2008; Markovic-Plese et al., 2005; Talbot et al., 1996; Tejada-Simon et al., 2003). Ces

résultats ne sont cependant pas confirmés dans d'autres études (Lindsey and Hatfield, 2010; Richert et al., 1988a, 1988b). De même, la question de savoir si cette réactivité croisée est plus fréquente chez les patients que chez les témoins reste non résolue. Cela s'explique notamment car ces études réalisent des corrélations à partir de clones particuliers. Les LT impliqués dans la reconnaissance croisée sont là encore divers, il s'agit de CD4 ou de CD8 avec des propriétés cytotoxiques (Cheng et al., 2012; Cusick et al., 2013; Lünemann et al., 2008; Matossian-Rogers et al., 1987; Tejada-Simon et al., 2003). Une étude de 2008 s'intéresse à la reconnaissance d'un pool de peptides s'associant au variant du CMH-II associé à la SEP. La fréquence de LT portant un TCR dégénéré reconnaissant ce pool (c'est-à-dire reconnaissant plusieurs peptides du pool étudié, chaque peptide individuellement étant en trop faible concentration pour générer une réponse) est plus importante chez les patients que chez les témoins, et certains clones reconnaissent aussi des peptides de la myéline, ce qui suggère leur implication dans le processus de la maladie (Zhang et al., 2008).

2. Les LT portant deux TCR (figure 5)

Dans les années 90, l'existence de LT portant deux chaînes α fonctionnelles chez l'homme et la souris a été démontrée. Ces LT avec deux TCR sont estimés comme représentant jusqu'à 30 et 15% des LT $\alpha\beta$ chez l'homme et la souris, respectivement (Corthay et al., 2001; Elliott, 1998; Elliott and Altmann, 1995; Heath et al., 1995; Padovan et al., 1993). De même, certains LT portant deux chaînes β ont été observés chez l'homme et la souris, où ils représentent respectivement 1 et 5-7% (Davodeau et al., 1995; Munthe et al., 1996; Padovan et al., 1995). La fonctionnalité de ces TCR est restée longtemps controversée, notamment à cause de la difficulté à les identifier expérimentalement sans utiliser de souris transgéniques. Une étude relativement récente a observé la présence de LT avec deux TCR lors d'une prolifération induite par une lymphopénie chez la souris. Bien qu'une grande majorité des clones soit non fonctionnelle, 5% des clones avec un double TCR présentent une affinité forte pour des Ags du soi normalement tolérés (Kekäläinen et al., 2010). Alors qu'un TCR autoréactif soumet le LT qui le porte à la sélection négative, la présence d'un autre TCR non autoréactif peut considérablement diminuer l'expression du premier TCR, permettant ainsi au LT d'échapper à la sélection négative. Cela a pu être observé dans des souris transgéniques (Ni et al., 2014; Sarukhan et al., 1998; Zal et al., 1996). Cependant, les études *in vivo*, toujours sur des souris transgéniques, ont mené à des résultats contradictoires dans des modèles murins de

diabète, de SEP ou de lupus (Corthay et al., 2001; Elliott and Altmann, 1995, 1996; Fossati et al., 1999; Zal et al., 1996). Plus récemment, dans un modèle transgénique de souris générant des LT CD8⁺ spécifiques de la MBP, l'EAE peut être induite par l'infection avec un virus n'ayant aucun épitope pouvant cross-réagir avec le TCR spécifique de la MBP. L'EAE est déclenchée par les LT portant deux TCR, un spécifique de ce virus, et l'autre de la MBP (Ji et al., 2010). Chez l'homme, des LT portant deux TCR (une chaîne β , deux chaînes α) ont été identifiés comme surreprésentés dans des lésions de SEP (Kim et al., 2012). La présence d'un deuxième TCR peut donc permettre l'échappement à la sélection négative, mais aussi entraîner des réactions auto-immunes en activant le LT via le TCR non autoréactif. A noter tout de même, il semble que ces LT nécessitent une quantité de ligand plus importante pour l'activation (Blichfeldt et al., 1996).

3. Les superantigènes

Les superantigènes, toxines de nature protéique, se lient à la fois au CMH et au TCR, entraînant la prolifération et la sécrétion de cytokines par le LT ainsi activé (Libbey et al., 2014). Quelques études impliquent les superantigènes dans le développement de la SEP. Les entérotoxines staphylococciques A et B ont été montrées comme responsables de la réapparition de poussées dans l'EAE suite à la rémission, par stimulation des LT spécifiques de la MBP (Bright et al., 1999; Brocke et al., 1993, 1993; Constantinescu et al., 1998; Racke et al., 1994; Schiffenbauer et al., 1993; Soos et al., 2002; Sun, 1993). Ces mêmes superantigènes ont été associés à des périodes de poussées chez des patients SEP, là encore par activation de LT spécifiques de la MBP ou de la PLP (Burns et al., 1992; Mulvey et al., 2011; Zhang et al., 1995).

4. Les phénomènes d'*epitope spreading* et d'*activation bystander*

Lorsque des LT autoréactifs s'attaquent à un tissu, il s'ensuit la libération d'Ag et la mise en place de nouvelles réponses autoréactives. Le phénomène de glissement d'épitope - ou *epitope spreading* - entraîne ainsi la mise en place de réponses contre d'autres épitopes du soi, différents de l'épitope initiateur et issus soit de la protéine initiatrice, soit d'autres protéines. Ces épitopes peuvent être non accessibles dans une situation d'homéostasie, mais disponibles lors de l'inflammation et la destruction tissulaire. L'inflammation peut aussi mener au recrutement et à l'activation de LT de façon non spécifique, il s'agit de l'activation

bystander. Un glissement d'épitope a pu être observé chez l'homme, mais aussi chez des souris exprimant un CMH humain ou dans différents modèles d'EAE induits par la MOG, la PLP ou la MBP (Croxford et al., 2002; Goebels et al., 2000; Klehmet et al., 2004; Lehmann et al., 1992; McRae et al., 1995; Yu et al., 1996). Une étude récente a démontré que des DC particulières (Tip-DC) pouvaient entraîner un glissement d'épitope à des LT CD8⁺ spécifiques de la MBP lors d'une EAE induite par transfert de CD4⁺ spécifiques de la MOG (Ji et al., 2013). De plus, chez les patients SEP, les LT CD8⁺ reconnaissant des Ag apoptotiques (dérivés des LT mais peut-être aussi d'autres types cellulaires) semblent augmentés dans le sang et s'accumulent dans le LCR, en corrélation avec l'activité de la maladie. Ce phénomène, induisant la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IFN γ et l'IL-17, pourrait amplifier et maintenir la réponse délétère dans la SEP (Lolli et al., 2013). Enfin, des modifications post-traductionnelles peuvent aussi entrer en jeu et activer des sous-populations de LT auto-agressifs (Artemiadis and Anagnostouli, 2010). Par exemple, la citrullination¹² de la MOG₃₅₋₅₅ active une sous-population de LT qui cross-réagit avec la MOG native, et une autre spécifique de la forme citrullinée. Cette seconde population, bien qu'incapable d'induire l'EAE, entraîne une aggravation de la maladie chez une souris déjà malade (Carrillo-Vico et al., 2010). La citrullination de la MBP peut de plus entraîner l'émergence d'épitopes immuno-dominants ou rendre la protéine plus susceptible à des clivages enzymatiques, déstabilisant ainsi la myéline (Musse et al., 2006). L'ensemble de ces phénomènes rend donc difficile l'identification d'un Ag particulier.

5. Défaut de régulation périphérique (figure 5)

a. Implication des LTregs naturels

Les études de transfert adoptif et de déplétion des nTregs ont montré que ces cellules pouvaient contrôler le développement et la sévérité de l'EAE, via l'IL-10 (Matsushita et al., 2010; Venken et al., 2010; Zhang et al., 2004). L'étude des nTregs chez l'homme est plus difficile, en particulier à cause du manque de marqueurs permettant de les isoler. De nombreuses études se sont intéressées aux LT CD4⁺CD25^{hi}, qui comprennent différentes sous-populations. De plus, FoxP3 étant un facteur de transcription, il est impossible d'isoler les cellules FoxP3⁺ vivantes. Les études sur les CD4⁺CD25^{hi} dans le sang ont montré qu'il n'y avait pas de différence de fréquence entre le sang des patients et celui des témoins (Lowther

¹² La citrullination est la conversion de l'arginine en citrulline

and Hafler, 2012; Venken et al., 2010). Plusieurs études ont par contre proposé un défaut fonctionnel des nTregs chez les patients atteints de SEP (Lowther and Hafler, 2012; Venken et al., 2010; Viglietta et al., 2004). Cependant, notre équipe a montré que lorsque l'on utilisait aussi le marqueur CD127, qui permet de supprimer les LT effecteurs encore présents dans la population $CD4^+CD25^{hi}$, le défaut de suppression n'était plus visible (Michel et al., 2008). Le défaut fonctionnel des nTregs dans la SEP reste donc aujourd'hui controversé, principalement à cause des différentes sous-populations considérées et des différents protocoles de stimulation utilisés. Des nTregs sont retrouvés dans le LCR de patients atteints de SEP mais très peu voire pas du tout sont identifiés dans les lésions (Fritzsching et al., 2011; Tzartos et al., 2008). La raison de cette absence de nTregs au sein du tissu inflammatoire reste mal comprise à ce jour. Certains auteurs ont pu montrer que les nTregs présentaient, dans le LCR, un phénotype les rendant très susceptibles à l'apoptose et proposent donc qu'ils seraient éliminés dans le SNC (Fritzsching et al., 2011).

b. Implication des LBregs

Depuis la découverte que les souris EAE déficientes en LB n'entraient pas en rémission (Wolf et al., 1996), différentes études ont impliqué les LBregs dans l'EAE par des mécanismes dépendants de l'IL-10 (Jamin et al., 2008; Mauri and Bosma, 2012). En effet, les souris ayant des LB déficients pour l'IL-10 ont une maladie aggravée. Le transfert adoptif de LB $IL-10^{+/+}$, mais pas de LB $IL-10^{-/-}$, restaure la rémission (Fillatreau et al., 2002). D'autres études ont depuis confirmé ces résultats. Il semble de plus que le rôle des LB dans l'EAE varie selon de la phase de la maladie. Ainsi, lorsque l'on déplète les LB sept jours avant l'induction, l'EAE est plus sévère, alors qu'elle est diminuée si la déplétion intervient au cours de l'EAE (Matsushita et al., 2010). Très peu d'études se sont intéressées à l'implication des LBregs dans la SEP. Cette sous-population cellulaire reste à ce jour encore mal caractérisée sur le plan phénotypique. Les résultats concernant la fréquence des LB producteurs d'IL-10 chez les patients sont contradictoires (Duddy et al., 2007; Iwata et al., 2011; Knippenberg et al., 2011; Michel et al., in revision Clin. Immunol.).

C. IDENTIFICATION DE LT PATHOGENIQUES ET DE LEURS ANTIGENES DANS LA SEP

Différents mécanismes peuvent donc expliquer l'activation de LT autoréactifs dans la SEP, mais leur identification représente une difficulté majeure. En effet, dans le cas de la souris transgénique, il est très facile de les repérer et de les analyser. Chez l'homme, l'absence d'Ag

connu ainsi que l'absence de marqueurs et/ou de localisation spécifiques rend leur identification et leur étude très difficile.

1. LT spécifiques d'antigènes prédéterminés

Isoler et étudier les LT autoréactifs à partir de leur spécificité antigénique est réalisable dans le cas où l'on connaît l'Ag responsable de la maladie, ce qui n'est pas le cas dans la SEP. Différentes études se sont attelées à déterminer si oui ou non les LT autoréactifs contre des Ags issus de la MBP, la MOG, la MAG ou la PLP étaient présents en plus grande quantité chez les patients que chez les témoins (Elong Ngono et al., 2012). Les différentes techniques utilisées (dilution en conditions limitantes, utilisation de tétramères, ELISPOTS, méthode basée sur l'échange de membrane lors de la synapse immunologique...), les types de cellules utilisées (après culture, *ex vivo*...) ainsi que les différents Ag testés rendent difficile la comparaison entre ces études, d'autant qu'il n'existe pas de consensus. Certaines études rapportent une augmentation dans le sang de patients par rapport aux témoins (Bahbouhi et al., 2010; Olsson et al., 1992; Pender et al., 2000; Wallström et al., 1998) alors que d'autres ne mettent en évidence aucune différence significative (Berthelot et al., 2008; Hellings et al., 2001; Jingwu et al., 1992). D'autres techniques, indépendantes de la connaissance préalable de l'Ag, sont donc nécessaires pour étudier les LT responsables de la maladie.

2. L'étude du répertoire (pas d'antigène connu)

Lorsqu'un LT reconnaît son Ag, dans les conditions appropriées de co-stimulation, il prolifère de façon clonale. Il est possible de le repérer au sein d'un répertoire polyclonal en cherchant les LT surreprésentés. Cette méthode a l'avantage de ne pas nécessiter la connaissance préalable du ou des Ag(s) impliqué(s). Il ne faut cependant pas oublier qu'une fois que l'Ag n'est plus disponible, le pool de LT clonaux se contracte progressivement.

a. Biais dans l'utilisation d'un V β

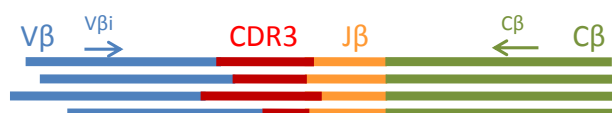
Différentes études chez l'animal ont suggéré que les LT autoréactifs responsables de l'EAE utilisaient préférentiellement un V β 8, ouvrant ainsi la porte à des thérapies ciblées contre les LT portant cette chaîne. Ainsi, la maladie est diminuée chez les animaux traités avec un anti-V β 8 (Acha-Orbea et al., 1988; Burns et al., 1989; Urban et al., 1988). Chez les patients, de nombreuses études se sont attachées à trouver un biais d'expression de V β parmi les LT totaux ou parmi ceux qui reconnaissent différents peptides de la myéline. Ces études ont comparé des patients et des témoins, en fonction ou non des allèles du CMH exprimés, et

aussi des jumeaux discordants ou concordants pour la maladie. Certains biais pour les V β 5, 6, 8 ou 17 ont été observés (Beall et al., 1989; Démoulins et al., 2003; Kotzin et al., 1991; Musette et al., 1996; Wucherpfennig et al., 1990). Cependant, d'autres études s'accordent sur le fait que le répertoire serait plutôt privé, et qu'il n'existe pas d'usage préférentiel d'un V β reconnaissant différents peptides de la myéline (Afshar et al., 1998; Martin et al., 1991, 1992; Meinel et al., 1993; Ben-Nun et al., 1991). De même, au sein du cerveau, certaines études ont montré un usage limité à certains V β ou V α (Oksenberg et al., 1990, 1993) alors que d'autres semblent trouver un répertoire polyclonal (Wucherpfennig et al., 1992). Ces résultats contradictoires s'expliquent notamment par le faible nombre de sujets ou de clones T étudiés et par la non exhaustivité du répertoire étudié, et rendent difficile l'application d'une thérapie ciblant les LT portant des chaînes V β données.

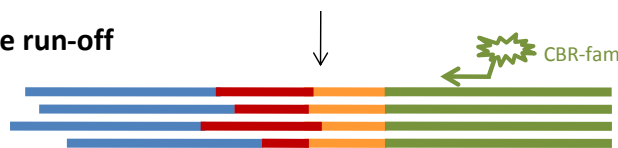
b. Etude des longueurs de CDR3 dans la SEP

L'étude du répertoire peut aussi être réalisée au niveau du clone, c'est-à dire en étudiant la répartition d'un réarrangement V(D)J au sein du répertoire total. Les différentes études se sont majoritairement intéressées à la chaîne β . Le "CDR3 spectratyping" ou étude de la longueur des CDR3 est une méthode permettant cette étude. Il s'agit de repérer une expansion clonale au sein d'une famille V β par le biais d'une surreprésentation de sa longueur (Pannetier et al., 1995). La technique est illustrée en figure 6.

1) PCR V β spécifique



2) Réaction de run-off



Analyse au séquenceur capillaire

3) Spectratyping

Distribution gaussienne

Distribution monoclonale

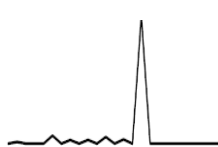
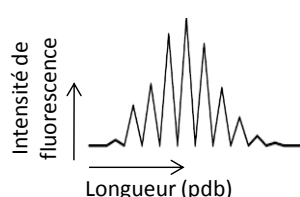


Figure 6 Exemple de CDR3 spectratyping. Cette technique consiste à amplifier l'ensemble des longueurs de CDR3 au sein d'une famille V β , puis à les visualiser grâce à une sonde fluorescente. L'analyse de la distribution des longueurs permet de repérer la présence (distribution monoclonale) ou l'absence d'expansions clonales (distribution Gaussienne traduisant la présence de toutes les longueurs réparties de manière statistique).

Cette méthode, qualitative, peut être couplée à des mesures quantitatives afin d'appréhender l'importance de l'expansion clonale.

Présence d'expansions clonales dans le sang : Grâce à cette méthode, dans un modèle d'EAE chez le rat, les LT pathogéniques V β 8 prédominants peuvent être repérés dans le sang en période préclinique et en poussée, mais pas en rémission (Kim et al., 1998). Cela suggère que des LT autoréactifs impliqués dans la maladie peuvent être repérés dans le sang de patients. Différentes études ont observé que le sang des patients SEP présentait plus d'expansions clonales que le sang des témoins (Gran et al., 1998; Laplaud et al., 2004; Matsumoto et al., 2003; Monteiro et al., 1996; Muraro et al., 2002). Ces expansions sont plus présentes dans le compartiment des LT CD8⁺ (Laplaud et al., 2004). De plus, le LCR présente plus d'expansions clonales que le sang chez les patients, surtout dans les CD8⁺ (Démoulin et al., 2003; Jacobsen et al., 2002; Lozeron et al., 1998). De façon intéressante, les expansions corrélaient avec l'activité clinique de la maladie : plus d'expansions dans le sang des patients présentant une activité IRM, et dans le LCR lors de la poussée par rapport à la rémission (Laplaud et al., 2006; Muraro et al., 2006). Ces données suggèrent donc que les LT oligoclonaux, et particulièrement les CD8⁺, jouent un rôle dans la maladie. Cela reste controversé, notamment en l'absence de corrélation entre la maladie et les LT oligoclonaux du sang de jumeaux discordants ou en l'absence de pattern spécifique dans le LCR de patients SEP par rapport à des patients atteints d'autres maladies neurologiques (Gestri et al., 2001; Somma et al., 2007). Ces derniers résultats soulèvent donc une question cruciale : comment différencier les expansions spécifiques de la maladie et celles spécifiques de l'histoire immunologique du patient ? En effet, des expansions clonales, notamment au sein des CD8⁺, apparaissent dans le sang de volontaires sains, en corrélation avec leur âge (Degauque et al., 2011; Morley et al., 1995; Posnett et al., 1994; Schwab et al., 1997). Ces expansions ont été proposées comme résultant d'une stimulation antigénique chronique par des infections virales par exemple, bien que des peptides dérivés de virus communs (EBV, cytomégalo virus, grippe) n'activent pas ces LT (Degauque et al., 2011; Khan et al., 2002). Ces données soulignent donc l'importance de comparer les répertoires des patients SEP et des témoins, afin de minimiser l'impact des expansions non-spécifiques de la maladie. Le répertoire au sein de l'organe malade permet de contourner en partie ce problème.

Présence d'expansions clonales dans le cerveau : Les expansions clonales au sein du SNC, lieu de la pathologie, peuvent apporter plus d'indications quant aux LT autoréactifs impliqués dans la SEP. Ainsi, des expansions clonales, majoritairement au sein des LT CD8⁺, ont été retrouvées dans le tissu cérébral de patients SEP (Babbe et al., 2000; Junker et al., 2007; Montes et al., 2009). Ces expansions sont présentes dans différentes localisations du cerveau, y compris dans la substance blanche d'apparence normale, et les clones étudiés portent des mutations silencieuses (Junker et al., 2007). Cela suggère fortement des processus de migration ou de prolifération *in situ* dépendants d'un Ag. De plus, une étude a montré que certains clones pouvaient être retrouvés jusqu'à des années plus tard dans le sang, avec pour certains un phénotype activé, et dans le LCR (Skulina et al., 2004). Ces données mènent à différentes questions : ces clones sont-ils importants pour la progression de la maladie ? Que reconnaissent-ils ? Pourrait-on les identifier chez des patients sans biopsie cérébrale ?

c. Le séquençage à haut débit

La mise au point ces dernières années du séquençage à haut débit marque un grand pas dans la compréhension de la dynamique des répertoires T, en permettant de quantifier la diversité du TCR à une échelle beaucoup plus large. Ainsi, les dernières études suggèrent que le répertoire des LT mémoire est beaucoup plus important que précédemment décrit (1% seulement du répertoire total), et que le répertoire publique, c'est-à-dire partagé entre différents individus compte pour plus 15% du répertoire total. Les différents individus sont caractérisés par des répartitions variables de ces millions de TCR (Woodsworth et al., 2013). Récemment, une méthode couplant tri en cytométrie et séquençage à haut débit a été mise au point afin d'identifier les chaînes α et β du TCR ainsi que l'expression de certains gènes associés au phénotype, et ce au niveau unicellulaire (Han et al., 2014). Cette technique, appliquée à différentes maladies, pourra permettre de mieux comprendre l'implication fine des différents LT. Le séquençage à haut débit a pour l'instant été peu appliqué à l'auto-immunité. Chez les patients en tout début d'arthrite rhumatoïde, l'infiltrat synovial est dominé par quelques clones dominants, privés, et présents dans toutes les articulations touchées mais pas dans le sang (Klarenbeek et al., 2012). Le séquençage à haut débit de répertoire T dans la SEP a été appliqué à la reconstitution du répertoire après transplantation autologue de cellules souches hématopoïétiques (Muraro et al., 2014). De

plus une étude très récente a utilisé cette technique pour comparer les répertoires du LCR et du sang de patients SEP, montrant un enrichissement en séquences spécifiques de l'EBV dans les LT CD8⁺ du LCR, soulevant encore le lien entre l'EBV et la SEP (Lossius et al., 2014). Le répertoire B dans la maladie a quant à lui permis de montrer que des LB clonaux ou reliés de façon clonale étaient retrouvés dans le LCR et le sang, et que des LB participant à la production des bandes oligoclonales pouvaient être trouvés dans le sang (Bankoti et al., 2014; von Büdingen et al., 2012). Cela suggère que les mécanismes à l'origine de clones B pathogènes puissent avoir lieu en périphérie et/ou dans le SNC.

3. Identification des antigènes reconnus

L'approche par le répertoire permet donc d'identifier des LT potentiellement autoréactifs mais leurs Ags restent inconnus. La découverte de ces Ags permettrait une grande avancée dans la compréhension de la physiopathologie de différentes maladies. Cependant, cette quête se heurte à différents obstacles : l'interaction du LT avec un peptide nécessite sa présentation par un CMH dont la variabilité allélique est très importante et l'affinité de interaction TCR-CMH-peptide est faible comparé à l'interaction d'un anticorps avec sa cible. De plus, le TCR est fortement polyspécifique, comme discuté plus haut, d'où la difficulté d'identifier un Ag pertinent pour la maladie (Dornmair et al., 2009; Woodsworth et al., 2013). Dans ce cadre, beaucoup d'études ont testé leurs clones sur des Ags candidats. La réalisation de banques de peptides synthétiques a été une grande avancée, en permettant la recherche non biaisée d'Ag. Ces banques présentent néanmoins des quantités immenses de peptides, et il est très difficile de connaître la pertinence biologique de ceux-ci. Enfin, il est plus pertinent de rechercher des LT autoréactifs sur le lieu de la pathologie, ce qui soulève les contraintes de disponibilité et de conservation des tissus. Ces contraintes sont particulièrement importantes dans le cas de la SEP, où les biopsies sont exceptionnelles et où les tissus disponibles sont majoritairement des tissus autopsiques congelés.

Un groupe en particulier s'intéresse à la reconstitution des chaînes α et β de LT potentiellement autoréactifs retrouvés au site de l'inflammation pour ensuite chercher leurs Ags (Dornmair et al., 2009). Les LT autoréactifs sont d'abord identifiés comme tels grâce à leur localisation, grâce à leur statut activé *in situ*, ou encore grâce au répertoire. Ils sont ensuite isolés soit par microdissection laser sur des tissus congelés marqués par immunofluorescence, soit par cytométrie en flux dans le cas de sang ou de culture cellulaire

issue d'explants. Des méthodes de PCR multiplexes ont été développées afin d'identifier les chaînes α et β portées par chacun des LT isolés (Kim et al., 2012; Seitz et al., 2006). Suite à cette identification, le TCR fonctionnel est exprimé dans un hybridome transfecté avec une GFP sous le contrôle du facteur nucléaire d'activation des T. Cela permet le criblage d'une librairie de peptides encodée dans des plasmides. Ces plasmides ont préalablement été co-transfectés avec la molécule de CMH adéquate dans des cellules COS. L'activation du TCR lors de la reconnaissance d'une cellule COS présentant l'Ag entraîne l'expression de la GFP dans l'hybridome, et l'isolement de la cellule COS correspondante permet l'accès aux plasmides présents dans cette cellule et donc aux peptides reconnus par le LT. Le preuve du concept a été réalisée pour un TCR spécifique de la grippe (Siewert et al., 2012). Cette méthode n'a pour l'instant pas permis de découvrir des Ags impliqués dans la SEP. Bien que présentant de réels avantages, cette technique est tout de même laborieuse et le développement de nouvelles approches reste nécessaire. Le couplage entre le séquençage à haut débit et le développement d'algorithmes intégrant les acides aminés importants pour les sites d'ancrage au TCR et au CMH, mais aussi pour l'affinité de la reconnaissance et les effets de coopération entre différentes positions, a été récemment mis en place avec succès (Birnbaum et al., 2014).

En conclusion, le développement des LT permet de générer des LT réactifs contre une grande majorité d'Ags exogènes. La mise en place d'une réponse autoréactive est inhérente à ces phénomènes, et malgré l'existence de mécanismes permettant de contrer cette autoréactivité, certains LT s'échappent et entraînent des maladies autoimmunes. Il existe d'autres catégories de LT, qui présentent un répertoire limité et qui, par rapport aux LT conventionnels, répondent de façon rapide aux stimuli, avant la mise en place de la réponse adaptative, permettant ainsi de réagir rapidement à l'invasion de pathogènes.

III. LES LT INVARIANTS ET LEUR IMPLICATION DANS LA SEP

A. LES LYMPHOCYTES T INNES

La mise en place du répertoire dans le thymus génère une quantité de LT avec des TCR uniques, variants d'une cellule à l'autre. En parallèle, ces phénomènes génèrent aussi des LT avec un TCR invariant ou semi-invariant. Il existe des LT $\gamma\delta$ invariants, mais nous ne nous intéresserons ici qu'aux LT portant des chaînes $\alpha\beta$. Deux populations de LT invariants sont conservés entre les espèces, les cellules iNKT (*Invariant Natural Killer T*) et les cellules MAIT (*Mucosal Associated Invariant T*). Le tableau ci-dessous résume les principales données concernant ces deux types cellulaires. Par la suite, je ne m'intéresserai qu'aux cellules MAIT et à leur implication dans la SEP.

Tableau 1 : Caractéristiques des iNKT et des cellules MAIT.

	iNKT	MAIT
TCR chaîne α	V α 24-J α 18 (homme) V α 14-J α 18 (souris)	V α 7.2-J α 33/12/20 (homme) V α 19-J α 33 (souris)
TCR chaîne β	V β 11 (homme), V β 8.2/7/2 (souris)	V β 2/13 (homme), V β 6/8 (souris)
MHC	CD1d	MR1
Antigènes	Lipides (endo et exogènes)	Métabolites bactériens. Ligand endogène ?
Localisation	Foie, rate	Intestin, foie, sang
Développement	Thymus, thymocytes DP	Thymus, Thymocytes DP
Cytokines sécrétées	IL-4, IFN γ , IL-13, TGF β , IL-10	IFN γ , TNF α . IL17 ? (homme)
Implication dans la SEP	Régulateur dans l'EAE ? Diminution en périphérie chez SEP, faible fréquence dans les lésions	Régulateur dans l'EAE ? Fréquence en périphérie dans la SEP ? Pro-inflammatoire ou régulateur dans la SEP. Faible fréquence dans SNC

Références : Berzins et al., 2011; Caielli et al., 2011; Gapin, 2014; Gold et al., 2012; Salio et al., 2014; Treiner and Lantz, 2006.

B. LES CELLULES MAIT

1. Définition et historique

Les cellules MAIT sont des LT présents dans l'intestin. Leur chaîne α , invariante, est conservée entre différentes espèces de mammifères : V α 7.2-J α 33 chez l'homme, V α 19-J α 33 chez les bovins et la souris. Le CDR3 est de longueur constante, avec une séquence plus ou moins hétérogène en fonction des espèces, notamment chez l'homme. Ces cellules ont un

répertoire V β restreint, majoritairement V β 2 et V β 13 chez l'homme, V β 6 et 8 chez la souris (Porcelli et al., 1993; Tilloy et al., 1999; Treiner et al., 2003). Elles interagissent avec un CMH-I non classique, MR1 (MHC-related protein I), couplé à la β 2-microglobuline (Shimamura and Huang, 2002; Tilloy et al., 1999; Treiner et al., 2003).

L'absence d'outils spécifiques aux cellules MAIT a rendu leur étude difficile, jusqu'à la génération d'un anticorps anti-TCR V α 7.2 humain en 2009 (Martin et al., 2009). Ainsi, chez l'homme, ces cellules représentent 1 à 10% des LT circulants. Elles sont aussi présentes en grande quantité dans le foie et dans l'intestin (Dusseaux et al., 2011; Tang et al., 2013). A l'inverse des iNKT, les cellules MAIT sont rares chez la souris, ce qui en fait un sous-type cellulaire difficile à étudier. La création de modèles transgéniques murins surexprimant ces cellules a permis de contourner ce problème (Kawachi et al., 2006; Martin et al., 2009; Okamoto et al., 2005). Cependant, dans ces trois modèles murins générés indépendamment (modèles A, B et C, tableau 2 ci-dessous), les cellules MAIT diffèrent en terme de phénotype et de fonction (Gapin, 2014). De plus, étant donné qu'aucun marqueur discriminant n'a été mis en évidence, les cellules MAIT murines sont surtout étudiées de façon indirecte, en comparant les animaux MR1^{+/+} et MR1^{-/-}. Récemment, un tétramère MR1 modifié portant un Ag reconnu par les MAIT a été développé, ce qui va permettre d'isoler et de mieux caractériser les cellules MAIT murines notamment (Lepore et al., 2014; Reantragoon et al., 2013).

Tableau 2 : Modèles murins utilisés lors de l'étude des cellules MAIT

	Modèle A	Modèle B	Modèle C
Référence	Okamoto et al., 2005	Kawachi et al., 2006	Martin et al., 2009
Co-récepteur		CD4 et DN	CD8
Phénotype	Activé/mémoire	Mémoire activé (50%)	Naïves
Pathologies testées	Arthrite, EAE	Infections bactériennes	Infections bactériennes

Références : Le Bourhis et al., 2010; Chiba et al., 2012; Chua et al., 2012; Croxford et al., 2002; Meierovics et al., 2013; Seach et al., 2013

2. Phénotype et caractéristiques des cellules MAIT

a. Le TCR et le co-récepteur des cellules MAIT

Les cellules MAIT ont un TCR semi-invariant identifié initialement comme étant V α 7.2-J α 33. Des études de séquençage à haut débit ont permis d'identifier deux autres chaînes J, J α 12 et

Ja20, associées à ce Vα7.2 et portées par des cellules présentant les caractéristiques fonctionnelles des cellules MAIT (Lepore et al., 2014; Reantragoon et al., 2013).

Chez l'homme, environ 80% des cellules MAIT expriment le CD8, et plus particulièrement le CD8αα (entre 50 et 90% des cellules MAIT CD8⁺, le reste étant CD8αβ^{lo}) (Lee et al., 2014; Martin et al., 2009; Reantragoon et al., 2013; Walker et al., 2012). L'importance du co-récepteur CD8α dans la reconnaissance reste encore méconnue et certains auteurs proposent qu'il serait un co-répresseur plutôt qu'un co-récepteur (Walker et al., 2012). Les 20% restants expriment très peu le CD4, et sont principalement DN (Lee et al., 2014; Martin et al., 2009; Reantragoon et al., 2013). En comparaison avec des souris MR1^{-/-}, les cellules MAIT murines du modèle C sont identifiées comme majoritairement CD8, tandis que dans un autre modèle transgénique (modèle B), les cellules isolées par un tétramère spécifique sont majoritairement CD4 et DN (Martin et al., 2009; Reantragoon et al., 2013).

b. Des cellules productrices d'IL-17 ?

Les cellules MAIT expriment des molécules caractéristiques des cellules productrices d'IL-17 : les protéines membranaires CD161, IL-18Rα et IL-23R, ainsi que le facteur de transcription RORγT (*Retinoic acid receptor-related Orphan Receptor Gamma T*) (Annibali et al., 2011; Dusseaux et al., 2011; Maggi et al., 2010; Martin et al., 2009).

Chez l'homme, les LT sanguins qui produisent de l'IL-17 expriment CD161 (NKR1A/KLRB1), dont l'expression est induite par RORγT (Maggi et al., 2010). Les récepteurs NKR1, des lectines de type C, ont été décrits chez l'homme et le rongeur, et sont des marqueurs de cellules NK (Kirkham and Carlyle, 2014). Parmi les plus connus, on retrouve NK1.1 (NKR1B/C) chez la souris et CD161 (NKR1A) chez l'homme, qui ne semblent pas être des équivalents fonctionnels (Le Bourhis et al., 2011; Ryan et al., 1992). CD161 est exprimé par la majorité des NK et par environ 25% des LT du sang adulte, surtout les LT mémoires (Lanier et al., 1994). LLT1 (*Lectin-Like Transcript-1*) est un ligand potentiel de CD161 (Aldemir et al., 2005; Fergusson et al., 2011; Rosen et al., 2005). Il est exprimé notamment par les LT, NK, LB et DC activés. L'engagement de CD161 par LLT1 semble affecter les fonctions sécrétrices et effectrices des NK et des LT, bien que ce rôle soit encore méconnu. CD161 aurait aussi un rôle dans la migration trans-endothéliale des LT CD4⁺ et des LT γδ (Aldemir et al., 2005; Germain et al., 2011; Rosen et al., 2005, 2008).

Chez l'homme, au sein des cellules CD8⁺, la sécrétion d'IL-17 est restreinte aux CD161^{hi}, qui sécrètent aussi de l'IL-22, de l'IFN γ et du TNF α (Billerbeck et al., 2010). A noter, les CD8 α ⁺CD161^{hi} contiennent aussi toutes les CD8 $\alpha\alpha$ (Walker et al., 2012). Les cellules MAIT expriment de forts niveaux de CD161, ce qui suggère leur capacité à produire ces différentes cytokines. Environ 90% des CD8⁺CD161^{hi}, mais pas la totalité, sont des cellules MAIT (Abrahamsson et al., 2013; Ussher et al., 2014; Walker et al., 2012). Ces 10% restants peuvent expliquer certaines différences observées dans la littérature à propos des sous-types cellulaires MAIT, Tc17 (LT cytotoxiques) et CD8 mémoires de type cellules souches, qui sont des populations qui se chevauchent probablement (Fergusson et al., 2011; Walker et al., 2012).

c. Des cellules effectrices mémoires

Diverses études se sont intéressées au phénotype *ex vivo* des cellules MAIT sanguines humaines. Elles s'accordent toutes sur le fait que ces cellules, tout comme l'ensemble des cellules CD8⁺CD161^{hi}, présentent un phénotype effecteur mémoire CD45RO⁺CD45RA⁻CCR7⁻CD28⁺CD27⁺. Ce phénotype est confirmé par d'autres marqueurs : forte expression de CD127 (IL-7R- α) et de CD95 (Fas, impliqué dans la mort par apoptose), niveaux intermédiaires de CD122 (Récepteur à l'IL-2) (Abrahamsson et al., 2013; Annibali et al., 2011; Billerbeck et al., 2010; Dusseaux et al., 2011; Kondo et al., 2009; Martin et al., 2009; Takahashi et al., 2006; Tilloy et al., 1999). Enfin, comme la majorité des CD8⁺ mémoires, elles sont aussi NKp80^{var}NKG2D^{hi} et expriment CD150, CD244 et des niveaux variables de LAG3 (*Lymphocyte-Activation Gene 3*), ces derniers étant impliqués dans la co-stimulation et la co-inhibition (Abrahamsson et al., 2013; Billerbeck et al., 2010; Dusseaux et al., 2011; Jiang et al., 2014). Les cellules MAIT expriment aussi CD26, une dipeptidase capable de transformer différents chémokines et médiateurs peptidiques (Dusseaux et al., 2011). *Ex vivo*, les cellules CD8⁺CD161^{hi}, dont font partie les MAIT, expriment peu voire pas de CD107a et de GZM-B mais sont positives pour le GZM-A, le GZM-K et la perforine, suggérant des aptitudes cytotoxiques en concordance avec leur phénotype effecteur mémoire (Billerbeck et al., 2010; Havenith et al., 2012; Takahashi et al., 2006).

Chez la souris, le phénotype des cellules MAIT ne fait pas l'unanimité. En effet, dans le modèle transgénique B, la population présente chez les souris MR1^{+/+} mais absente des souris MR1^{-/-} est à 50% mémoire (CD44^{hi}CD45RB^{lo}CD62L⁻) et semble activée, comme en

témoigne l'expression du marqueur CD69 (Kawachi et al., 2006). En revanche, dans le modèle C, les transcrits correspondant à la chaîne α des cellules MAIT ne sont retrouvés que dans la sous-population naïve CD44⁺ (Martin et al., 2009). Cela souligne une différence importante entre l'homme et la souris, mais aussi entre deux modèles murins.

d. Un homing vers les tissus

Les cellules MAIT, tout comme les CD8⁺CD161^{hi} dans leur globalité, présentent un phénotype de homing vers les tissus. En effet, ces cellules n'expriment pas ou peu de CD62L et de CCR7, récepteurs nécessaires pour la migration dans les ganglions lymphatiques non inflammés. En revanche, elles expriment CCR6, CXCR6, CCR2, $\alpha 4\beta 1$, des niveaux intermédiaires de CCR9, mais pas de CD103, traduisant leur capacité à migrer vers des tissus comme le foie et l'intestin mais aussi le cerveau. Elles sont aussi positives pour CCR5, qui permet notamment la migration vers les tissus inflammés. A noter, les récepteurs CCR6, CCR5 et CXCR6 ont été associés aux cellules sécrétant de l'IL-17 (Abrahamsson et al., 2013; Annibali et al., 2011; Billerbeck et al., 2010; Dusseaux et al., 2011; Havenith et al., 2012; Kondo et al., 2009; Miyazaki et al., 2011; Wong et al., 2013).

e. Autres caractéristiques

Tout comme les cellules CD161^{hi} ou IL-18R α ^{hi}, les cellules MAIT expriment à leur surface la protéine d'efflux à des drogues multiples ABCB1, les rendant résistantes à la chimiothérapie et aux xénobiotiques (Dusseaux et al., 2011; Turtle et al., 2009). Elles sont de plus quiescentes, comme démontré par l'absence d'expression de Ki67 *ex vivo* (Dusseaux et al., 2011). Ces caractéristiques pourraient suggérer que les cellules MAIT soient des cellules souches, hypothèse rejetée récemment en raison de leurs télomères courts, de leur faible activité de télomérase par rapport aux autres CD8 mémoires, et de leur absence d'expression de l'aldéhyde déshydrogénase (Havenith et al., 2012). Leur profil hypoprolifératif semble pouvoir être modifié par différentes cytokines. Ainsi, l'association d'anti-CD3 avec de l'IL-12/18 et/ou IL-23 induit la prolifération d'au moins une partie des cellules CD8⁺CD161^{hi} (Annibali et al., 2011; Havenith et al., 2012; Turtle et al., 2011). De même, l'addition de LT CD4⁺ ou d'IL-2 à la stimulation par anti-CD3/CD28 entraîne leur prolifération, tout comme la culture en présence d'IL-7 mais surtout d'IL-15 pendant 15 jours (Havenith et al., 2012). L'IL-1 β promeut la prolifération des cellules MAIT murines du modèle A (Chiba et al., 2012).

Tout comme les iNKT, les cellules MAIT ont un profil pro-apoptotique, dépendant de PLZF (*Promyelocytic Leukaemia Zinc Finger protein*), facteur de transcription impliqué dans la différenciation des iNKT en effecteurs (Gérart et al., 2013). Ce profil pro-apoptotique permettrait de réguler ces LT innés facilement et rapidement. *In vitro*, lors de l'exposition à *Escherichia coli* (*E. coli*), les $CD8^+CD161^{hi}$ expriment plus de caspase 3 activée et survivent moins en comparaison aux $CD8^+CD161^{+/-}$ (Cosgrove et al., 2012).

Les caractéristiques phénotypiques principales des cellules MAIT humaines sont résumées dans la figure 7 ci-dessous.

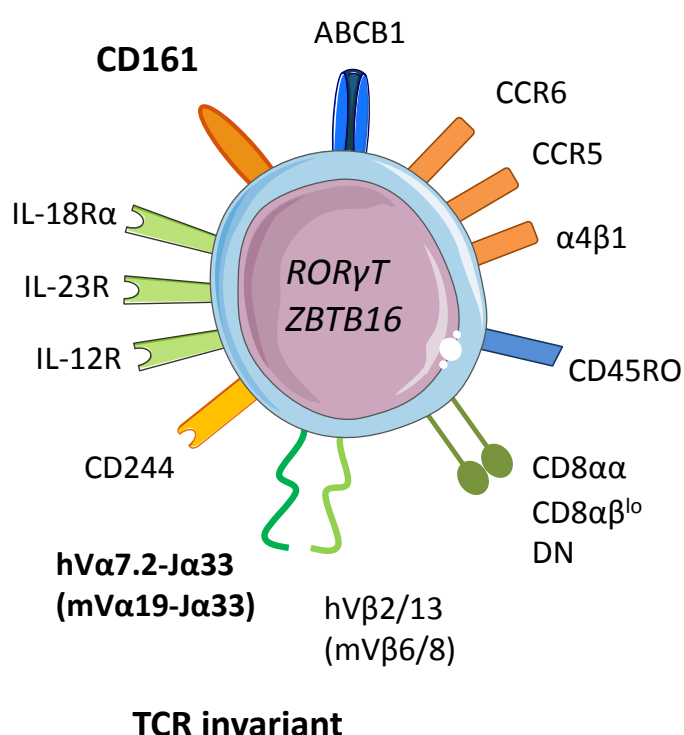


Figure 7 : Phénotype des cellules MAIT chez l'homme. Les cellules MAIT portent un TCR semi-invariant, et sont majoritairement $CD8^+$ et DN. Elles expriment de fortes quantités de CD161, ainsi que l'IL-18R α , l'IL-23R et l'IL-12R. Elles ont un phénotype mémoire et expriment des marqueurs de migration vers les tissus. Elles sont aussi caractérisées par l'expression de la molécule d'efflux ABCB1.

3. Développement

La présence de cellules MAIT dans le thymus humain plaide en faveur d'un développement thymique. Dans cet organe, et à l'inverse du sang adulte, elles ont un phénotype naïf, sont en faible quantité, majoritairement DN, et contiennent beaucoup de sjTREC¹³ (Gold et al., 2012; Leeansyah et al., 2014; Martin et al., 2009). Chez la souris, le développement intra-thymique des MAIT a été démontré par des cultures d'organe thymique foetal (Martin et al., 2009). Il semble que, tout comme pour les iNKT, des thymocytes DP sélectionnent les

¹³ Cercles d'excision indicateurs de réarrangements des chaînes du TCR, qui sont répartis au hasard entre les cellules filles lors des divisions cellulaires. Leur présence traduit un faible nombre de divisions cellulaires.

cellules MAIT. En effet, chez l'homme, une petite population de thymocytes CD3⁺CD45⁺ DP exprime MR1 (Gold et al., 2012). Chez la souris, les thymocytes DP ont été démontrés comme essentiels pour le développement des MAIT *in vitro* puis *in vivo* grâce à des souris chimériques n'exprimant MR1 que dans des sous-types cellulaires particuliers (Seach et al., 2013). Le développement des iNKT et des MAIT est différent sur d'autres points. Ainsi, les iNKT se développent dans le thymus sous la dépendance de la voie de signalisation SLAM/SAP/Fyn, dont l'engagement potentialise l'engagement du TCR et induit l'expression du facteur de transcription PLZF, responsable de l'acquisition d'un phénotype effecteur (Gapin, 2014; Griewank et al., 2007; Savage et al., 2008). Chez l'homme, l'expression de PLZF semble restreinte aux iNKT et aux cellules MAIT (Savage et al., 2008). Chez un patient déficient pour PLZF, la fréquence des MAIT est réduite, soulignant l'importance de ce facteur de transcription pour leur développement (Eidson et al., 2011). Cependant, les cellules MAIT fœtales issues du thymus ne semblent pas exprimer PLZF (Leeansyah et al., 2014). Dans le modèle C de souris transgénique, PLZF n'est pas exprimé par les cellules MAIT, à l'inverse des iNKT, ce qui corrèle avec leur phénotype naïf (Martin et al., 2009). De même, le développement des MAIT semble indépendant de la voie SLAM/SAP/Fyn, comme démontré par leur fréquence normale dans des individus déficients en SAP (Martin et al., 2009).

L'absence de LB et de ligand exogène dans les cultures d'organe thymique fœtal, ainsi que la présence d'une petite population de MAIT dans des souris transgéniques croisées avec une lignée RAG^{-/-} n'ayant pas de LB suggère que les LB et la flore commensale ne sont pas nécessaires à la sélection des MAIT (Martin et al., 2009). En revanche, les LB et MR1 sont nécessaires pour leur expansion en périphérie, comme le montre la présence de MAIT dans des souris chimériques n'exprimant la β 2-microglobuline que dans les LB, de même que le transfert adoptif de LB dans le modèle C, qui suffit à restaurer le nombre de MAIT. L'importance des LB est aussi confirmée chez l'homme, grâce à des patients mutés pour une enzyme importante dans la maturation des LB. Enfin, les transcrits des cellules MAIT ne sont pas détectés dans des souris "*germ free*" mais le sont lorsque les souris sont reconstituées avec une flore monomicrobale (Martin et al., 2009; Treiner et al., 2003).

Des cellules CD161^{hi}V α 7⁺ sont retrouvées au cours de la vie fœtale dans le thymus, les organes lymphoïdes secondaires, et les sites périphériques (foie/poumon et intestin). Suite à l'étude du phénotype des cellules MAIT dans ces tissus, un modèle a été proposé selon

lequel les cellules, à capacité prolifératrice, se différencieraient de plus en plus au fur et à mesure de leur colonisation en périphérie : augmentation de l'expression de l'IL-18R α , acquisition du facteur de transcription PLZF, augmentation de la fréquence et passage du phénotype CD8 $\alpha\beta$ à CD8 $\alpha\alpha$, acquisition d'un phénotype mémoire (Leeansyah et al., 2014). Les cellules CD8 $\alpha\alpha$ avaient été précédemment démontrées comme pouvant se développer à partir des CD8 $\alpha\beta$ en culture (Walker et al., 2012). Ces données sont tout de même à considérer au vu d'autres études qui trouvent des cellules MAIT – majoritairement des CD8 $^{+}$ – dans le sang de cordon. Ces populations expriment l'IL-18R α et le CD161, mais ont un phénotype naïf (Billerbeck et al., 2010; Dusseaux et al., 2011; Maggi et al., 2010; Martin et al., 2009; Novak et al., 2014; Turtle et al., 2011). Le phénotype des cellules MAIT à la naissance reste donc incertain, et la figure 8 récapitule ces données. Les différences observées entre le sang de cordon et les sites périphériques pourraient être dues à la sélection d'une population CD161 $^{+}$ plutôt que CD161 hi dans certains sites périphériques, mais aussi au fait que le nombre de cellules étudié est globalement très faible.

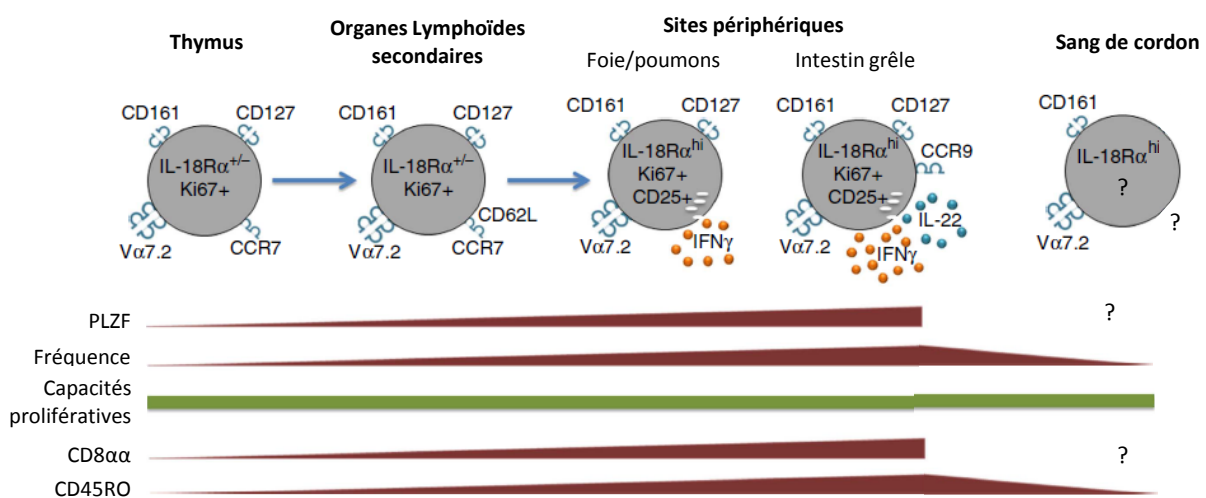


Figure 8 : Caractéristiques des cellules MAIT dans le fœtus et dans le sang de cordon. Figure réalisée à partir de Leeansyah et al., 2014.

Une grande question concernant le développement des MAIT concerne les mécanismes de génération d'un répertoire T restreint, alors que le répertoire est mis en place par des recombinaisons au hasard. On peut penser que la prédominance de ces LT invariants est due à une sélection et à une expansion en périphérie. En comparant les séquences MAIT et iNKT décrites dans la littérature, et en réalisant des simulations informatiques, Greenway et coll. montrent que les séquences canoniques de ces LT invariants correspondent à des

chevauchements entre les sections V α et J α encodées dans le génome, avec parfois seulement une addition (Greenaway et al., 2013; Tilloy et al., 1999; Treiner et al., 2003). De plus, la simulation par ordinateur montre, que parmi les longueurs canoniques, les séquences des TCR invariants sont plus souvent retrouvées. Cela suggère que ces TCR sont produits de façon plus efficace, ce qui assure leur prévalence dans les différents individus et traduit un biais de génération auquel s'additionne ensuite un biais de sélection (Greenaway et al., 2013).

Les différentes données présentées jusqu'à présent montrent donc que les cellules MAIT sont présentes en grande quantité chez l'homme, qu'il existe un biais évolutif important quant à leur conservation, et qu'elles ont des caractéristiques de cellules mémoires sécrétant diverses cytokines. Elles doivent donc avoir une fonction centrale dans l'immunité.

4. L'activité antimicrobienne des cellules MAIT

a. Activité antimicrobienne in vitro

Les premières études suggérant le rôle antimicrobien des cellules MAIT datent de 2010. Ainsi, les cellules MAIT humaines et murines sont activées en présence de CPA infectées par différentes bactéries et levures, suggérant l'implication d'un ligand partagé par ces microorganismes, ou d'un ligand endogène induit par eux (Le Bourhis et al., 2010; Gold et al., 2010). L'activation est dépendante de MR1, comme le prouve l'utilisation d'un anticorps bloquant ou de CPA murines déficientes pour MR1. Les cellules MAIT sont ainsi activées par *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhirium*, *Klebsiella pneumoniae*, par diverses Mycobactéries et Staphylocoques et par certaines levures (*Candida* et *Saccharomyces Cerevisiae*). En revanche, elles ne sont pas activées par différentes bactéries enterococcales ou streptococcales. Les CPA utilisées jusqu'à présent sont majoritairement des cellules épithéliales et hématopoïétiques : cellules épithéliales de poumon, monocytes, DC, macrophages, lignées épithéliales et fibroblastiques, LB primaires ou lignées B, ou encore cellules épithéliales des voies aériennes supérieures (Le Bourhis et al., 2013a; Gold et al., 2010; Harriff et al., 2014; Salerno-Goncalves et al., 2014). Les cellules MAIT peuvent aussi être activées lors de l'ajout d'*E. coli* à des PBMC (Cosgrove et al., 2012; Leeansyah et al., 2013).

Les cellules MAIT, avant la naissance, ont déjà un potentiel de réponse face à des bactéries. En effet, les cellules des sites périphériques sécrètent des cytokines proinflammatoires *in vitro* en présence d'*E. coli* et d'anti-CD28 (Leeansyah et al., 2014). La capacité de réponse des cellules MAIT du thymus est plus controversée (Gold et al., 2012; Leeansyah et al., 2014). Certains auteurs avancent l'hypothèse que ces cellules se développent avant la naissance pour faire face aux nombreux pathogènes auxquels doit faire face le nouveau-né (Leeansyah et al., 2014). A l'inverse des cellules du sang de l'adulte, les cellules CD8⁺CD161^{hi} du sang de cordon prolifèrent *in vitro* en présence d'anti-CD3 (Billerbeck et al., 2010; Dusseaux et al., 2011; Maggi et al., 2010; Turtle et al., 2011).

Sécrétion de cytokines : Suite à la stimulation par des CPA infectées par des bactéries, les cellules MAIT surexpriment CD25 et CD69, et sécrètent de l'IFN γ , du TNF α , et de faibles quantités d'IL-2/4/5/13 (Le Bourhis et al., 2013a; Dusseaux et al., 2011; Gold et al., 2010; Lepore et al., 2014; Reantragoon et al., 2013). Le nombre et la combinaison de cytokines sécrétées semble être variable entre les individus et les infections (Lepore et al., 2014; Salerno-Goncalves et al., 2014). Bien que le phénotype des cellules MAIT soit caractéristique des cellules productrices d'IL-17, elles ne produisent que très peu voire pas d'IL-17 en présence de CPA infectées ou en stimulation par anti-CD3/CD28 (Le Bourhis et al., 2010, 2013a; Dusseaux et al., 2011; Lepore et al., 2014; Miyazaki et al., 2011; Takahashi et al., 2006; Turtle et al., 2011). En revanche, en stimulation PMA/Iono, les MAIT sont les cellules majoritaires produisant de l'IL-17 au sein des LT CD8⁺, en quantité variable selon les études (Annibali et al., 2011; Dusseaux et al., 2011; Lepore et al., 2014; Miyazaki et al., 2011; Reantragoon et al., 2013; Willing et al., 2014). Cela suggère que la stimulation par le TCR n'est pas suffisante et que d'autres signaux sont nécessaires. Ainsi, en stimulation par anti-CD3/CD28, la sécrétion d'IFN γ est potentialisée par l'ajout d'IL-12, d'IL-7 ou d'IL-1 β +IL-23, tandis que la sécrétion d'IL-17 augmente en présence d'IL-7 ou d'IL-1 β , mais l'ajout d'IL18 et/ou d'IL-23 ne suffit pas (Annibali et al., 2011; Dusseaux et al., 2011; Havenith et al., 2012; Tang et al., 2013; Turtle et al., 2011). L'ajout d'IL-12 à la stimulation par anti-CD3/CD28 des cellules CD8⁺CD95⁺CD161^{hi} semble les orienter vers un phénotype Tc1 : perforine⁺GZM-B⁺IFN γ ⁺, avec augmentation de l'expression du facteur de transcription Tbet (Turtle et al., 2011). A noter tout de même que dans un modèle murin (B), les cellules MAIT produisent de l'IL-17 en présence de macrophages infectés par *Mycobacterium bovis* (Chua et al., 2012).

Activation indépendante du TCR ? Ces observations soulèvent la question suivante : les cellules MAIT peuvent-elles s'activer en absence de signal TCR dans un environnement inflammatoire, afin de répondre rapidement à une infection bactérienne ? Les cellules MAIT du sang et du foie, tout comme les iNKT et les LT $\gamma\delta$, produisent de l'IFN γ lorsqu'elles sont stimulées avec de l'IL-12 et de l'IL-18, et cela indépendamment du TCR (Jo et al., 2014; Ussher et al., 2014; Willing et al., 2014). Ces cytokines peuvent être sécrétées par des CPA, notamment les monocytes du sang ou du foie, en présence d'agoniste au TLR8 (Jo et al., 2014; Ussher et al., 2014). Ainsi, les cellules MAIT du sang et du foie sont activées par la lignée monocyttaire THP1 infectée par *E. coli*, de façon dépendante à la fois du TCR et de la sécrétion d'IL-12 et d'IL-18 par les CPA. En revanche, l'activation des cellules MAIT par *Enterococcus faecalis*, ne dépend que de la sécrétion d'IL-12 et d'IL-18 par les THP1, sécrétion pouvant aussi être induite par la stimulation du TLR4 (Jo et al., 2014; Ussher et al., 2014). Cette dernière bactérie n'activait pas les cellules MAIT dans une étude précédente, ce qui peut s'expliquer par des différences de protocole (Le Bourhis et al., 2010). Dans le modèle A de souris transgéniques, l'IL-23 induit la sécrétion d'IL-17 par les MAIT murines (Chiba et al., 2012). Dans le modèle B, la croissance intracellulaire de *Mycobacterium tuberculosis* dans des macrophages est inhibée par les cellules MAIT murines de façon dépendante de l'IL-12 et/ou de l'IL-23 mais indépendante de MR1 (Chua et al., 2012). En revanche, dans le troisième modèle murin (modèle C), les voies des TLR activées habituellement par les bactéries ne suffisent pas à activer les cellules MAIT (Le Bourhis et al., 2010). Ces résultats contradictoires peuvent s'expliquer par des différences de protocole, mais aussi par le fait que les cellules MAIT murines aient un phénotype naïf dans la dernière étude citée.

Des cellules anti-virales ? Ces résultats montrent donc que le microenvironnement peut moduler l'activation des cellules MAIT. Cela suggère qu'elles puissent aussi être activées en cas d'infection virale, notamment par les virus de l'hépatite B ou C qui ont été associés à une production d'IL-12 et d'IL-18 (Ussher et al., 2014). Cependant, des CPA infectées par différents virus (virus de l'Encéphalomyocardite, de la maladie de Newcastle, de l'herpès, Sendai et para-influenza 3) ne semblent activer ni les MAIT murines ni les MAIT humaines (Le Bourhis et al., 2010). Les cellules V α 7.2⁺CD161⁺ isolées avec des tétramères portant des peptides de l'EBV sont en trop faibles quantités pour affirmer qu'il ne s'agit pas de marquage

non spécifique (Dusseaux et al., 2011). Il semble donc que les cellules MAIT ne reconnaissent pas d'Ag viral, mais rien n'empêche que des cytokines sécrétées en cas d'infection virale les activent indépendamment du TCR.

Des cellules cytotoxiques : En plus de la sécrétion de cytokines, les cellules MAIT ont la capacité de lyser les cellules cibles infectées. Cela a été montré chez l'homme, les cellules MAIT étant capables de lyser des cellules d'une lignée épithéliale surexprimant MR1 préalablement mises en contact d'*E. coli* (Le Bourhis et al., 2013a). En stimulation par anti-CD3/CD28, les cellules MAIT sécrètent de fortes quantités de GZM, ainsi que de la perforine, du CD107a et un peu de granulysine (Le Bourhis et al., 2013a; Dusseaux et al., 2011).

Les fonctions effectrices des cellules MAIT sont résumées dans la figure 9 ci-dessous.

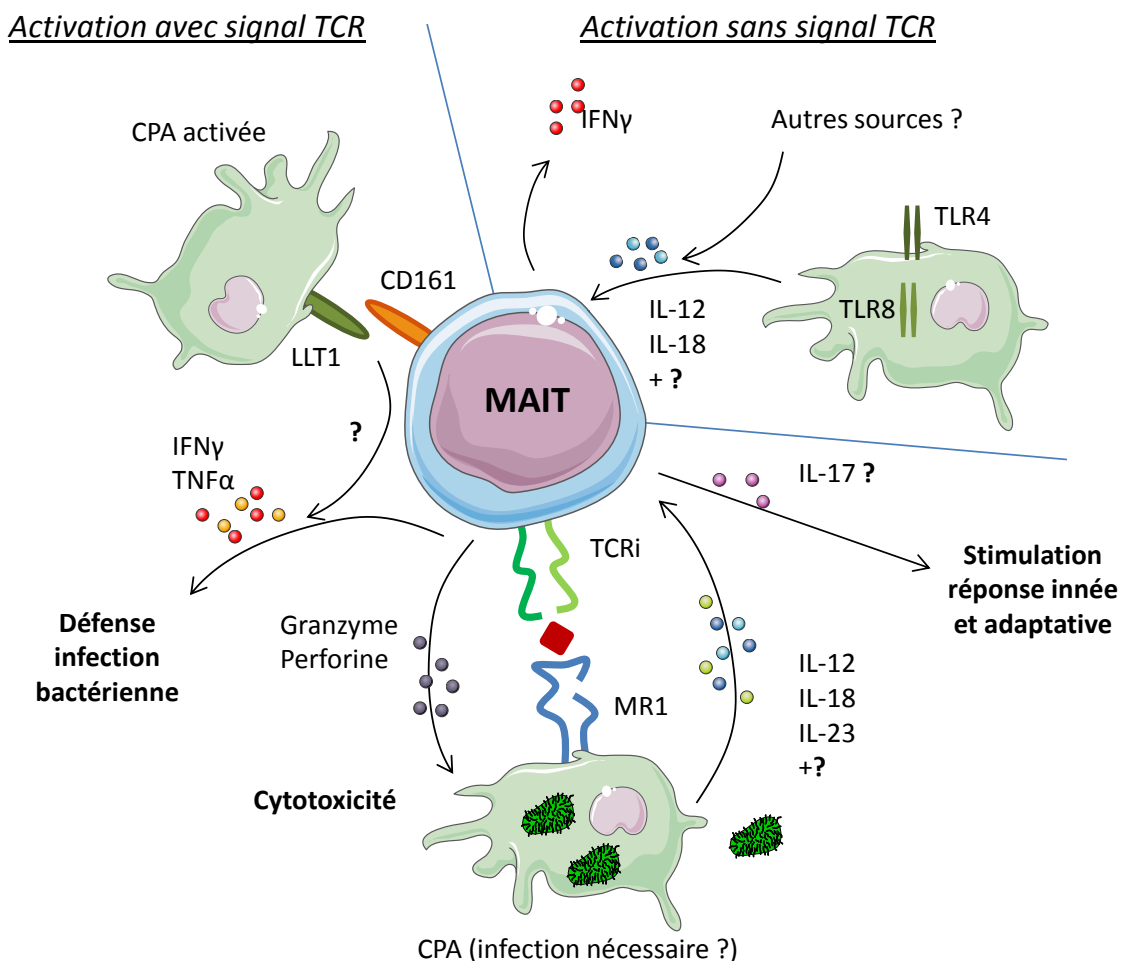


Figure 9 : Fonctions des cellules MAIT. Les cellules MAIT peuvent être activées de façon dépendante du TCR, et sécrètent alors des cytokines pro-inflammatoires ainsi que des médiateurs de la cytotoxicité. Cette activation peut-être potentialisée par des cytokines telles que l'IL-12/18/23, produites notamment par les CPA. L'effet de l'engagement de CD161 est peu clair. En parallèle, il semble aussi que les cellules MAIT peuvent être activées en présence seule de cytokines pro-inflammatoires, sécrétées notamment par des cellules activées via les TLR.

b. *Activité antimicrobienne in vivo*

Chez la souris : L'implication des cellules MAIT dans la défense contre les pathogènes a aussi été démontrée *in vivo*. Ainsi, les souris iV19 transgéniques (modèle C) déficientes pour MR1 contrôlent moins l'infection par *E. coli* ou *Mycobacterium Abscessus* (Le Bourhis et al., 2010). Les souris C57BL/6 MR1^{-/-} contrôlent l'infection à *E. coli*, *Yersinia enterocolitica* et *Shigella dysenteriae*, mais pas celle à *Klebsiella pneumoniae*, en association à une production cytokinique systémique réduite en IL-1 β , TNF α , IL-17, MIP- α et IL-6 (Georgel et al., 2011). Chez ces même souris, les cellules MAIT ont un rôle dans le contrôle précoce de la croissance de *Mycobacterium bovis*, et des tests *in vitro* suggèrent que l'activation des cellules MAIT soit plus dépendante de l'IL-12 que de l'interaction via MR1 (Chua et al., 2012). Dans un modèle d'infection pulmonaire à *Francisella Tularensis* chez des souris C56BL/6, une population DN apparaît dans les poumons 14 jours après l'infection. Cette population, absente des souris MR1^{-/-}, correspond à des cellules MAIT et est 25 fois plus importante qu'en conditions de repos (Meierovics et al., 2013). Ces cellules permettent le contrôle précoce de l'infection en association avec une production de TNF α , d'IL17-A, d'IFN γ et de l'oxyde nitrite synthase inductible, importante pour la cytotoxicité. Elles permettent aussi le recrutement de LT CD4⁺ et CD8⁺ activés producteurs d'IFN γ au niveau des poumons afin d'assurer le contrôle à long terme de l'infection (Meierovics et al., 2013). Un test *in vitro* de contrôle de la croissance de *Francisella Tularensis* dans des macrophages dérivés de la moelle osseuse montre que les cellules MAIT naïves s'activent grâce à l'interaction avec MR1 et au signal soluble IL-12p40 par les macrophages infectés (Meierovics et al., 2013).

Chez l'homme : Chez l'homme, il est difficile d'impliquer directement les cellules MAIT dans la défense contre les infections, mais différents arguments vont dans ce sens. En effet, par rapport à des volontaires sains, les cellules MAIT sont présentes en moins grande quantité dans le sang de patients atteints de tuberculose (d'autant plus qu'elle est active) ou de pneumopathies liées à des bactéries (Le Bourhis et al., 2010; Jiang et al., 2014; Wong et al., 2013). Chez ces patients infectés, les cellules MAIT du sang produisent plus d'IFN γ en réponse au BCG mais pas à *E. Coli*, et présentent un phénotype plus sensible à l'apoptose induite par les bactéries (Jiang et al., 2014). La diminution périphérique est associée à une présence de cellules CD3⁺V α 7⁺IL18R α ⁺ dans des lésions pulmonaires de deux patients infectés par *Mycobacterium tuberculosis* (Le Bourhis et al., 2010). De même, la fréquence et

le nombre absolu de cellules MAIT sont diminués dans le sang de 113 patients sévèrement infectés (sepsis ou choc septique), mais de façon moins importante chez les patients infectés avec une souche streptococcace, décrite comme n'activant pas les cellules MAIT. Cette diminution est retrouvée dans une moindre mesure chez des patients sévèrement malades en dehors de toute infection bactérienne (choc cardiogénique principalement). En revanche, elle n'est pas retrouvée chez les patients infectés par un virus (Grimaldi et al., 2014). Dans un essai clinique visant à estimer l'efficacité d'un vaccin contenant une souche atténuée de *Shigella dysenteriae*, les cellules MAIT semblent diminuées en fréquence dans le sang des volontaires sains ayant reçu le vaccin (Le Bourhis et al., 2013a). Enfin, les cellules MAIT sont plus activées (expression de CD38) chez les patients infectés par *Vibrio cholerae*, responsable du choléra, associé à une diminution de fréquence dans le sang des enfants seulement (Leung et al., 2014). Ces données sont résumées dans le tableau 3 en fin d'introduction.

Modèle : En conclusion, certains auteurs proposent le modèle suivant. En dehors de toute infection, les cellules MAIT pourraient participer au contrôle de la flore commensale, en modulant la fonction des CPA, l'homéostasie des cellules épithéliales, ou en sécrétant des molécules antimicrobiennes. Lors d'une infection, les cellules MAIT peuvent lyser les cellules épithéliales infectées. Dans le cas où l'infection se propage, les CPA sécrètent diverses cytokines pro-inflammatoires (IL-12/18/23) et présentent des Ags aux MAIT qui, en retour, produisent notamment de l'IFN γ , qui empêche la croissance intracellulaire des bactéries, et de l'IL-17 afin de stimuler les réponses innées et adaptatives (Le Bourhis et al., 2011, 2013a; Chua et al., 2012). L'engagement de CD161 pourrait permettre de réguler l'activation des cellules MAIT, mais son rôle reste confus, étant donné que les différentes études s'intéressant à l'engagement de CD161 sur les LT utilisent quasiment toutes différents anti-CD161. Ainsi, l'engagement de CD161 peut stimuler la sécrétion d'IFN γ par les LT en présence de LB activés (Germain et al., 2011). De plus, la stimulation par anti-CD3/anti-CD161 entraîne la sécrétion d'IFN γ par les CD8⁺CD161^{hi} (Annibali et al., 2011). A l'opposé, l'engagement de CD161 peut inhiber, lors d'une stimulation par anti-CD3/CD28, la sécrétion d'IFN γ , de TNF α et d'IL-2 par les CD8⁺CD161⁺ et par les MAIT, bien qu'il n'inhibe pas les capacités cytotoxiques de ces dernières (Le Bourhis et al., 2013a; Germain et al., 2011; Rosen et al., 2008). L'implication de CD161 reste donc très floue, mais doit d'une façon ou

d'une autre moduler l'activation des cellules MAIT, d'autant plus que les CPA activées surexpriment LLT1, un de ses ligands (Le Bourhis et al., 2013a).

Il semble donc clair que les cellules MAIT ont des propriétés antimicrobiennes, mais comment reconnaissent-elles les bactéries ? Quels sont les ligands présentés par MR1 qui permettent de les activer ?

5. MR1

Décrit pour la première fois en 1995, MR1 est une molécule de CMH-I encodée en dehors du locus du CMH, sur le chromosome 1 (Hashimoto et al., 1995). Tout comme les molécules de CMH-I classiques, MR1 présente trois domaines extracellulaires ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$), un domaine transmembranaire et un domaine cytoplasmique (Hashimoto et al., 1995). Différentes isoformes ont été décrites chez l'homme et la souris, et toutes sont exprimées en quantité importante, ce qui est rare parmi les molécules de CMH (Riegert et al., 1998). La majorité des études se sont intéressées à l'isoforme MR1A, seule qui présente le domaine $\alpha 3$ (Lion et al., 2013).

a. Conservation

Les transcrits de MR1 ont été décrits dans de nombreuses espèces : humains, primates non humains, rats, bovins, ovins, marsupiaux (Goldfinch et al., 2010; Huang et al., 2009; Parra-Cuadrado et al., 2001; Tsukamoto et al., 2013; Walter and Günther, 1998). Une cross-réactivité importante est observée entre les espèces, certainement expliquée par une conservation de séquence très élevée (Riegert et al., 1998). Ainsi, les MR1 de bovin et de rat activent des hybridomes MAIT de souris, et les cellules MAIT murines et humaines sont activées par leurs orthologues (Le Bourhis et al., 2010; Huang et al., 2009). A noter que MR1 semble monomorphique chez l'homme (Parra-Cuadrado et al., 2000; Riegert et al., 1998). Cette importante conservation, tout comme celle des cellules MAIT au sein des mammifères, suggère une pression de sélection forte, certainement sous-tendue par les fonctions remplies par ces cellules.

b. Expression de MR1

Les transcrits de MR1 ont été identifiés dans de nombreux types cellulaires (lignées T et B, cellules épithéliales) et tissus, notamment dans le cerveau murin mais pas humain (Hashimoto et al., 1995; Riegert et al., 1998; Yamaguchi et al., 1997). En revanche,

l'expression de MR1 à la surface de cellules reste controversée. En plus de l'expression sur les thymocytes DP, MR1 a été détecté par différents anticorps à la surface des macrophages et des DC murins (Chua et al., 2011; Gold et al., 2012). Cependant, des marquages sur de l'intestin humain suggèrent que ni les DC, ni les monocytes/macrophages n'expriment MR1 (Chua et al., 2011; Gozalbo-López et al., 2009). Bien que leur marquage ne soit pas des plus convaincants, les auteurs proposent que des cellules CD38⁺ et CD138⁺ (plasmocytes ou plasmablastes) l'expriment dans l'intestin (Gozalbo-López et al., 2009).

Cette faible détection pourrait s'expliquer par une expression transitoire à la surface cellulaire, éventuellement stabilisée en présence d'un ligand. La génération d'un anticorps qui augmente à la fois l'expression de MR1 murin à la surface et l'activation des cellules MAIT confirme en partie de cette hypothèse (Chua et al., 2011). De plus, l'expression de MR1 sur des thymocytes de souris est très légèrement sur-réglée après 4h de contact avec du surnageant de culture d'*E. coli* (Seach et al., 2013). Enfin, chez l'homme, l'expression de MR1 sur des lignées dérivées de LB ou d'entérocytes, ainsi que sur des LB primaires, est augmentée lors de l'infection par différentes bactéries entériques commensales et pathogéniques (Salerno-Goncalves et al., 2014). Sans infection, ces cellules expriment autant de MR1 intracellulaire que les cellules infectées, suggérant que la présence du ligand augmente le trafic ou stabilise la molécule à la surface, ce qui peut s'avérer important pour la régulation de l'activation des cellules MAIT (Salerno-Goncalves et al., 2014; Seach et al., 2013).

c. Chargement de MR1 et présentation à la surface

Chez l'homme comme chez la souris, les molécules MR1 immunoprécipitent avec la β 2-microglobuline, suggérant la formation d'un dimère semblable à celui formé par le CMH-I classique (Lion et al., 2013; Miley et al., 2003; Yamaguchi and Hashimoto, 2002; Yamaguchi et al., 2014). Les molécules impliquées dans les voies de présentation classiques des CMH-I et II ne semblent pas nécessaires pour l'expression de MR1 et la différenciation des MAIT (Abós et al., 2011; Le Bourhis et al., 2010; Gold et al., 2010; Huang et al., 2008; Treiner et al., 2003). En revanche, MR1A coprécipite avec certaines de ces molécules dans des cellules transfectées humaines et murines, suggérant que différents processus puissent exister (Lion et al., 2013; Miley et al., 2003).

Une question en suspens est la nécessité d'une infection ou d'une phagocytose pour la présentation par MR1. En effet, les cellules MAIT sont activées de manière dépendante de MR1 par des CPA en présence de surnageant de culture bactérienne ou de composés de synthèse, mais aussi en présence de bactéries non invasives comme *E. coli* (Le Bourhis et al., 2013a; Kjer-Nielsen et al., 2012; Reantragoon et al., 2012). Cependant, les CPA utilisées surexpriment toutes MR1. En absence de surexpression de MR1, les cellules MAIT murines ne sont pas activées par des CPA traitées par des inhibiteurs de la phagocytose, de l'endocytose ou de l'acidification des endosomes, ce qui laisse supposer que ces mécanismes sont nécessaires à la présentation par MR1 (Le Bourhis et al., 2010; Huang et al., 2008). D'autres études sont donc nécessaires pour répondre à cette question.

d. Présentation

L'identification de (ou des) l'Ag(s) activant les cellules MAIT en contexte MR1 est essentielle afin de mieux comprendre la fonction de ces cellules. En parallèle avec les cellules iNKT, un groupe a proposé que les cellules MAIT murines reconnaissent des composés synthétiques comme l' α -mannosyl ceramide et les glycolipides terminés par des résidus α -mannosyl non réductibles (Okamoto et al., 2005; Shimamura et al., 2007a, 2007b). Ces composés peuvent faire partie des lipides composant la surface cellulaires de certains microorganismes pathogènes, bien que cela n'ait pas été formellement démontré.

Tous les microorganismes activant les cellules MAIT possèdent la voie de synthèse de la riboflavine (Vitamine B2), ce qui n'est pas le cas des mammifères. En 2012, des données ont montré que MR1 pouvait se replier en présence de 6-FP (6-formyl-pterin) sans pour autant induire l'activation des MAIT, suggérant que cette molécule possède les caractéristiques structurales pour se lier à MR1 (figure 10). Des dérivés métaboliques de la riboflavine présentant des caractéristiques structurales semblables, le RL-6,7-diMe, le RL-6-Me-7-OH et le rRL-6-CH₂OH, induisent l'expression de CD69 à la surface des MAIT de façon dépendante de MR1 (Kjer-Nielsen et al., 2012). L'origine du rRL-6-CH₂OH, qui induit une activation des cellules MAIT bien plus forte que le RL-6,7-diMe et le RL-6-Me-7-OH, est cependant obscure, car ne correspond à aucun intermédiaire de la voie de synthèse de la riboflavine. Récemment, l'utilisation de souches bactériennes déficientes pour différentes enzymes de la voie de synthèse de la riboflavine a montré qu'un intermédiaire, le 5-A-RU, bien que non activateur des MAIT, était important dans la génération de l'Ag activateur (figure 10).

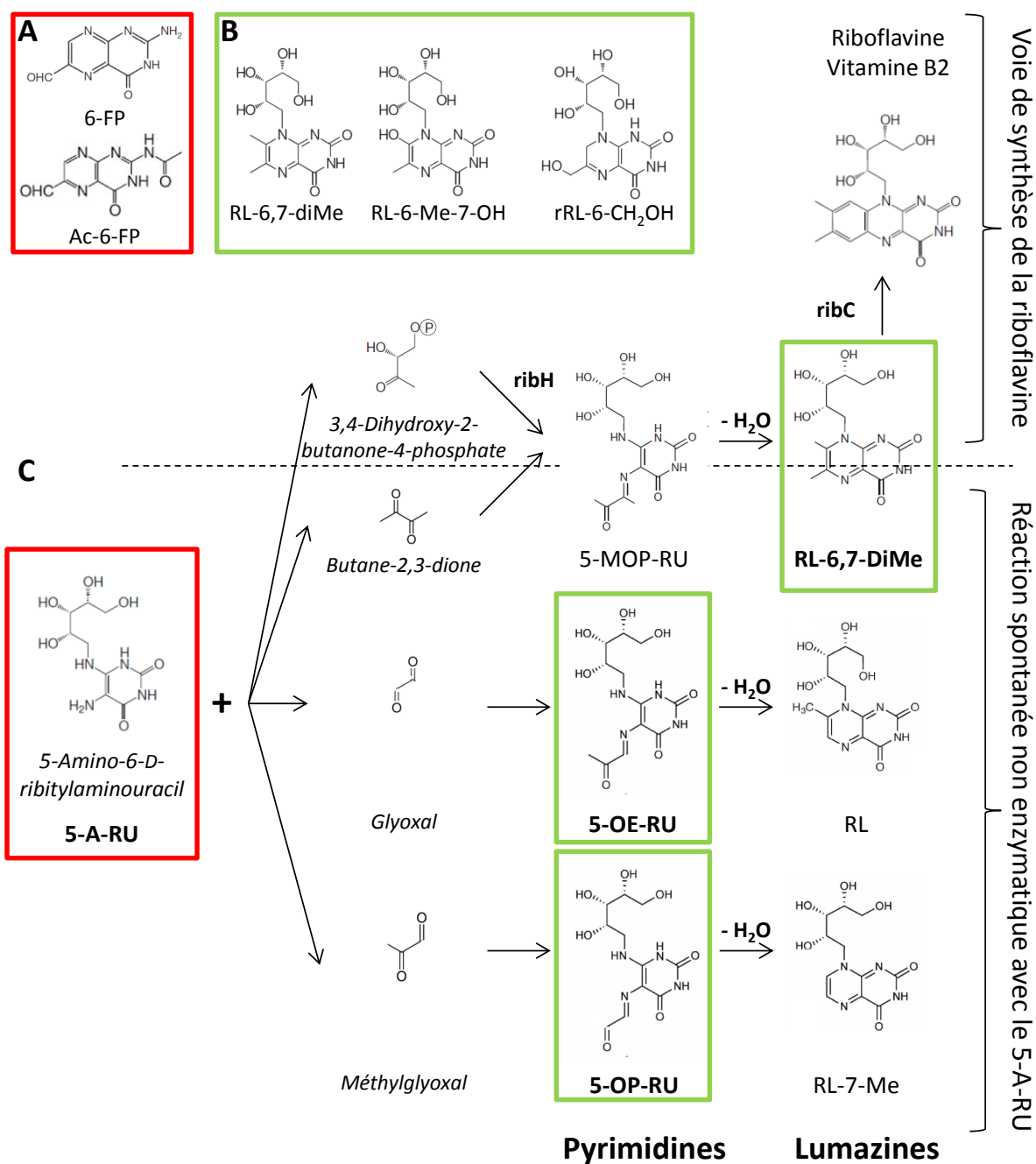


Figure 10 : Structure et génération des ligands de MR1 activant (vert) ou non (rouge) les cellules MAIT. (A-B) Ligands de MR1 activateurs (encadré vert) ou non (encadré rouge) des cellules MAIT. (C) Le 5-A-RU, généré lors de la synthèse de la riboflavine, peut se condenser avec des métabolites pour former des adduits stabilisés et présentés par MR1 aux MAIT (5-OE-RU et 5-OP-RU), en dehors de toute action enzymatique. Le 5-MOP-RU, généré par condensation du 5-A-RU dans le cadre ou non de la voie de synthèse de la riboflavine, est le précurseur du RL-6,7-DiMe activateur des cellules MAIT.

Ce composé peut, sans nécessiter d'action enzymatique, s'associer avec des composés d'autres voies métaboliques comme le glyoxal et le méthylglyoxal, générant ainsi des adduits¹⁴ comme le 5-OE-RU et le 5-OP-RU (intermédiaire de synthèse du rRL-6-CH₂OH). Ces

¹⁴ Un adduit résulte de l'addition de deux molécules sans réaction enzymatique nécessaire

adduits, instables en condition acides et aqueuses, peuvent être piégés et stabilisés par MR1, notamment grâce à la création d'une liaison covalente réversible (base de Schiff). Ils ont été isolés des surnageant de bactéries activatrices des cellules MAIT (Corbett et al., 2014). Toutes les cellules MAIT semblent avoir la capacité de reconnaître ces Ags, car elles peuvent être toutes isolées avec un tétramère MR1 les présentant (Corbett et al., 2014; Reantragoon et al., 2013). Très récemment, un autre composé, le Ac-6-FP, a été montré comme capable de se loger dans le sillon de MR1, de façon plus forte que le 6-FP, mais sans activer pour autant les cellules MAIT (Eckle et al., 2014). Ces données, ainsi que d'autres qui montrent que les différents segments J α , V β ainsi que CDR3 du TCR MAIT sont utilisés différemment entre les individus en fonction des infections, confirme donc la plasticité de MR1 et du TCR des cellules MAIT, entraînant des reconnaissances d'affinité variable et donc une régulation de l'activation de ces cellules en fonction de l'environnement infectieux (Eckle et al., 2014; Gold et al., 2014).

La question d'un Ag endogène reste cependant en suspens. En effet, des hybridomes MAIT de souris peuvent sécréter de l'IL-2 en présence de CPA en présence ou non de bactéries dans le milieu (Huang et al., 2008, 2009; Young et al., 2013). De plus, les cellules MAIT sont sélectionnées dans le thymus en absence de dérivés métaboliques de la riboflavine (Le Bourhis et al., 2011; Gold et al., 2012). Bien sûr, il se peut que cette sélection se fasse grâce à un MR1 vide, cependant, il semble qu'un ligand soit indispensable au repliement de MR1 et à l'activation des cellules MAIT (Corbett et al., 2014). D'autres travaux seront nécessaires pour répondre à cette question.

e. Structure/reconnaissance structurale

Différentes études se sont attelées à définir les caractéristiques structurales de l'interaction TCR MAIT-MR1. Le TCR MAIT se place de façon centrale et perpendiculaire à MR1, en une orientation déjà décrite pour d'autres TCR classiques, mais différente de l'interaction TCR iNKT avec CD1d. La chaîne α du TCR domine les interactions avec MR1, en une architecture encodée seulement par les chaînes du TCR MAIT et aucune des autres V α ou J α (Kjer-Nielsen et al., 2012; López-Sagaseta et al., 2013; Patel et al., 2013; Reantragoon et al., 2013). De façon intéressante, les zones de contact entre les chaînes β du TCR et MR1 ne sont pas conservées entre les chaînes β préférentielles, suggérant que le biais observé se fasse par préférence d'appariement avec V α 7.2 (Patel et al., 2013). La majorité des interactions

chaîne β -MR1 vient du CDR3, qui n'est pas encodé par le génome, suggérant donc un rôle primordial dans la reconnaissance et l'affinité (Patel et al., 2013).

6. Les cellules MAIT chez les volontaires sains

De nombreuses études ont donc décortiqué le rôle des cellules MAIT, ainsi que les ligands qui les activent. En parallèle, ces cellules ont été caractérisées chez l'homme, chez des volontaires sains, et leur implication dans différentes maladies a aussi été étudiée.

La fréquence des cellules $CD161^{hi}V\alpha 7^{+}$ en périphérie varie entre 1 et 10%, selon les individus, mais la majorité des études observe une fréquence moyenne entre 3 et 5%. Deux études se sont intéressées aux cellules MAIT dans le sang de témoins, en utilisant des cohortes de 100 et 133 personnes (Lee et al., 2014; Novak et al., 2014). La fréquence et le nombre absolu de cellules MAIT en circulation atteint un maximum vers 30-40 ans mais diminue ensuite avec l'âge (surtout les cellules MAIT $CD8^{+}$, alors que les cellules MAIT $CD4^{+}$ ont tendance à augmenter), ce qui n'est le cas ni pour les iNKT, ni pour les $LT\gamma\delta$. Cette diminution avec l'âge, tout comme la large gamme de fréquence des MAIT observée dans le sang, cadre bien avec l'hypothèse selon laquelle la fréquence des cellules MAIT reflèterait la charge infectieuse : en conséquence d'infections persistantes, les cellules MAIT engagées finiraient par subir une apoptose, menant au déclin de la population MAIT totale. Cette hypothèse a été mise en place suite à l'observation que, chez des individus du Zimbabwe rural, les MAIT sont 10 fois plus rares que dans les études effectuées dans les pays développés (Le Bourhis et al., 2013b).

Bien qu'il n'y ait pas de différence globale de fréquence entre hommes et femmes, la fréquence de cellules MAIT est augmentée chez les femmes dans la fourchette 15-50 ans (Novak et al., 2014). Tout au long de la vie, la majorité des cellules MAIT sont mémoires (Novak et al., 2014), mais avec l'âge, elles semblent évoluer d'un profil Th1 à un profil Th2, couplé à une augmentation de la sécrétion d'IL-4 dans les MAIT $CD8^{+}$ (Lee et al., 2014).

7. Les cellules MAIT dans les maladies non microbiennes

Les cellules MAIT sont des cellules à fort potentiel pro-inflammatoire en dehors d'une activation spécifique. Il est donc difficile de comprendre leur implication exacte dans différentes pathologies. Ont-elles un rôle spécifique à la maladie ? Leur population et leur phénotype varie-t-il plutôt en fonction du contexte inflammatoire de l'individu malade ? Le

tableau en fin d'introduction résume les observations faites quant à la quantité des cellules MAIT circulantes dans différentes maladies.

a. Implication dans les cancers et les infections virales

La fréquence de cellules MAIT est augmentée dans le sang de patients avec un mélanome par rapport aux contrôles (Eidson et al., 2011). Par ailleurs, des transcrits de cellules MAIT ont été retrouvés dans des tumeurs rénales et cérébrales (Peterfalvi et al., 2008). De plus, beaucoup de cellules MAIT ont été décrites dans quelques lymphomes T périphériques, suggérant que ces lymphomes dérivent de ces cellules (McGregor et al., 2014).

Plusieurs études se sont intéressées à l'implication des cellules MAIT dans l'infection par le HIV (Virus de l'Immunodéficience Humaine) (Cosgrove et al., 2012; Greathead et al., 2014; Leeansyah et al., 2013; Wong et al., 2013). La fréquence des cellules MAIT dans le sang est diminuée chez ces patients par rapport aux témoins, d'autant plus que l'infection est aiguë, et le traitement ne restaure pas la quantité de cellules MAIT circulantes. La diminution est observée très tôt après l'infection, que ce soit 2-3 semaines ou 6 mois (Cosgrove et al., 2012; Wong et al., 2013). On ne peut ici définir si cette faible fréquence de cellules MAIT est une prédisposition ou une conséquence de l'infection. Il semble y avoir une corrélation entre la durée de la maladie et la baisse de cellules MAIT circulantes (Leeansyah et al., 2013) mais pas avec la charge virale (Wong et al., 2013), suggérant que l'infection en elle-même ne soit pas responsable de cette diminution. En effet, le VIH n'infecte pas préférentiellement les $CD8^+CD161^{hi}$ par rapport aux $CD8^+CD161^+$ *in vitro* (Cosgrove et al., 2012). Cependant, chez les patients par rapport aux témoins, les cellules MAIT sanguines sécrètent moins d'IFN γ , de TNF α et d'IL-17 en réponse à une coculture avec des *E. coli* fixées en paraformaldéhyde, suggérant ainsi un phénotype déficient chez les patients infectés (Leeansyah et al., 2013). Afin d'expliquer cette baisse en périphérie, les auteurs proposent une migration des cellules vers l'intestin ou le colon, qui sont des lieux importants d'infection au début de la maladie. Les quantités de MAIT observées dans le colon sont variables, d'autant plus que les techniques et les marquages utilisés ne sont pas les mêmes. La fréquence des MAIT dans le colon est ainsi retrouvée diminuée dans deux études, avec un effet variable du traitement (Cosgrove et al., 2012; Greathead et al., 2014). La troisième étude ne retrouve pas de diminution dans le colon, mais observe dans le sang l'augmentation d'une population $CD161^-V\alpha 7.2^+IL-18R\alpha^+$ possédant les mêmes marqueurs et caractéristiques fonctionnelles que les

cellules MAIT CD161^{hi}Vα7.2⁺IL-18Rα⁺. Les auteurs proposent que chez les patients HIV, l'expression de CD161 soit diminuée chez les MAIT, générant ainsi une population hyper-activée (Leeansyah et al., 2013). Cette hyper-activation pourrait mener progressivement à la déplétion en cellules MAIT, dans le sang ou aux lieux d'inflammation (Cosgrove et al., 2012; Leeansyah et al., 2013). En ce qui concerne d'autres infections virales, les CD8⁺CD161^{hi} sont diminués dans le sang de patients infectés par le virus de l'hépatite C, mais toujours présents en grande quantité dans leur foie (Billerbeck et al., 2010).

b. Implication dans l'auto-immunité

De la même façon, de nombreuses études se sont intéressées aux cellules MAIT dans différentes maladies auto-immunes. Dans les lésions de psoriasis, les LT CD8⁺ produisant de l'IL-17 sont majoritairement des LT conventionnels non MAIT, alors que les cellules MAIT sont majoritaires dans le sang (Teunissen et al., 2014). Cela suggère que les cellules MAIT ne sont que peu voire pas impliquées dans la maladie. En revanche, leur quantité est diminuée dans le sang de patients atteints de lupus, d'arthrite rhumatoïde ou d'adultes atteints de maladie cœliaque (Annibali et al., 2011; Dunne et al., 2013; Eidson et al., 2011). C'est aussi le cas chez les patients atteints de Crohn ou de rectocolite hémorragique, principalement au sein des cellules MAIT CD8⁺, et indépendamment du traitement ou de l'activité de la maladie (Serriari et al., 2014). Ces cellules migrent-elles au niveau des sites inflammatoires, comme décrit pour la tuberculose (Le Bourhis et al., 2010) ? Les auteurs observent une diminution de la fréquence des cellules MAIT dans l'épithélium et la lamina propria de l'intestin chez patients atteints de maladie cœliaque par rapport aux témoins (Dunne et al., 2013). En revanche, dans le cas de la maladie de Crohn, les cellules MAIT - ou du moins les cellules CD3⁺Vα7.2⁺ au vu du protocole - semblent s'accumuler dans l'iléon inflammé (Serriari et al., 2014). La question de la migration vers les sites inflammatoires reste donc en suspens. Dans le sang, chez les patients atteints de Crohn ou de rectocolite hémorragique, les cellules MAIT expriment plus de Ki67, de NKG2D et de CD272 (ou BTLA, *B- and T-lymphocyte Attenuator*), suggérant un phénotype activé *in vivo*, tout comme les populations CD8⁺ TCRαβ et TCRγδ (Serriari et al., 2014). De plus, lors d'une activation *in vitro* en PMA/Iono, les cellules MAIT des patients sécrètent moins d'IFNγ mais plus d'IL-17 (et aussi plus d'IL-22 pour les patients atteints de rectocolite hémorragique) (Serriari et al., 2014). Ces données suggèrent donc que les cellules MAIT aient un phénotype et/ou une localisation différente dans certaines

maladies auto-immunes, mais ne permettent pas de déterminer si elles ont une implication spécifique dans la maladie.

L'étude des cellules MAIT périphériques dans la SEP a généré diverses hypothèses, mais surtout diverses interrogations quant à leur implication dans la maladie. Contrairement aux transcrits de iNKT, ceux des MAIT ne sont pas diminués dans le sang des patients par rapport aux témoins (Illés et al., 2004). Cependant, trois études plus récentes trouvent des résultats contradictoires. Ainsi, par cytométrie, une équipe italienne souligne une augmentation de la fréquence des cellules $CD8^+CD161^{hi}$ dans le sang des patients par rapport aux témoins, corrélée à la durée de traitement (Annibali et al., 2011). En parallèle, une équipe japonaise observe une diminution des cellules MAIT dans le sang des patients, et ce d'autant plus que les patients sont en poussée ou en phase active de la maladie (Miyazaki et al., 2011). Enfin, une équipe allemande observe une diminution des cellules $CD161^{hi}CD45RA^-CD8^+$ chez les patients, sans différence entre les patients en poussée et ceux en rémission (Willing et al., 2014). Il est difficile d'expliquer ces résultats variables, les cohortes de patients étant similaires en termes de traitement et de forme de maladie. L'hypothèse la plus probable ici est donc celle de différences majeures en termes de génétique mais aussi de flore microbienne intestinale, indispensable pour le développement des cellules MAIT. A noter tout de même, aucune de ces trois études n'utilise les mêmes marqueurs, et pour la première, les âges moyens des patients et des témoins diffèrent d'environ 10 ans. La question de la fréquence des cellules MAIT dans le sang des patients SEP reste donc en suspens. La SEP étant une maladie du SNC, peut-on retrouver les cellules MAIT au niveau des lésions ? Chez les volontaires sains comme chez les patients SEP, ces cellules expriment diverses molécules de homing, tels que CCR5, CCR6 et $\alpha4\beta1$, leur permettant ainsi de migrer vers les tissus inflammés (Annibali et al., 2011; Miyazaki et al., 2011; Willing et al., 2014). Des transcrits de cellules MAIT sont retrouvés dans la moitié des échantillons autopsiques de cerveau étudiés, et dans plus de 70% des LCR de patients en poussée (Illés et al., 2004). L'absence de transcrits non spécifiques $V\alpha19$, pourtant présents dans le sang, suggère que la présence des MAIT n'est pas représentative d'une invasion non spécifique de LT (Illés et al., 2004). Des cellules MAIT $CD161^+V\alpha7.2^+$ ont été retrouvées dans les lésions cérébrales de neuf patients atteints de SEP progressive, ces cellules représentant *a priori* 17 et 8% des cellules $CD161^+$ dans les infiltrats de la substance blanche et des méninges, respectivement (Abrahamsson et

al., 2013). Tout récemment, une étude a observé des cellules MAIT CD8⁺ dans des lésions aiguës et chroniques actives de patients SEP, ces cellules représentant environ 5% des cellules CD8⁺ infiltrantes (Willing et al., 2014). Les auteurs proposent que cette infiltration soit liée à l'activation des cellules MAIT en périphérie par l'IL-18, comme suggéré par la corrélation négative entre la quantité d'IL-18 dans le sérum de patients et la fréquence de cellules MAIT dans le sang. L'absence de cellules MAIT dans le LCR suggère qu'elles empruntent d'autres voies d'entrée dans le SNC (Willing et al., 2014). Qu'en est-il de la fonction de ces cellules chez les patients SEP ? Comme chez les témoins, les cellules MAIT du sang de patients ont des caractéristiques de cellules effectrices mémoires (Annibali et al., 2011; Miyazaki et al., 2011; Willing et al., 2014). La capacité des cellules MAIT à sécréter des cytokines après activation en CD3/CD28 ou en PMA/Iono est la même chez les patients et les témoins (Abrahamsson et al., 2013; Annibali et al., 2011; Miyazaki et al., 2011). En revanche, et contrairement à la fonction pro inflammatoire proposée dans de nombreuses études précédentes, l'équipe japonaise propose que ces cellules aient plutôt un rôle régulateur. En effet, les PBMC totaux produisent plus d'IFN γ en présence de phytohémagglutinine lorsque les cellules MAIT sont déplétées (Miyazaki et al., 2011).

L'implication exacte des cellules MAIT dans la physiopathologie des maladies auto-immunes reste donc obscure : ont-elles rôle spécifique ? Un rôle pathogénique (cytokines pro-inflammatoires) ou protecteur (IL-22) ?

Les modèles animaux peuvent aider à répondre à certaines de ces questions. Ainsi, deux modèles d'arthrite ont été étudiés chez la souris : l'arthrite induite par le collagène et l'arthrite induite par des anticorps anti-collagène. Les souris MR1^{-/-} développent une arthrite moins sévère que les souris MR1^{+/+}. De plus, le transfert adoptif de TCR β ⁺ NK1.1⁺ de souris CD1d^{-/-} chez des souris MR1^{-/-} aggrave la maladie dans le modèle B, ce qui n'est pas le cas du transfert de LT (Chiba et al., 2012). Ces données suggèrent un rôle pathologique des cellules MAIT dans l'arthrite. L'EAE classique (MOG₃₅₋₅₅) est réduite et apparaît plus tardivement chez des souris transgéniques surexprimant les cellules iV α 19⁺, ainsi que chez des souris MR1^{+/+} par rapport aux MR1^{-/-}, et aussi lors du transfert de cellules TCR β ⁺NK1.1⁺ chez des souris sauvages (Croxford et al., 2006b). Ces données suggèrent que, contrairement à l'arthrite, les cellules MAIT aient un rôle régulateur dans l'EAE. *In vitro*, chez les souris surexprimant les cellules iV α 19 (modèle A), les cellules des ganglions lymphatiques restimulées par la MOG₃₅₋

⁵⁵ ont un défaut de production d'IFN γ et de TNF α , mais produisent plus d'IL-10 (Croxford et al., 2006b). Cet IL-10 est produit au moins en partie par des LB, de façon indépendante de MR1 (Croxford et al., 2006b). Les auteurs avancent l'idée que l'IL-10 serait nécessaire pour limiter l'inflammation de l'intestin face à la flore commensale. Les différences importantes qu'il existe entre les cellules MAIT des modèles animaux existants et de l'homme rend cependant difficile l'extrapolation aux maladies humaines.

En conclusion, d'autres études sont nécessaires afin de comprendre l'implication des cellules MAIT dans les maladies auto-immunes, et notamment dans la SEP, maladie dans laquelle les LT producteurs d'IL-17 ont particulièrement été étudiés ces dernières années (Salou et al., 2013; Tzartos et al., 2008).

Tableau 3 : Fréquence des cellules MAIT dans le sang de patients atteints de différentes pathologies

Maladie	Variation	Age patient - âge témoin	Origine de l'étude	Type cellulaire étudié	Référence
Maladies infectieuses					
Infection Streptococcale	↘	-8	France	CD161 ^{hi} Vα7.2 ⁺ CD4 ⁻ dans les CD3 ⁺ TCRγδ ⁻	Grimaldi, 2014
Infection Non Streptococcale	↘	-5			
Choléra (adultes)	=	2	Bangladesh	CD161 ^{hi} Vα7.2 ⁺ dans les CD3 ⁺ CD4 ⁻	Leung, 2014
Choléra (enfants)	↘	-0.5			
VHC	↘	ND	Allemagne	CD161 ^{hi} dans les CD3 ⁺ CD8 ⁺	Billerbeck, 2010
Pneumopathies	↘	ND	France	CD161 ^{hi} Vα7.2 ⁺ dans les CD3 ⁺ TCRγδ ⁻	Le Bourhis, 2010
TB	↘	ND			
TB	↘	4.5	Chine	CD161 ^{hi} Vα7.2 ⁺ dans les CD3 ⁺ TCRγδ ⁻	Jiang, 2014
TB latente		-4			
VIH ⁻ /TB latente	↘	1	Afrique du Sud	CD161 ^{hi} dans les CD8 ⁺	Wong, 2013
VIH ⁻ /TB active	↘	6			
HIV ⁺ /TB ⁻	↘	1			
VIH ⁺ /TB latente	↘	-5			
VIH ⁺ /TB active	↘	-7			
VIH chronique (non traités)	↘	1,5	Suède	CD161 ^{hi} Vα7.2 ⁺ dans les CD3 ⁺	Leeansyah, 2013
VIH chronique (non traités)	↘	1	USA		
VIH précoce	↘	ND	Suisse	CD161 ^{hi} dans les CD8 ⁺	Cosgrove, 2012
VIH chronique	↘	ND			
VIH virémie ⁺ (1 seul traité)	↘	-14	Angleterre	CD161 ^{hi} dans les CD8 ⁺	GreatHead, 2014
VIH virémie ⁻ (tous traités)	↘	-4			
Maladies autoimmunes et cancers					
SEP RR rémission	↘	0	Japon	CD161 ^{hi} Vα7.2 ⁺ dans les TCRαβ ⁺	Miyazaki, 2011
SEP RR poussée	↘	-2			
SEP (RR, SP)	↘	0	Allemagne	CD161 ^{hi} dans les CD8 ⁺ CD45RA ⁻	Willing, 2014
SEP RR	↗	-10	Italie	CD161 ^{hi} dans les CD8 ⁺	Annibali, 2011
Arthrite rhumatoïde	↘	10			
Crohn	↘	8	France	CD161 ^{hi} Vα7.2 ⁺ dans les CD3 ⁺ TCRγδ ⁻	Serriari, 2014
Rectocolite hémorragique	↘	2			
Coeliaque (traitée ou non, adultes)	↘	0	Irlande	CD161 ^{hi} Vα7.2 ⁺ dans les CD3 ⁺	Dunne, 2013
Coeliaque (non traitée, enfants)	=	0			
Lupus	↘	ND	USA	CD161 ^{hi} dans les CD3 ⁺ CD8 ⁺	Eidson, 2013
Mélanome	↗	ND			
Cancer	=	ND	France	CD161 ^{hi} Vα7.2 ⁺ dans les CD3 ⁺ TCRγδ ⁻	Le Bourhis, 2010
Autres					
Hémodialyse	↘	9	France	CD161 ^{hi} Vα7.2 ⁺ dans les CD3 ⁺	Baron, 2014
Transplantés foie	↘	9			
SAP déficient	↘	ND	France	CD161 ^{hi} Vα7.2 ⁺ dans les CD3 ⁺	Gérart, 2013
XIAP deficient	↘	ND			

SEP : sclérose en plaques (RR : rémittente, SP : secondaire progressive) - VHC/VHB : virus de l'hépatite C/B - TB : tuberculose - VIH : virus de l'immunodéficience humaine - SAP : *SLAM (signalling lymphocytic activation molecule)-associated protein* - XIAP : *X-linked inhibitor of apoptosis*

OBJECTIFS

La SEP est une maladie chronique démyélinisante du SNC dans laquelle les LT sont décrits comme ayant un rôle primordial. Ces 20-30 dernières années, de nombreuses données se sont accumulées sur l'implication particulière des LT CD8⁺, en plus des LT CD4⁺, dans la physiopathologie de la maladie. De nombreuses études se sont attachées à explorer différentes caractéristiques de ces cellules dans la maladie, telles que leur phénotype, leur capacités de cytotoxicité ou encore leur présence au sein du SNC. Cependant, l'identification des LT CD8⁺ pathogéniques impliqués dans la maladie est difficile, notamment à cause du faible accès au compartiment touché, le SNC. Des études ont montré que les biais de répertoire en périphérie chez les patients par rapport aux témoins étaient particulièrement liés aux LT CD8⁺, soulevant l'hypothèse que ces LT soient pathogéniques, d'autant plus que les clones surreprésentés dans le cerveau sont majoritairement des clones CD8⁺. Cependant, aucune étude n'a permis de savoir si les clones surreprésentés dans le SNC et en périphérie étaient les mêmes. **L'objectif de cette thèse a donc été d'étudier, dans la SEP, l'implication de sous populations particulières de LT CD8⁺.**

Pour cela, nous avons tout d'abord mis à profit la disponibilité d'échantillons couplés de sang, de LCR, de moelle épinière et de cerveau, afin de déterminer si oui ou non les LT CD8⁺ prédominants en périphérie correspondent à des LT présents dans le cerveau, et si ces LT ont un potentiel pathogénique. Ensuite, la mise en place récente d'outils pour l'étude des cellules MAIT, cellules majoritairement CD8 portant les marqueurs spécifiques de cellules productrices d'IL-17, nous a permis de travailler sur l'implication de ces cellules dans la maladie.

RESULTATS

I. ARTICLE 1 : COMPARAISON DES REPERTOIRES T DANS LE SANG, LE LCR ET LE SNC DE PATIENTS ATTEINTS DE SEP – ARTICLE SOUMIS

La détection des LT autoréactifs dans la SEP représente un challenge important. De nombreux travaux ont étudié la maladie sous l'angle du répertoire, avec l'hypothèse qu'un répertoire T du sang ou du LCR plus altéré chez les patients que chez les témoins serait le reflet des LT impliqués dans la maladie. Cependant, aucune de ces études ne permet de savoir si les LT ainsi définis en périphérie correspondent bien à des LT présents et surreprésentés dans les lésions, ce qui permettrait de supposer leur implication dans les processus physiopathologiques de la SEP. Grâce à de rares échantillons, nous avons pu étudier le répertoire T dans le sang, le LCR et le SNC de trois patients décédés des suites de la maladie. Cette étude nous révèle que 80% des LT prédominants du LCR correspondent à des LT prédominants dans le cerveau. Ce chiffre reste conséquent, à 40%, lorsque l'on s'intéresse aux LT CD8⁺ du sang. Afin de renforcer l'idée que ces LT CD8⁺ du sang peuvent être impliqués dans la physiopathologie de la maladie, nous avons étudié leur phénotype en périphérie, chez quatre autres patients, en comparaison avec quatre témoins. Les LT ainsi définis présentent un biais vers un phénotype mémoire chez les patients par rapport aux témoins. De plus, ils expriment plus de CCR5, CD11a et GZM-B que les LT non expandus, ce qui suggère une capacité à migrer dans le SNC et à exercer des propriétés cytotoxiques. De façon intéressante, les LT infiltrant le SNC sont majoritairement des LT CD8⁺, qui expriment aussi le CD11a et le GZM-B. Ces données montrent donc que les LT CD8⁺ potentiellement agressifs dans la maladie peuvent être identifiés à partir du sang et du LCR, compartiments bien plus faciles d'accès et d'étude que le SNC.

Cet article est actuellement soumis. Les figures puis les tableaux sont présentés à la suite du texte.

EXPANDED CD8 T CELL SHARING BETWEEN PERIPHERY AND CNS IN MULTIPLE SCLEROSIS

M. Salou^{1,2¶}, A. Garcia^{1,3¶}, L. Michel^{1,4¶}, A. Gainche-Salmon¹, D. Loussouarn⁵, B. Nicol^{1,2}, F. Guillot^{1,2}, P. Hulin⁶, S. Nedellec⁶, D. Baron^{1,2,3}, G. Ramstein⁷, JP. Soullillou¹, S. Brouard^{1,3}, A. Nicot¹, N. Degauque^{1,3*}, DA Laplaud^{1,4,8*}

1. INSERM, UMR 1064, Nantes, F-44093, France. 2. Université de Nantes, Faculté de Médecine, Nantes, F-44035, France. 3. CHU de Nantes, ITUN, Nantes, F-44093, France. 4. CHU de Nantes, Département de Neurologie, Nantes, France. 5. CHU de Nantes, Département de Pathologie, Nantes, France. 6. SFR François Bonamy, Cellular and Tissue Imaging Core Facility (MicroPICell), Nantes, France. 7. LINA UMR6241, Université de Nantes, Nantes, France. 8. INSERM 004, Centre d'Investigation Clinique, Nantes, France. ¶These authors contributed equally to the work. *Both senior authors, listed by alphabetical order

Corresponding author: David-Axel Laplaud, David.laplaud@univ-nantes.fr

INSERM UMR 1064, 30 Bd J. Monnet, 44093 Nantes Cedex 1, France

Tel: + 33 240087410/Fax: + 33 240087411

Word Count:

Text: 5,185

Abstract: 228

Key words: Multiple sclerosis - CD8 T cell - TCR repertoire - Central Nervous System - Cerebrospinal fluid

Abbreviations: CDR3: Complementary Determining Region 3 - CDR3-LD: CDR3 Length Distribution - CM: Central Memory - CNS: Central Nervous System - CSF: Cerebrospinal Fluid - EAE: Experimental Autoimmune Encephalomyelitis - EM: Effector Memory - GZM-B: Granzyme B - HV: Healthy Volunteers - MS: Multiple Sclerosis - NAWM: Normal Appearing White Matter - NGS: Normal Goat Serum - RR: Relapsing-Remitting - PBMC: Peripheral Blood Mononuclear Cells - PML: Progressive Multifocal Leukoencephalopathy - TEMRA: Terminally Effector Memory RA positive

ABSTRACT

Introduction and objectives: In patients with Multiple Sclerosis (MS), expanded T cell clones in both blood and cerebrospinal fluid (CSF) have been correlated with disease activity. In other patients, expanded CD8⁺ clones were found in the central nervous system (CNS), suggesting their implication in the disease process. Whether the expanded clones in the periphery or the CNS are the same is unknown.

Methods: We studied the TCR V β repertoire from paired blood (purified CD8⁺ and CD4⁺ T cells), CSF and CNS (22 lesions with various inflammatory and demyelinating statuses) samples from three MS patients. Additionally, clonally expanded CD8⁺ T cells were studied by flow cytometry in the blood, and by immunofluorescence in the CNS.

Results: Interestingly, almost all the CSF oligoclonal T cells were overrepresented in the CNS, and up to 43% of the blood clonally expanded CD8⁺ T cells were also representative of CNS-infiltrating T cells. In four additional MS patients, blood oligoclonal CD8⁺ T cells presented a bias towards a memory phenotype compared to healthy volunteers, with increased expression of CCR5, CD11a and Granzyme B compared to non-expanded CD8⁺ T cells from the same patients. The CNS-infiltrating T cells were mainly CD8⁺, and also expressed CD11a and Granzyme B.

Interpretation: We demonstrate that the potentially aggressive CD8⁺ T cells involved in MS disease processes can be readily identified and characterized from peripheral blood and CSF samples.

INTRODUCTION

Multiple sclerosis (MS) is an inflammatory and demyelinating disease of the central nervous system (CNS), characterized by the infiltration of immune cells, especially perivascular T cells and macrophages¹. Numerous studies assessing neuropathological, genetic, and immunological parameters highlight the importance of CD8⁺ T cells in the physiopathology of the disease^{2,3}. We and others have shown that the brain-infiltrating T cells display a restricted oligoclonal TCR repertoire, and that expanded infiltrating clones were mainly present in the CD8⁺ T cell subpopulation^{4–6}. This restricted oligoclonal TCR repertoire suggests an antigen-driven infiltration or an *in situ* proliferation. In other patients, the TCR repertoire in periphery was more biased in MS patients than in healthy volunteers (HV)^{7,8}, especially for CD8⁺ T cells⁹. The TCR repertoire of the cerebro-spinal fluid (CSF) has been described to be even more altered than in the blood^{10–12}, with accumulation of memory CD8⁺ T cells¹¹ and clonally expanded CD8⁺ T cells. Interestingly, alterations in the blood and in the CSF were correlated with the activity of the disease as assessed by MRI parameters^{8,13}, or by the relapsing/remission stage of the disease¹⁴. This data suggests that altered CD8⁺ T cells could be directly involved in the pathological process of the disease and that blood may reflect local inflammatory events. The study of the B cell repertoire is in line with this hypothesis, as deep-sequencing revealed that B cell clones were shared between the CNS, the CSF and the blood of MS patients, with clonal diversifications occurring in the three compartments^{15,16}. Of note, for T cells, only two studies reported that some CD8⁺ clones identified in brain biopsies could also be found in the CSF and the blood several years later in two patients^{4,17}. However, whether the clones present in the periphery are representative of the ones found in brain lesions, and thus maybe implicated in the disease process, remains unknown. This would be of great interest since access to peripheral T cells is obviously easier.

In this work, we studied unique paired biological samples, i.e. purified blood CD4⁺ and CD8⁺ T cells, CSF T cells and brain lesions retrieved from three MS patients. The TCR repertoire usage was compared for these three compartments at the spectratyping level and after sequencing. Interestingly, the CSF repertoire almost completely mirrored that of the CNS, and up to 43% of the blood clonally expanded CD8⁺ T cells were also found in the CNS. Phenotypic characteristics of expanded circulating CD8⁺ T were compared in MS patients and

in HIV. Oligoclonal CD8⁺ T cells from the blood of relapsing-remitting (RR) patients displayed a preferential central-memory (CM) phenotype with increased homing and cytotoxic abilities. Brain-infiltrating CD8⁺ T cells also expressed homing and cytotoxicity markers. Altogether, these data support the implication of blood CD8⁺ T cells with clonal expansions in the disease process. Finally our work shows that CSF and blood samples could be used as a source of clonally expanded CD8⁺ T cells found at the lesion sites, and potentially implicated in the disease process.

MATERIAL AND METHODS

Patients and Healthy Volunteers: Demographic and clinical characteristics of all the donors are summarized in table 1. Three deceased MS patients were included for comparison of the TCR V β repertoires in the blood, CSF and CNS. Four other patients with RR MS and four HV were included for phenotypic comparisons between circulating CD8⁺ T cells with Gaussian and with oligoclonal distributions. For all the patients, MS was diagnosed according to the MacDonald 2005 criteria¹⁸. Informed consent for donation was obtained in compliance with our local University hospital ethical committee. Sample collection was declared at the Biomedicine Agency, identification number PFS13-003. HV were enrolled by the Etablissement Français du Sang (EFS) within the context of a research contract.

For the three deceased MS patients, brain and spinal cord were frozen at -80°C. One part of these samples was stored in Formol (VWR, Radnor). MS diagnosis was confirmed after histological analysis by a neuropathologist (D. Loussouarn). Blood was collected by intracardiac puncture. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated by Ficoll density centrifugation (Eurobio) and stored in liquid nitrogen for further analyses. CSF samples (30-50 ml) were obtained by puncture in the *cisterna magna* to avoid blood contamination. CSF cells were collected by centrifugation and stored frozen in Trizol (Invitrogen).

PBMC from four RR untreated MS patients and four HV were frozen as described above. RR MS patients had an active disease, i.e. presented at least one gadolinium-enhancing lesion on a brain MRI scan in the previous three months and at least one severe relapse in the previous year.

Lesion characterization of autopsy material: Ten μ m serial sections from the cryopreserved brains and spinal cords were stained with Luxol Fast blue, Hematoxylin-Eosin-Safran, anti-CD3, anti-CD68 and anti-HLA-DR (Antibodies description in the supplementary table 1). Lesions were classified as active (demyelination and homogeneous inflammatory infiltrate), chronic active (demyelination and inflammatory infiltrate at the surroundings), NAWM (inflammatory infiltrate without demyelination) and meningeal (infiltrate mainly localized in the meninges). Classification was cross-checked by the department of Pathology (D. Loussouarn). The number of 10 μ m sections necessary to obtain at least 15,000 T cells, as

described to realize a representative TCR repertoire⁵, was lysed in Trizol (Invitrogen). Serial sections stained with LFB, anti-CD3 and anti-CD68 confirmed that the tissue collected belonged to the lesion.

TCR V β repertoire analyses: After thawing, PBMC were labeled with anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8 and DAPI (Antibodies described in the supplementary table 1). Viable CD4⁺ and CD8⁺ T cells were isolated (purity > 98%) with a high-speed cell sorter (FACS ARIA, BD Biosciences). Total RNA was extracted from Trizol lysates of the blood purified CD4⁺ and CD8⁺ T cells, the CSF cells and from the CNS sections, according to the manufacturer's recommendations. RNA concentration and integrity were checked using a spectrophotometer (ND-1000, Nanodrop Technologies) and a picoRNA Chip (Agilent®), respectively.

RNA from the autopsy samples (200 ng for the CD4⁺ or CD8⁺ T cells, 400 ng for the CSF cells) was reverse-transcribed using SuperScript™ II Reverse Transcriptase (Invitrogen) according to the manufacturer's recommendations. For the blood of patients and HV, reverse-transcription (400 ng of starting material) was performed with M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen). Poly(dT) were used for the blood and CSF cells, and a specific primer hybridizing in the C β region¹⁹ for the CNS sections, to increase the sensitivity. CDR3 regions were amplified by PCR in a 9700 thermocycler (Applied Biosystems), in separate reactions using a common reverse C β primer and different forward V β -specific primers (supplementary table 2). Two semi-nested PCRs were performed with the same forward primers but using firstly Taq-Polymerase GOLD (Applied Biosystems) and a reverse primer 'SpTy-b-out'⁵, and secondly, Taq-Polymerase (Invitrogen) and a reverse primer 'CBR'²⁰. PCR conditions⁹ and V β primers²⁰ for the blood cells of patients and HV have been previously described. For the autopsy samples, the V β primers' list was modified to increase the number of studied V2 families. Primer sequences are listed in supplementary table 2. Primers were named according to the Arden classification²¹. A run-off reaction was performed on the PCR products, using a FAM-tagged C β primer²². The CDR3-LD was determined with an AB3037 DNA sequencer (Applied Biosystems) and analyzed using GeneMapper software (Applied Biosystems). A software was developed to automatically describe individual TCR V β profiles and to compare the TCR V β usage across the different biological compartments.

The CDR3-LDs were described as monoclonal (major peak >80% and all the others <10%), oligoclonal (≤ 4 peaks >5% each), polyclonal with major peak (>4 peaks, major peak >40% and twice as much as the second major peak), polyclonal or Gaussian (other distributions, polyclonal when shifted from the Gaussian distribution) (see supplementary figure 1 for examples). Global CDR3-LD alterations were represented on a diagram enabling an easy visual appraisal of the CDR3-LD biases for all V β families. In this representation, for each V β family, a Gaussian distribution was subtracted from the considered distribution. For each CDR3 length, a color code represents the deviation from the Gaussian distribution.

Comparison of TCR V β repertoires: In order to evaluate changes in CDR3-LD between the different compartments of a given patient, comparisons of all the V β families were made in pairs. For each V β family, the CDR3-LD were compared by different methods:

- a correlation coefficient was calculated by comparing the percentages of each CDR3 length between the two compartments compared. The higher the correlation coefficient, the stronger the similarities between the two distributions are.
- a distance score was calculated as the mean of the differences peak by peak between two distributions. The smaller the distance score, the closer two distributions are.

The correlation coefficient and the distance score were very effective at distinguishing very close or very different distributions, but not those in between. Hence, a rater-dependent method was also used:

- a similarity score was attributed to every comparison by three blinded independent raters (MS, AG and DAL) to classify the distributions as different (0), different but with identical major peak (1), similar (2) or identical (3). The final classification was obtained with a consensus for at least two raters.

Another analysis was performed to analyze the proximities of the CDR3-LD from two distinct locations: peripheral compartments (CSF and blood) and CNS lesions. A reference CDR3-LD (one V β family from the blood or the CSF of one patient) was first selected, and distances from this reference profile were then computed over all the other CDR3-LD, regardless of their V β families. This was repeated independently for all the V β profiles selected as reference. The existence of a similarity pattern between peripheral and CNS compartments,

and thus a propensity of intra-V β family distances to be shorter than inter-V β family ones, was assumed. A Wilcoxon Rank Sum test was used to validate this assumption and a Benjamini & Hochberg correction was applied to account for multiple comparisons.

Finally, the similarity relationship between the CDR3-LD profiles was estimated. To each CNS profile was associated a label corresponding to its compartment, as well as blood and CSF labels for comparison purposes. For each patient and for each V β family, the median Euclidean distance was computed between all possible label pairs. Taking this distance matrix between pairs of labels as input, a Multidimensional Scaling was performed, resulting in a 2-D representation of the respective positions of the compartments. In this representation, the labels proximities reflect the degree of similarity between their CDR3-LD.

Sequencing: For V β families with one overrepresented CDR3 length, sequencing was performed on the PCR product resulting from the semi-nested PCR performed for the spectratyping. The specific V β or the common C β ('CBR') primers were used for the sequencing performed on an AB3037 DNA sequencer (Applied Biosystems). Chromas Lite 2.01 (Technelysium) was used for analysis.

Phenotypic analysis of clonally expanded blood CD8⁺ T cells: CD8⁺ T cells and specific V β CD8⁺ T cells characterized by Gaussian or altered CDR3-LD were analyzed by multi-color flow cytometry. Directly coupled antibodies against the following antigens were used: CD3, CD8, CD45RA, CD197 (CCR7), CD27, CD28, CCR5, CD11a (LFA1), GZM-B, CD95 (Fas) and specific anti-V β . Antibodies characteristics are listed in supplementary table 1. Dead cells were excluded from the analysis using LIVE/DEAD Fixable Aqua stain (Invitrogen) according to the manufacturer's guidelines. For intracellular staining, cells were stained for viability and extracellular markers, permeabilized and fixed with Perm/Fix reagent (BD Biosciences), before labeling with the appropriate antibody. Samples were acquired with a LSRII (BD Bioscience) on FACS DIVA software (version 6.1.3, BD Biosciences) and analyzed with FlowJo Software (V7.6.5, TreeStar).

Immunofluorescence on autopsy samples: Ten μ m frozen sections were thawed, fixed in PBS 4% paraformaldehyde (Electron Microscopy Science), rinsed in PBS and incubated in PBS 10% normal goat serum (NGS, Sigma-Aldrich) to prevent non-specific staining. Sections were stained with anti-CD3, anti-CD8 and one of the following antibodies: anti-CD11a, anti-GZM-B

(antibodies characteristics displayed in supplementary table 2). Primary antibodies were incubated overnight at 4°C in PBS 10% NGS. The corresponding secondary antibodies were incubated for 2h at room temperature in PBS 10% NGS. After a 10-minute incubation in PBS 1% DAPI, slides were mounted using prolong antifade reagent (Invitrogen).

Sections were observed on an Axiovert 200m microscope (Zeiss), at a 20x (NA0.75) optic magnification. Images were acquired in a sequential mode with an AxioCamR camera using Axiovision Software. Forty to 80 pictures were taken, and 125 to 1351 CD3⁺ T cells were counted (mean of 345 cells). Counting of CD3⁺ T cells was performed with the Volocity software (V. 6.2, PerkinElmer).

Statistics: Statistics were performed using PRISM software (V5.03, GraphPad Software). For the repertoire comparison, a one-way ANOVA was performed to compare the correlations and the distances, followed by a Bonferroni's multiple comparison test. When comparing two groups (MS patients vs HV, immunofluorescence), a Mann-Whitney test was performed. $p < 0.05$ was assumed as significant.

RESULTS

TCR repertoire comparisons reveal strong similarities between the CSF, blood CD8⁺ T cells and CNS lesions.

In order to study whether the alterations of the repertoire present in the blood or in the CSF reflect the alterations in the CNS of MS patients, we compared the TCR repertoire from paired blood CD4⁺ and CD8⁺ sorted T cells, CSF T cells and CNS-infiltrating T cells of three MS patients. All clinical and demographical information is presented in table 1. For each patient, six to eight lesions were identified and classified as active, chronic active, meningeal or normal-appearing white matter (NAWM) (Table 2; see methods section for classification criteria). Then, for each patient, the complementary determining region 3 (CDR3) length distribution (CDR3-LD) of each V β family was compared across the different compartments. Classification of CDR3-LD is presented in supplementary figure 1 (see method section for classification criteria) and comparison examples between different profiles are displayed in figure 1. As previously described⁹, the T cell repertoire of blood CD4⁺ T cells was less altered than for blood CD8⁺ T cells (data not shown). Among all the alterations observed, some could only be found in the lesions (fig. 1A and 1B, dotted lines), whilst others were similar in the CSF and in the lesions but not in the blood (fig. 1A and 1C, dashed lines). Finally, some alterations present both in the blood CD8⁺ T cells and in the CSF reflected alterations present in the CNS (fig. 1A and 1D, solid lines). To quantify whether alterations present in the blood or in the CSF reflected alterations existing in the lesions, each monoclonal and oligoclonal V β family of the blood or of the CSF was compared to the same V β family of each lesion of the same patient, using the similarity score described in the method section (score 0/1 for different CDR3-LD, 2/3 for similar CDR3-LD). Compared to the blood repertoire, the CSF repertoire was closer to the infiltrating T cells repertoire. Indeed 50% of V β families with an altered CDR3-LD in the CSF exhibited similar or identical CDR3-LD in CNS lesions (similarity score of 2 and 3). Besides, the TCR repertoire of blood CD8⁺ T cells was closer to the CNS lesions repertoire than was the TCR repertoire of blood CD4⁺ T cells (15.04% and 11.05% of scores 2 and 3, respectively). Objective scores confirmed these observations. Indeed, CSF monoclonal and oligoclonal V β families were more correlated to the same CNS V β families than those from blood CD8⁺ or CD4⁺ T cells (fig. 2B) (mean $\pm$ SEM: 0.72 $\pm$ 0.02 for the CSF, 0.43 $\pm$ 0.02 for blood CD8⁺ T cells, 0.37 $\pm$ 0.03 for blood CD4⁺ T cells, $p < 0.001$). When

measuring the distance²³ between the CDR3-LD of the compared profiles, with a small distance reflecting similar CDR3-LDs, the CSF more closely mirrored the CNS infiltrating T cells (fig. 2C) than the blood (mean $\pm$ SEM: 6.15 $\pm$ 0.20 for the CSF, 9.43 $\pm$ 0.23 and 10.35 $\pm$ 0.30 for blood CD8⁺ and CD4⁺ T cells, respectively, $p < 0.001$). Of note, the distance was smaller for blood CD8⁺ T cells than for blood CD4⁺ T cells (fig. 2C; $p < 0.05$). Finally, the distance distribution between blood, CSF and CNS CDR3-LD profiles was analyzed regardless of the mono or oligoclonal pattern. This demonstrates the capacity of CSF and blood profiles to closely approximate a CNS CDR3-LD from the same V β family (fig. 2D). Again, compared to blood CD4⁺ and CD8⁺ T cells, CSF T cells specifically match more profiles issued from the same V β family. Using a q-value threshold of 5%, this discriminative power concerned more than two-thirds of the V β families for CSF, and approximately one-third for blood compartments (fig. 2D).

The main focus of our study was to know whether a predominant clone in the periphery is also predominant in CNS lesions. We thus determined, for each patient, the number of mono or oligoclonal CDR3-LD from blood or CSF T cells that were also present in at least one CNS lesion. Results are displayed in table 3. A mono or an oligoclonal CDR3-LD in the CSF was present in the CNS at a frequency of almost 80% (median [min-max]: 79% [70-90%]). The frequency decreased to 36% (median [min-max]: 43% [23-43%]) for blood CD8⁺ T cells and to 26% (median [min-max]: 26% [23-30%]) for blood CD4⁺ T cells. This was confirmed by sequencing the spectratyping products for families with mono and oligoclonal CDR3-LD. A total of 235 sequences of functional TCRs were obtained from the different compartments. Over the 20 sequences found in the CSF, all were also described in at least one CNS location. For the blood CD8⁺ and CD4⁺ T cells, 6/17 and 1/3 sequences were also present in the CNS, respectively. Alignment of the sequences did not reveal any matches, supporting the notion of a private selection of T cell clones between the three patients. This was not surprising because almost all HLA alleles were different between the three patients, except for one allele (shared by MS1 and MS2, see table 1).

Interestingly, identical alterations in the blood CD8⁺ and CSF T cells were also found in the CNS. Indeed, for the three patients, out of seven V β families with the same oligoclonal or monoclonal pattern both in the CSF and CD8⁺ T cells, five were also present in at least one CNS lesion with a similar pattern.

The CSF T cell repertoire closely reflects that of the meninges and the optic nerves

The repertoire biases found in the periphery (CSF or blood T cells) did not seem to be more representative of a particular lesion type (fig. 3A-C). This observation was confirmed using the correlation or the distance score (supplementary figure 2), and a multidimensional scaling representation (fig 3D). This last representation reveals the similarity relationship between CDR3-LD profiles in connection with their anatomical locations. Of note, the CSF TCR repertoire is most similar to the repertoire of the optic nerves and the meninges for the three patients (fig. 3D).

Different CNS lesions in single patients displayed the same alterations

Within TCR V β families that displayed monoclonal CDR3-LD in the CNS lesions, almost all these distributions were present in at least two lesions (4/5, for MS1, 14/17 for MS2, 6/6 for MS3), including NAWM. This was also the case when focusing on oligoclonal CDR3-LD. These results were correlated by sequencing of the spectratyping PCR products of families with altered CDR3-LD: out of the 30 V β families studied for each patient, seven displayed a similar sequence in at least two lesions for MS1, 13 for MS2 and 15 for MS3. These results may even be an underestimation, as this sequencing does not yield a sequence when a clone is not highly predominant. Finally, as shown above, expanded CSF V β families were almost all representative of expansions in the CNS, but conversely, some alterations were unique to the CNS.

Expanded circulating CD8⁺ T cells in MS patients are biased toward a central memory phenotype when compared to CD8⁺ T cells with clonal expansions from HV.

As more than 40% of blood CD8⁺ T cells with clonal expansions corresponded to families with altered CDR3-LD in the CNS, we wondered whether these T cells had a specific phenotype that could suggest their involvement in the disease process, or their preferential migration into the CNS. CDR3 spectratyping was performed on the blood CD8⁺ T cells of four MS patients and four HV. Some altered V β families for which V β antibodies were available were phenotypically studied. Using CD45RA and CCR7 markers (fig. 4A), the populations were classified as naïve (CD45RA⁺CCR7⁺), central memory (CM; CD45RA⁻CCR7⁺), effector memory (EM; CD45RA⁻CCR7⁻) and terminally differentiated effector memory cells CD45RA⁺ (TEMRA;

CD45RA⁺CCR7⁻)²⁴. Firstly, as compared to HV, the overall V β families of MS patients displayed a less naïve phenotype, being more differentiated into the memory subsets (fig. 4B-C, $p < 0.01$ for the decrease of naïve cells in MS altered or Gaussian V β families as compared to HV Gaussian). In MS patients, CD8⁺ T cells with Gaussian CDR3-LD preferentially exhibited an EM phenotype, while CD8⁺ T cells with altered CDR3-LD were more differentiated into CM and TEMRA cells (fig. 4B-C).

Circulating CD8⁺ T cells with clonal expansions have an increased expression of homing and cytotoxicity markers when compared to circulating CD8⁺ T cells with Gaussian families.

CCR5 and CD11a have both been suggested to be implicated in the migration into the CNS^{25,26}. Families with altered CDR3-LD from MS patients harbored higher expression of CCR5 than Gaussian V β families from the same patients (fig. 4D) (median: 40.30% vs 22.10%, $p < 0.05$). These expanded CD8⁺ T cells from MS patients seemed to express higher levels of CD11a (fig. 4E) (median frequency of CD11a^{high}: 76.80% vs 64.80%), and increased granzyme B (GZM-B) expression (median: 42.40% vs 23.60%, fig. 4F), compared to their Gaussian counterparts. Altogether, these data suggest that V β families with altered CDR3-LD from MS patients are biased toward a CM phenotype, with more pronounced homing and cytotoxic markers than Gaussian families.

Lesion-infiltrating CD8⁺ T cells with clonal expansions express homing and cytotoxicity markers.

Almost 40% of clonally expanded blood CD8⁺ T cells were found in the CNS lesions, and we report that these cells in the periphery expressed a specific activated/homing/cytotoxic profile. We then asked whether the phenotype of the lesion-infiltrating CD8⁺ T cells was similar to the one in the periphery. Most V β families of the lesion-infiltrating CD8⁺ T cells have an altered distribution, allowing an indirect assessment of the phenotype of clonally expanded CD8⁺ T cells *in situ*. In addition to CD3, CD8 and DAPI, CD11a or GZM-B were stained on serial tissue sections by immunofluorescence. CD8⁺ T cells outnumbered CD8⁻ T cells in the 22 lesions of the three patients: 66.93% (median) of the infiltrating CD3⁺ T cells were positive for CD8, as compared to 33.07% (median) negative for CD8 (fig. 5A, $p < 0.001$). CD8⁺ T cells were predominant in all types of lesions (fig. 5B). At least half of the infiltrating T cells (CD8⁺ or CD8⁻ T cells) expressed CD11a (50-80%, fig. 5C-D). Lesion-infiltrating CD8⁺ T

cells expressed higher levels of CD11a than CD8⁺ T cells (median: 67.60% vs 55.35%, $p < 0.05$), especially in active and chronic lesions (fig. 5E). Finally, GZM-B-expressing infiltrating CD8⁺ T cells were identified (fig. 5F), highlighting their cytotoxic potential *in situ*. Collectively, these results suggest that infiltrating T cells in the studied lesions are mainly CD8⁺ T cells with clonal expansions that express homing and cytotoxic markers.

DISCUSSION

Our study is the first to compare the repertoire of the lesion-infiltrating T cells against that of the CSF and blood CD4⁺ and CD8⁺ T cells in three MS patients. Our data shows that the CSF T cell repertoire was very close to the TCR repertoire found in the CNS lesions. Up to 43% of circulating CD8⁺ T cells with clonal expansions were also found in the CNS lesions. In the blood, CD8⁺ T cells with clonal expansions displayed a memory phenotype, biased toward the CM phenotype with an overexpression of CCR5 and CD11a. In addition, CNS-infiltrating T cells were mainly CD8⁺, with 2/3 expressing CD11a. Taken together, these results strongly suggest the involvement of peripheral CD8⁺ T cells with clonal expansions in the disease process of MS.

Our results are in line with the three studies published so far, including our own, reporting that some V β clones are shared between different MS lesions including NAWM, most of them being CD8⁺ T cells^{4–6}. This suggests a dominant antigen, at least in a given patient. In our repertoire analysis, we could not separate infiltrating CD4⁺ and CD8⁺ T cells. However, the predominance of CD8⁺ T cells together with the higher similarity of the CNS repertoire with the blood CD8⁺ than with the blood CD4⁺ T cells strongly suggests that at least some alterations in the CNS belonged to the CD8⁺ subpopulation, especially when confirmed by sequence analyses. Our results also correlate with several studies showing that CD8⁺ T cells outnumbered CD4⁺ T cells in the CNS lesions of MS patients, further reinforcing the implication of CD8⁺ T cells in MS^{4,5,10,17,27,28}. As the vast majority of infiltrating T cells in the CNS lesions are clonally expanded, one of the major remaining questions is the antigen specificity of these infiltrating T cells. Our results are of particular interest for studies aiming at characterizing the antigen specificity of these clones^{19,29–31}. Indeed, the cells of interest are obviously more easily accessible by a simple venous puncture than by directly studying the T cells infiltrating the CNS lesions. This would definitely prove whether the cells overrepresented in the CNS lesions of MS patients recognize antigens specific for the CNS.

Several studies reported less repertoire diversity in the CSF than in the blood^{10,32,12}. To our knowledge, no study has compared CSF and CNS repertoires at the same time. Of course, artificial alterations created by an under representation of some V β families cannot be excluded. However, especially in the context of our nucleotide sequence data, we show that a large majority of CSF families with altered CDR3-LD are similar to families found in the

brain. Consequently, expanded clones of the CSF may be very relevant to studying these infiltrating T cells. This is in accordance with a recent study which analyzed the TCR repertoire in paired blood and CSF samples of MS patients by deep-sequencing³³. The authors show that there is a limited overlap between sequences found in the CSF and the blood. Especially, they found that Epstein Barr virus-specific TCR sequences are enriched in the CSF CD8 compartment, supporting the importance of CSF CD8⁺ T cells in the physiopathology of the disease.

TCR repertoire monitoring of blood samples was shown to be indicative of the clinical outcome of a rat EAE model of MS³⁴. Numerous studies in humans have shown that MS patients had a bias in their blood TCR repertoire as compared to HV^{7-9,13,35-37}, especially in CD8⁺ T cells⁹. However, this preferential alteration in MS was not found in discordant twins³⁸. Expanded clones are also present in the blood of HV³⁹ and have been associated with the infectious history of the patient, as shown for human cytomegalovirus responses⁴⁰. However, a correlation was found between the repertoire bias and the disease activity in the blood^{8,13} and in the CSF¹⁴. Thus, at least part of the expanded clones found in the blood of MS patients is likely to be specific for the disease. Our results show that approximately 40% of oligoclonal expanded blood CD8⁺ T cells can be found and predominate in the CNS lesions, demonstrating that potential disease-related clones can be identified in the blood. These infiltrating T cell clones can of course be bystander clones, irrelevant for the disease. We wondered whether the expanded clones had a specific phenotype, and could thus be indicative of their potential aggressiveness. As compared to Gaussian V β families from MS patients, clonally expanded blood CD8⁺ T cells are enriched in CCR5⁺ and CD11a^{high} cells, suggesting that these cells are able to invade the CNS. This is consistent with the fact that 60 to 70% of the CD8⁺ T cells in the studied CNS lesions were CD11a⁺ (we could not separate between CD11a⁺ and CD11a^{high} by immunofluorescence). Indeed, both CCR5 and CD11a have been implicated in the transmigration into the CNS^{25,26}. CCR5⁺ and CD11a⁺ T cells were observed in the brain of MS patients, together with their ligands^{41,42}. Besides, memory CD4⁺CCR2⁺CCR5⁺ T cells migrate more than CCR2⁻CCR5⁻ T cells through an *in vitro* BBB model⁴³. In line with our results, a recent report showed a decreased immune reconstitution inflammatory syndrome with anti-CCR5 use after a progressive multifocal leukoencephalopathy (PML) under natalizumab treatment for MS⁴⁴. Moreover, PML cases

were reported under efalizumab treatment, a monoclonal antibody targeting CD11a⁴⁵, together with a decreased *in vitro* transmigration of T cells under treatment⁴⁶. We also found that clonally expanded CD8⁺ T cells from the blood of MS patients were mainly memory cells, with a bias toward a CM phenotype, and a trend toward an increase in the TEMRA population, suggesting an antigen-driven mechanism. CM cells have been implicated in MS, since Fingolimod treatment, which traps naïve and CM cells into the lymph nodes, has proven efficacy in relapse prevention⁴⁷. It has been previously shown that CNS infiltrating T cells are of the EM lineage⁴⁸ while CSF CD8⁺ T are composed of a mixture of CM and EM T cells of different proportions^{49–51}. In MS patients, the CCR7 ligand CCL19 has been reported to be expressed in MS lesions⁵², or at least on the endothelial cells from the choroid plexus⁴⁸. The fact that CNS-infiltrating T cells are of the EM lineage suggests they lose CCR7 expression in the parenchyma following *in situ* reactivation or following ligand-induced CCR7 downregulation. Together with the expression of CCR5, and more importantly of CD11a on CD8⁺ T cells with altered CDR3-LD, this indicates that they are indeed prone to enter the brain. Interestingly, in our study, 30 to 60% of clonally expanded CD8⁺ T cells in the blood express GZM-B, highlighting their cytotoxic potential. Moreover, we found that some CD8⁺ T cells from the CNS lesions also expressed GZM-B, as previously reported⁵⁰.

Altogether, these data suggest that clonally expanded blood CD8⁺ T cells are able to invade the CNS and to exert cytotoxic functions, strengthening the implication of CD8⁺ T cells in the physiopathology of the disease. Together with deciphering the antigen specificity of the blood expanded CD8⁺ T cells, studying their specific response to myelin antigen could give further insight into the role of these cells.

Clonally related or even identical B cells have been shown to be present both in the CSF and in the blood¹⁵, and B cells participating in oligoclonal band production were found in the blood⁵³. Our TCR repertoire results are in line with these studies, as T cell clones found in the CNS lesions could also be found in the CSF and in the blood. However, some alterations of the CNS are not present in periphery, raising the question of the relevance of these cells. This suggests that CNS autoimmunity is not only supported in the CSF or in the CNS, but also in the blood.

In conclusion, our work provides new insight on the implication and recruitment of circulating clonally expanded CD8⁺ T cells to the CNS lesions of MS patients. These results may have a strong implication as they give more credit to the study of peripherally expanded blood CD8⁺ T cells in this disease, and should allow an easier study of the TCR of potentially implicated clones.

Acknowledgments: The authors would like to thank the patients for their participation in this study, in particular the patients and their families who accepted to donate their central nervous system for a better knowledge of this disease. We are also most grateful to the Biogenouest Genomics core facility for its technical support. The authors would like to thank also S. Pettré and A. Elong-Ngono who helped for the autopsies and M. Jacq-Foucher, F. Le frère, N. Jousset and S. Wiertlewski who helped for the patients' selection.

This work has been funded by the ARSEP Foundation and in the framework of the "Paris Scientifiques" supported by the Région Pays de Loire. This work was also realized in the context of the IHU-Cesti project, which received French government financial support managed by the National Research Agency via the "Investment Into The Future" program ANR-10-IBHU-005. The IHU-Cesti project is also supported by Nantes Metropole and the Pays de la Loire Region.

REFERENCES

1. Compston A, Coles A. Multiple sclerosis. *Lancet* 2008;372(9648):1502–1517.[cited 2012 Jul 18]
2. Denic A, Wootla B, Rodriguez M. CD8(+) T cells in multiple sclerosis. *Expert Opin. Ther. Targets* 2013;17(9):1053–1066.
3. Goverman J. Autoimmune T cell responses in the central nervous system. *Nat. Rev. Immunol.* 2009;9(6):393–407.[cited 2012 Jul 25]
4. Babbe H, Roers A, Waisman A, et al. Clonal expansions of CD8+ T cells dominate the T cell infiltrate in active multiple sclerosis lesions as shown by micromanipulation and single cell polymerase chain reaction. *J. Exp. Med.* 2000;192(3):393–404.[cited 2014 Apr 11]
5. Junker A, Ivanidze J, Malotka J, et al. Multiple sclerosis: T-cell receptor expression in distinct brain regions. *Brain* 2007;130(11):2789–2799.[cited 2014 Apr 11]
6. Montes M, Zhang X, Berthelot L, et al. Oligoclonal myelin-reactive T-cell infiltrates derived from multiple sclerosis lesions are enriched in Th17 cells. *Clin. Immunol. Orlando Fla* 2009;130(2):133–144.[cited 2012 May 7]
7. Matsumoto Y, Yoon WK, Jee Y, et al. Complementarity-determining region 3 spectratyping analysis of the TCR repertoire in multiple sclerosis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 2003;170(9):4846–4853.[cited 2012 May 7]
8. Muraro PA, Bonanni L, Mazzanti B, et al. Short-term dynamics of circulating T cell receptor V beta repertoire in relapsing-remitting MS. *J. Neuroimmunol.* 2002;127(1-2):149–159.[cited 2012 May 7]
9. Laplaud D-A, Ruiz C, Wiertlewski S, et al. Blood T-cell receptor beta chain transcriptome in multiple sclerosis. Characterization of the T cells with altered CDR3 length distribution. *Brain J. Neurol.* 2004;127(Pt 5):981–995.[cited 2012 May 7]
10. Démoulin T, Mouthon F, Clayette P, et al. The same TCR (N)Dbeta(N)Jbeta junctional region is associated with several different vbeta13 subtypes in a multiple sclerosis patient at the onset of the disease. *Neurobiol. Dis.* 2003;14(3):470–482.[cited 2012 May 7]
11. Jacobsen M, Cepok S, Quak E, et al. Oligoclonal expansion of memory CD8+ T cells in cerebrospinal fluid from multiple sclerosis patients. *Brain J. Neurol.* 2002;125(Pt 3):538–550.[cited 2012 May 7]
12. Lozeron P, Chabas D, Duprey B, et al. T cell receptor V beta 5 and V beta 17 clonal diversity in cerebrospinal fluid and peripheral blood lymphocytes of multiple sclerosis patients. *Mult. Scler. Houndmills Basingstoke Engl.* 1998;4(3):154–161.[cited 2012 May 7]
13. Laplaud D-A, Berthelot L, Miquieu P, et al. Serial blood T cell repertoire alterations in multiple sclerosis patients; correlation with clinical and MRI parameters. *J. Neuroimmunol.* 2006;177(1-2):151–160.[cited 2012 May 7]
14. Muraro PA, Cassiani-Ingoni R, Chung K, et al. Clonotypic analysis of cerebrospinal fluid T cells during disease exacerbation and remission in a patient with multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.* 2006;171(1-2):177–183.[cited 2012 May 7]
15. Von Büdingen H-C, Kuo TC, Sirota M, et al. B cell exchange across the blood-brain barrier in multiple sclerosis. *J. Clin. Invest.* 2012;122(12):4533–4543.[cited 2012 Dec 4]
16. Lovato L, Willis SN, Rodig SJ, et al. Related B cell clones populate the meninges and parenchyma of patients with multiple sclerosis. *Brain J. Neurol.* 2011;134(Pt 2):534–541.[cited 2012 Jun 22]
17. Skulina C, Schmidt S, Dornmair K, et al. Multiple sclerosis: brain-infiltrating CD8+ T cells persist as clonal expansions in the cerebrospinal fluid and blood. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2004;101(8):2428–2433.[cited 2012 May 7]
18. Polman CH, Reingold SC, Edan G, et al. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2005 revisions to the “McDonald Criteria.” *Ann. Neurol.* 2005;58(6):840–846.[cited 2012 Jun 22]
19. Seitz S, Schneider CK, Malotka J, et al. Reconstitution of paired T cell receptor alpha- and beta-chains from microdissected single cells of human inflammatory tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2006;103(32):12057–12062.
20. Monteiro J, Hingorani R, Choi IH, et al. Oligoclonality in the human CD8+ T cell repertoire in normal subjects and monozygotic twins: implications for studies of infectious and autoimmune diseases. *Mol. Med. Camb. Mass* 1995;1(6):614–624.[cited 2012 Jun 22]
21. Arden B, Clark SP, Kabelitz D, Mak TW. Human T-cell receptor variable gene segment families. *Immunogenetics* 1995;42(6):455–500.
22. Puisieux I, Even J, Pannetier C, et al. Oligoclonality of tumor-infiltrating lymphocytes from human melanomas. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 1994;153(6):2807–2818.[cited 2012 Jun 22]

23. Miqueu P, Guillet M, Degauque N, et al. Statistical analysis of CDR3 length distributions for the assessment of T and B cell repertoire biases. *Mol. Immunol.* 2007;44(6):1057–1064.[cited 2012 Jun 22]
24. Appay V, van Lier RAW, Sallusto F, Roederer M. Phenotype and function of human T lymphocyte subsets: consensus and issues. *Cytom. Part J. Int. Soc. Anal. Cytol.* 2008;73(11):975–983.
25. Engelhardt B, Ransohoff RM. Capture, crawl, cross: the T cell code to breach the blood-brain barriers. *Trends Immunol.* 2012;33(12):579–589.
26. Hamann I, Zipp F, Infante-Duarte C. Therapeutic targeting of chemokine signaling in Multiple Sclerosis. *J. Neurol. Sci.* 2008;274(1-2):31–38.[cited 2014 Apr 16]
27. Booss J, Esiri MM, Tourtellotte WW, Mason DY. Immunohistological analysis of T lymphocyte subsets in the central nervous system in chronic progressive multiple sclerosis. *J. Neurol. Sci.* 1983;62(1-3):219–232.
28. Hauser SL, Bhan AK, Gilles F, et al. Immunohistochemical analysis of the cellular infiltrate in multiple sclerosis lesions. *Ann. Neurol.* 1986;19(6):578–587.
29. Dornmair K, Meinl E, Hohlfeld R. Novel approaches for identifying target antigens of autoreactive human B and T cells. *Semin. Immunopathol.* 2009;31(4):467–477.[cited 2014 Apr 11]
30. Kim S-M, Bhonsle L, Besgen P, et al. Analysis of the paired TCR α - and β -chains of single human T cells. *PloS One* 2012;7(5):e37338.
31. Siewert K, Malotka J, Kawakami N, et al. Unbiased identification of target antigens of CD8+ T cells with combinatorial libraries coding for short peptides. *Nat. Med.* 2012;18(5):824–828.[cited 2014 Apr 11]
32. Gestri D, Baldacci L, Taiuti R, et al. Oligoclonal T cell repertoire in cerebrospinal fluid of patients with inflammatory diseases of the nervous system. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 2001;70(6):767–772.[cited 2012 May 7]
33. Lossius A, Johansen JN, Vartdal F, et al. High-throughput sequencing of TCR repertoires in multiple sclerosis reveals intrathecal enrichment of EBV-reactive CD8(+) T cells. *Eur. J. Immunol.* 2014;
34. Kim G, Kohyama K, Tanuma N, Matsumoto Y. Diagnosis and assessment of preclinical and clinical autoimmune encephalomyelitis using peripheral blood lymphocyte TCR. *Eur. J. Immunol.* 1998;28(9):2751–2759.
35. Gran B, Gestri D, Sottini A, et al. Detection of skewed T-cell receptor V-beta gene usage in the peripheral blood of patients with multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.* 1998;85(1):22–32.[cited 2012 May 7]
36. Musette P, Bequet D, Delarbre C, et al. Expansion of a recurrent V beta 5.3+ T-cell population in newly diagnosed and untreated HLA-DR2 multiple sclerosis patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1996;93(22):12461–12466.[cited 2012 May 7]
37. Warnke C, Mausberg AK, Stettner M, et al. Natalizumab affects the T-cell receptor repertoire in patients with multiple sclerosis. *Neurology* 2013;81(16):1400–1408.
38. Somma P, Ristori G, Battistini L, et al. Characterization of CD8+ T cell repertoire in identical twins discordant and concordant for multiple sclerosis. *J. Leukoc. Biol.* 2007;81(3):696–710.[cited 2012 May 7]
39. Degauque N, Boeffard F, Foucher Y, et al. The blood of healthy individuals exhibits CD8 T cells with a highly altered TCR Vb repertoire but with an unmodified phenotype. *PloS One* 2011;6(6):e21240.[cited 2012 May 7]
40. Sylwester AW, Mitchell BL, Edgar JB, et al. Broadly targeted human cytomegalovirus-specific CD4+ and CD8+ T cells dominate the memory compartments of exposed subjects. *J. Exp. Med.* 2005;202(5):673–685.
41. Balashov KE, Rottman JB, Weiner HL, Hancock WW. CCR5+ and CXCR3+ T cells are increased in multiple sclerosis and their ligands MIP-1 α and IP-10 are expressed in demyelinating brain lesions. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1999;96(12):6873–6878.[cited 2014 Apr 16]
42. Bö L, Peterson JW, Mørk S, et al. Distribution of immunoglobulin superfamily members ICAM-1, -2, -3, and the beta 2 integrin LFA-1 in multiple sclerosis lesions. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 1996;55(10):1060–1072.
43. Sato W, Tomita A, Ichikawa D, et al. CCR2(+)CCR5(+) T cells produce matrix metalloproteinase-9 and osteopontin in the pathogenesis of multiple sclerosis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 2012;189(10):5057–5065.
44. Giacomini PS, Rozenberg A, Metz I, et al. Maraviroc and JC virus-associated immune reconstitution inflammatory syndrome. *N. Engl. J. Med.* 2014;370(5):486–488.
45. Kothary N, Diak I-L, Brinker A, et al. Progressive multifocal leukoencephalopathy associated with efalizumab use in psoriasis patients. *J. Am. Acad. Dermatol.* 2011;65(3):546–551.
46. Schwab N, Ulzheimer JC, Fox RJ, et al. Fatal PML associated with efalizumab therapy: insights into integrin α L β 2 in JC virus control. *Neurology* 2012;78(7):458–467; discussion 465.
47. Brinkmann V, Billich A, Baumruker T, et al. Fingolimod (FTY720): discovery and development of an oral drug to treat multiple sclerosis. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2010;9(11):883–897.[cited 2014 Apr 16]
48. Kivisaakk P, Mahad DJ, Callahan MK, et al. Expression of CCR7 in multiple sclerosis: implications for CNS immunity. *Ann. Neurol.* 2004;55(5):627–638.[cited 2012 Aug 2]

49. Giunti D, Borsellino G, Benelli R, et al. Phenotypic and functional analysis of T cells homing into the CSF of subjects with inflammatory diseases of the CNS. *J. Leukoc. Biol.* 2003;73(5):584–590.
50. Ifergan I, Kebir H, Alvarez JI, et al. Central nervous system recruitment of effector memory CD8⁺ T lymphocytes during neuroinflammation is dependent on α 4 integrin. *Brain J. Neurol.* 2011;134(Pt 12):3560–3577.
51. Jilek S, Schluep M, Rossetti AO, et al. CSF enrichment of highly differentiated CD8⁺ T cells in early multiple sclerosis. *Clin. Immunol. Orlando Fla* 2007;123(1):105–113.[cited 2012 Aug 23]
52. Krumbholz M, Theil D, Steinmeyer F, et al. CCL19 is constitutively expressed in the CNS, up-regulated in neuroinflammation, active and also inactive multiple sclerosis lesions. *J. Neuroimmunol.* 2007;190(1-2):72–79.
53. Bankoti J, Apeltsin L, Hauser SL, et al. In multiple sclerosis, oligoclonal bands connect to peripheral B-cell responses. *Ann. Neurol.* 2014;75(2):266–276.

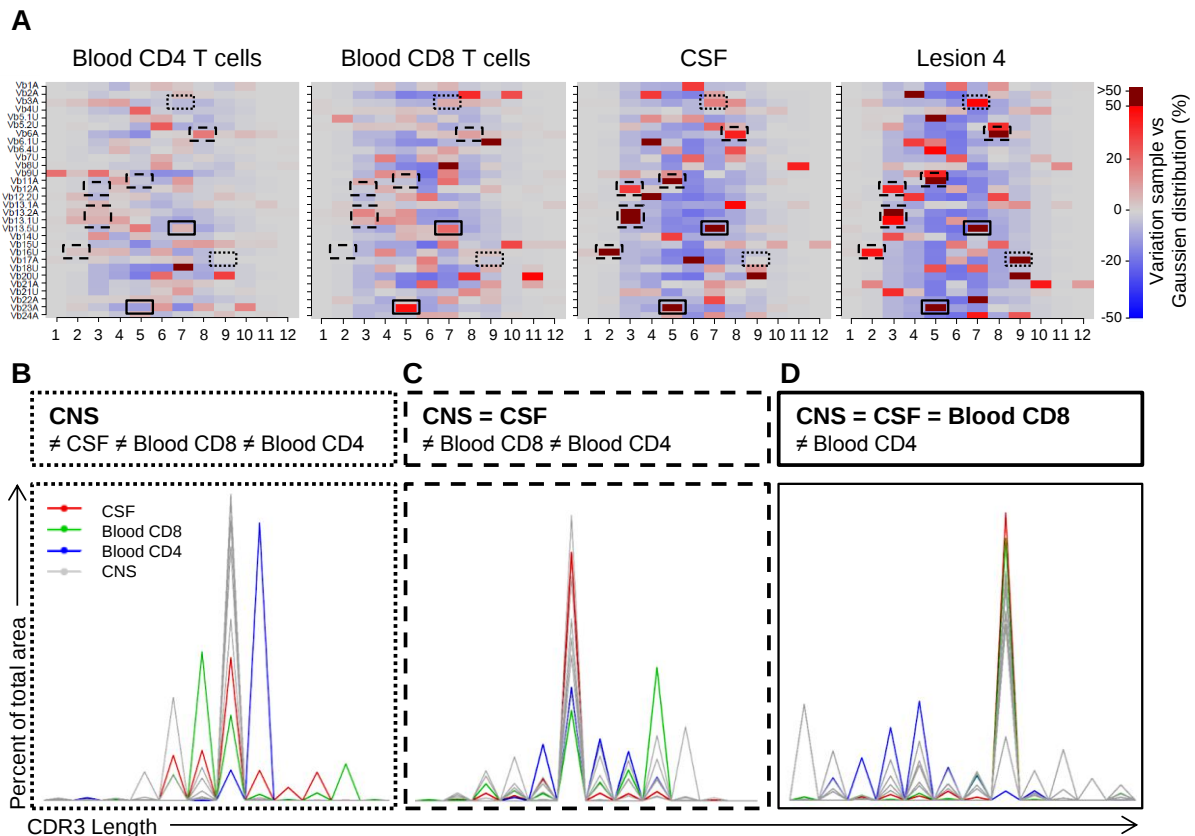


Figure 1: TCR repertoire alterations are shared between the CNS, the CSF and the blood. CDR3 spectratyping was performed on blood CD4⁺ and CD8⁺ T cells, on CSF cells and on CNS lesions from three MS patients. (A) Examples of global CDR3-LD alterations for blood CD4, blood CD8, CSF T cells and a lesion of MS3, represented by comparison with a Gaussian distribution. The y-axis represents the 30 Vβ, and the x-axis represents the 12 CDR3 lengths. The color code (blue to red) represents the perturbation from a Gaussian distribution. Three main types of alterations can be observed, as illustrated in B, C and D by superimposing the spectratypes for the CSF (red), for the blood CD8⁺ (green) and CD4⁺ (blue) T cells, and for the different CNS lesions (grey). Alterations were either present only in the CNS (dotted squares) (B), present in the CNS and in the CSF but not in the blood (dashed squares) (C), or present in the CNS, in the CSF, in the blood CD8⁺ T cells but not in the blood CD4⁺ T cells (solid squares) (D).

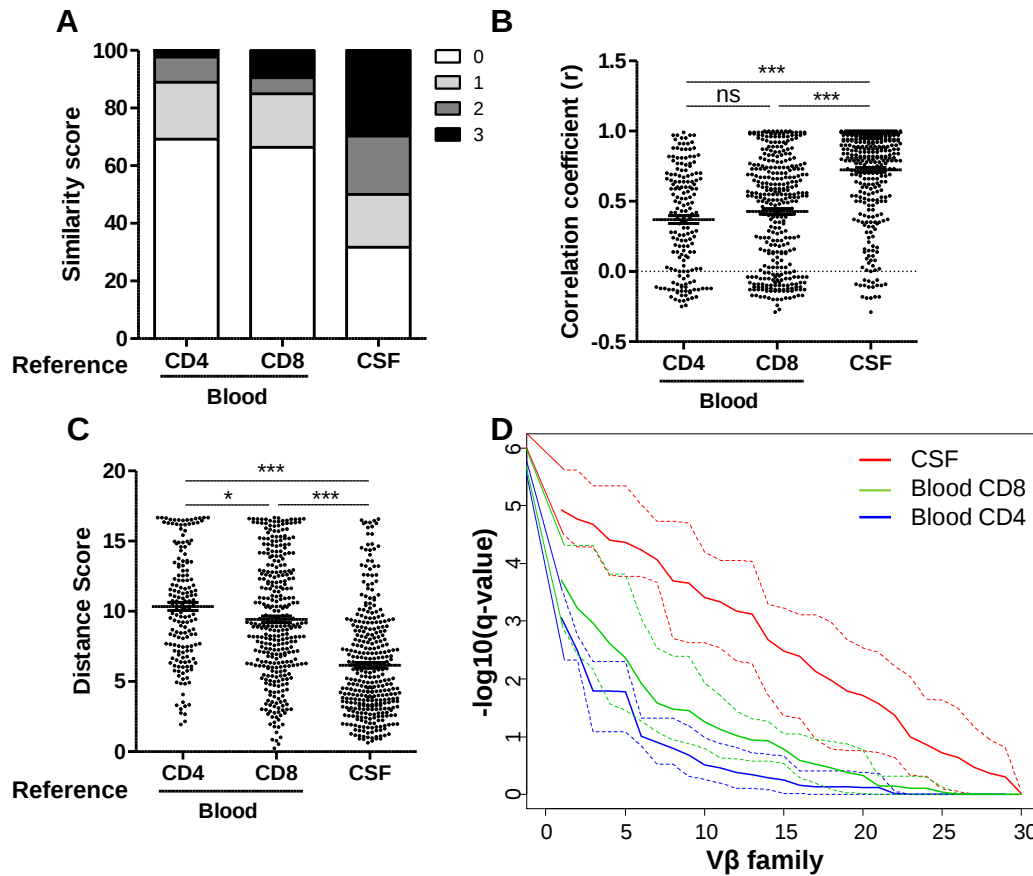


Figure 2: The TCR repertoire of the CSF is closer to the one of the CNS than the TCR repertoire of the blood. Monoclonal and oligoclonal $V\beta$ families from the blood and the CSF were compared to the corresponding families in the CNS. The comparisons were performed as described in the methods, using a similarity score (A), a correlation coefficient (B) and a distance score (C). Each dot represents a comparison for one $V\beta$ between the reference compartment and a lesion. The number of comparisons (172 for the blood CD4, 339 for the blood CD8 and 350 for the CSF) depends on the number of monoclonal and oligoclonal families of the blood and of the CSF. Data are pooled for all the lesions and for the three patients. Data are presented as percentage of total in A, and with mean $\pm$ SEM in B and C. One-way Anova was performed to compare the correlations and the distances, followed by a Bonferroni's multiple comparison test (B, C). * $p < 0.05$, *** $p < 0.0001$. (D) The graph corresponds to the ordered q-value vector (y-axis) obtained for a reference profile (blood or CSF) over all the $V\beta$ families (x-axis) as described in the methods. The solid and the dotted lines indicate the median q-value vector and the minimum/maximum q-value vector, respectively. This represents the capacity of CSF (red) and blood (green for CD8 and blue for CD4) CDR3-LD to closely approximate a CNS CDR3-LD from the same $V\beta$ family.

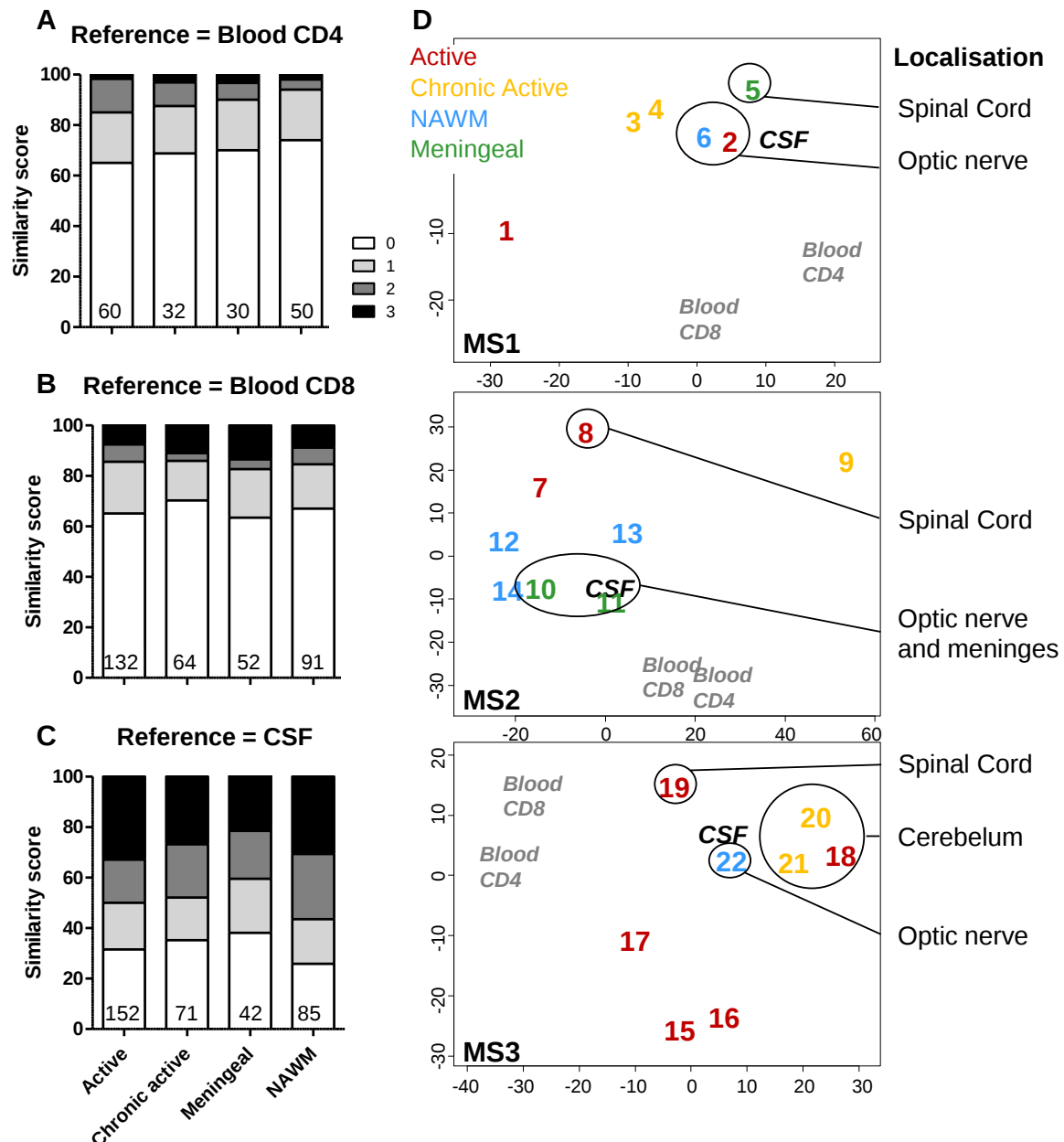


Figure 3: TCR repertoire of the CSF mirrors better that of the meninges and the optic nerves. The similarity score (as in fig. 2) is presented for the blood CD4⁺ (A) and CD8⁺ T cells (B), and the CSF T cells (C), but separating the CNS lesions according to their pathological status (active n=9, chronic active n=5, meningeal n=3, NAWM n=5). The number of comparisons performed is indicated at the bottom of the graph. Data are presented as percentage of total in A, B and C. (D) Multidimensional Scaling visualization using median Euclidian distance between all possible pairs of CDR3-LD as input. For each patient, blood CD4⁺, blood CD8⁺, CSF and the different CNS lesions (numbered 1 to 22, as in table 2) are represented. The color code stands for the lesion type: active (red), chronic active (yellow), NAWM (blue), meningeal (green).

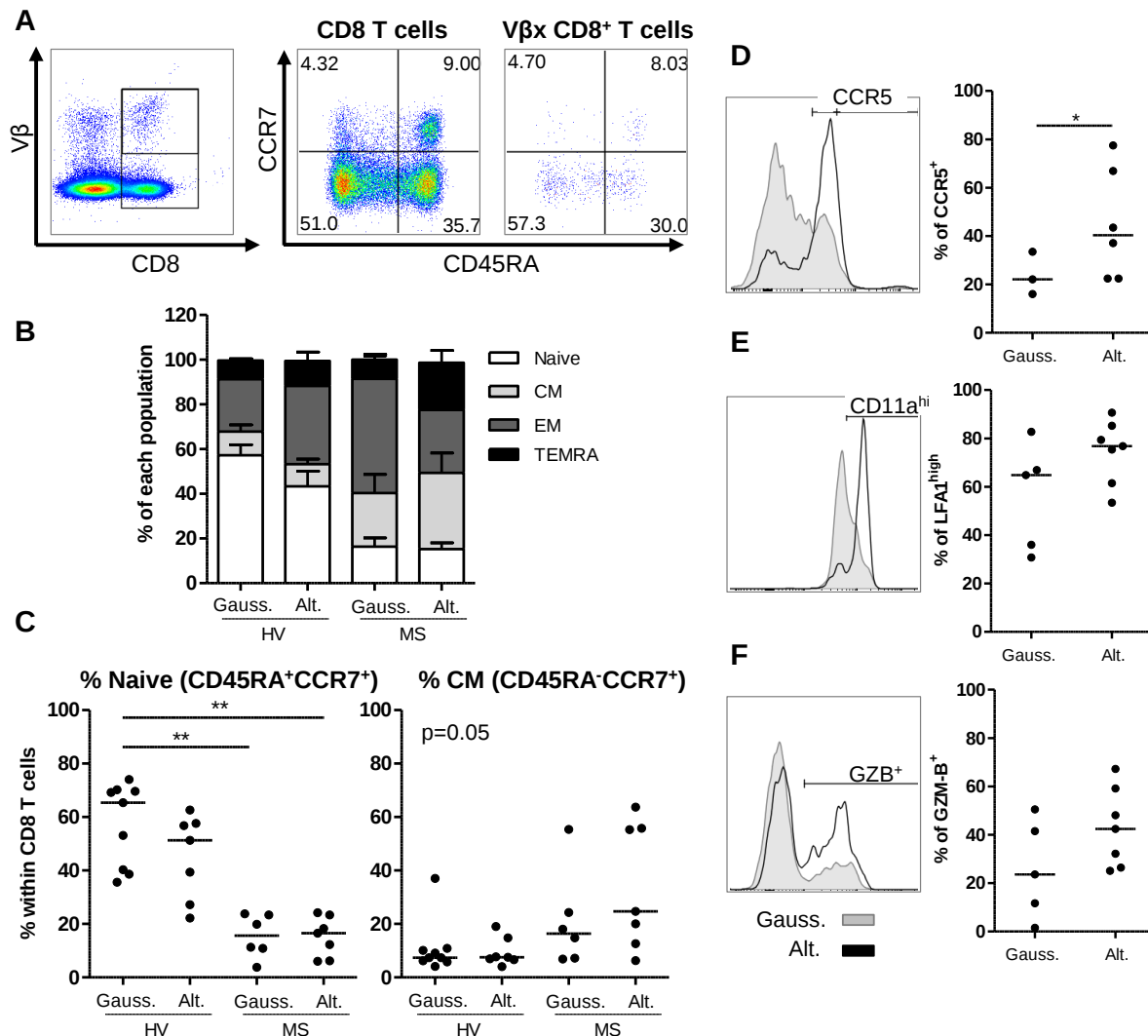


Figure 4: Altered CD8⁺ Vβ families from MS patients are biased toward the CM phenotype and express CCR5, CD11a and GZM-B. The phenotypes of blood CD8⁺ Vβ families with altered and Gaussian distributions were compared. (A) Representative dot plot staining on CD8 and on Vβ specific CD8⁺ T cells for CD45RA and CCR7. Gates were drawn according to the total CD8 population. (B) Proportions of the different subsets defined by the CD45RA-CCR7 staining for HV and MS Vβ families with altered (Alt.) (n=7 for HV and MS) or Gaussian (Gauss.) (n=9 for HV, n=6 for MS) CDR3-LD. (C) Quantification of the naïve and CM subsets for HV and MS Vβ altered and Gaussian families. The line indicates the median. A Kruskal-Wallis test followed by a Dunn's Multiple comparison Test were performed. **p<0.01. (D-F) Histogram of one representative patient and quantification of the expression of CCR5 (D), CD11a^{high} (E) and GZB (F) on Gaussian and altered CD8⁺ T cells for the different patients studied. The line indicates the median. A Mann-Whitney test was performed to compare two groups. *p<0.05, **p<0.01.

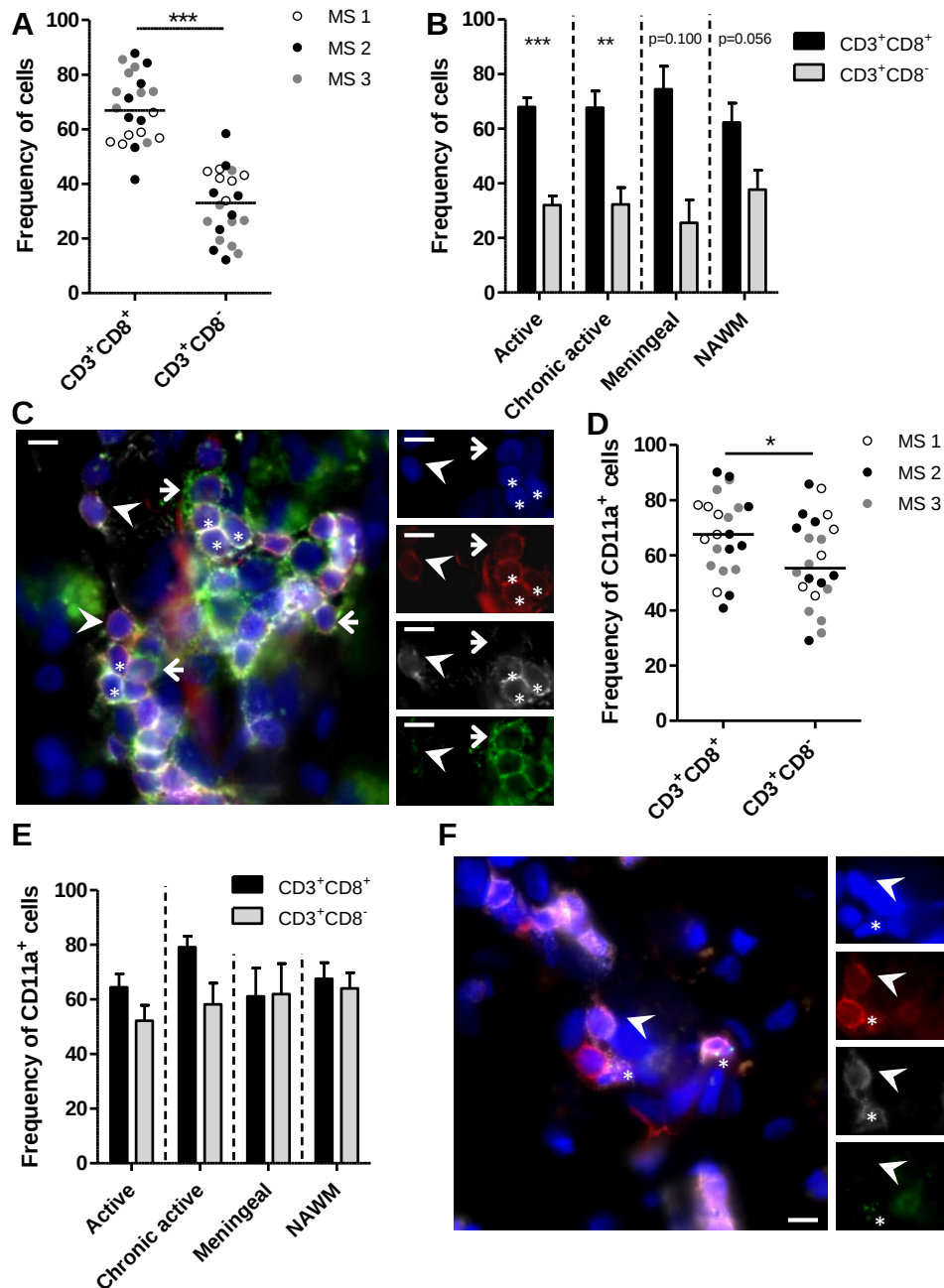
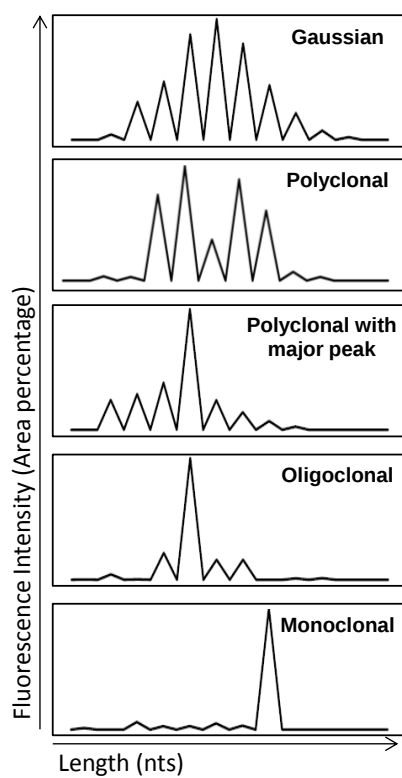
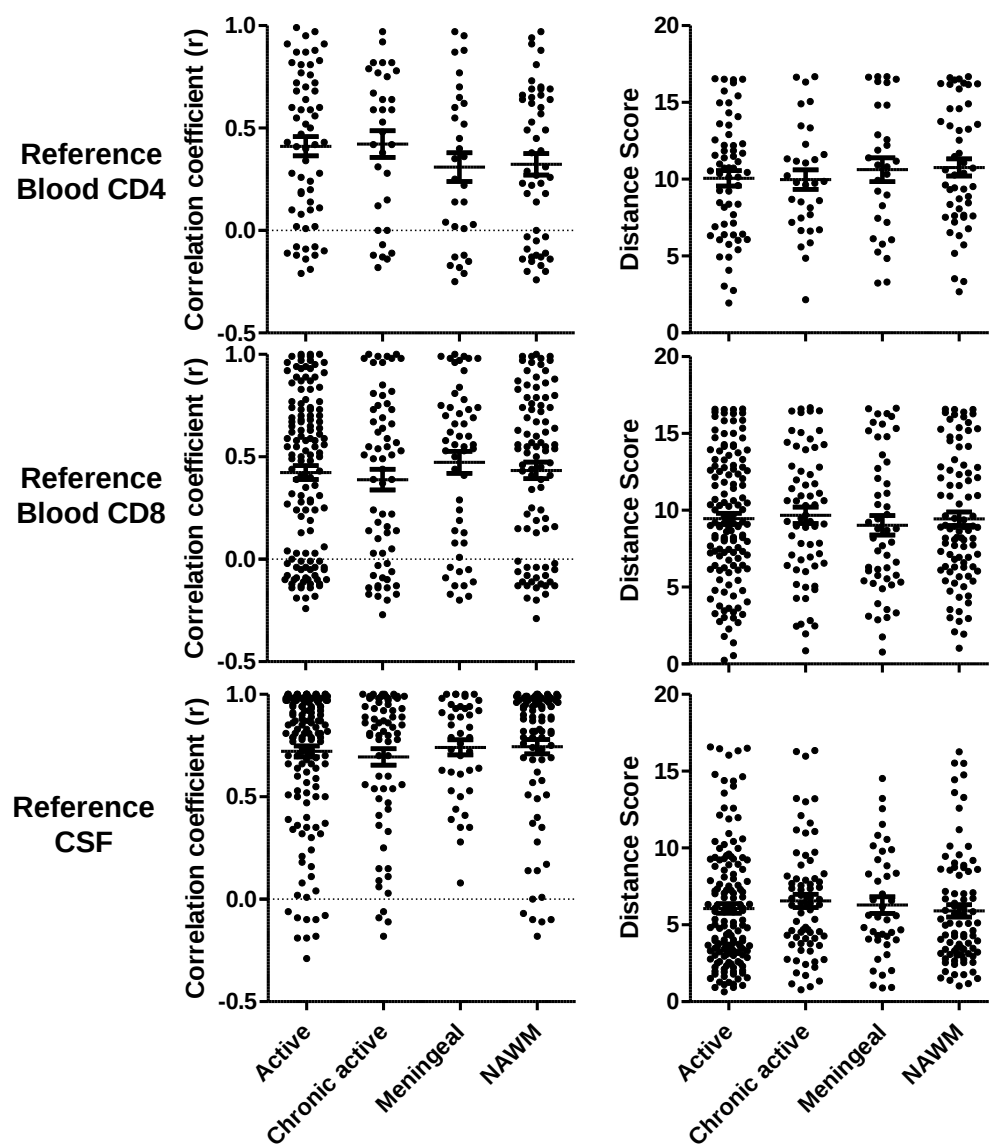


Figure 5: Infiltrating T cells are mainly CD8⁺ T cells and express CD11a and GZM-B. Immunofluorescent staining was performed on 22 lesions from 3 MS patients. (A-B) Frequency of CD8⁺ and CD8⁻ T cells within CD3⁺ T cells in the lesions according to the patient (A) and to the lesion type (active n=9, chronic active n=5, meningeal n=3, NAWM n=5) (B). (C) Example of staining with CD3 (red), CD8 (white), DAPI (blue) and CD11a (green). (D-E) For CD11a, quantification according to the patient (D) and to the lesion type (E) is presented, as described in A. (F) Example of staining with CD3 (red), CD8 (white), DAPI (blue) and GZM-B (green). Arrowheads show CD3⁺CD8⁺ T cells negative for the green marker. Arrows and stars show respectively CD3⁺CD8⁻ and CD3⁺CD8⁺ T cells positive for the green marker. The line on the pictures indicates 20μm. On the dot plot, the median is indicated. On the histograms, mean±SEM is presented. A Mann-Whitney test was performed to compare two groups. **p<0.01, ***p<0.001



Supplementary figure 1: Examples of the different CDR3-LD distributions as described in the methods.



Supplementary figure 2: The repertoire in the periphery does not mirror a particular lesion type. Monoclonal and oligoclonal V β families from the blood and the CSF were compared to the corresponding families in the CNS (correlation coefficients and distance scores), as described in figure 2. The lesions were separated according to their classification as active (n=9), chronic active (n=5), meningeal (n=3) and NAWM (n=5).

Table 1: Demographical and clinical characteristics of the patients and HV at sampling

Patient	Age	Gender	Disease duration (years)	Disease type	EDSS	In the preceding year		Death-sampling interval	Cause of death	Treatments history	Last treatment-sampling interval	HLA typing
						Gd ⁺ lesions	Number of relapses					
MS 1	45	M	12	SP	8.5	0	0	12 hours	Breast cancer	Azathioprine-Cyclophosphamide Mitoxantone-Interferon Methotrexate	24 months	A*0301/2402 B*0702/0761/1402 DRB1*0102/1501 DQB1*0501/0602
MS 2	66	F	10	PP	7.5	0	0	6 hours	Pulmonary infection	none	Treatment naïve	A*0201/3201 B*0702/0761/3501(3542) DRB1*1101/1302 DQB1*0301(0322)/0604(0639)
MS 3	54	F	23	PP	9	0	0	8 hours	Pulmonary infection	Mitoxantone	120 months	A*0101/1101 B*0801/4403 DRB1*0301(0350)/1301 DQB1*0201/0603
Mean	54											
MS 4	33	M	1	RR	4	6	2	N/A	N/A	none	Treatment naïve	-
MS 5	33	F	10	RR	2.5	0	2	N/A	N/A	Glatiramer acetate	3 months	-
MS 6	39	F	20	RR	4	1	1	N/A	N/A	Azathioprine	5 months	-
MS 7	48	M	26	RR	3	1	1	N/A	N/A	MMF	2 months	-
Mean	38											
HV 1	47	F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HV 2	28	F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HV 3	37	F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HV 4	52	M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mean	40											

F = Female, M = Male, N/A = Not Applicable, Gd = Gadolinium
For HLA typing, the number in parenthesis is the rare alleles that cannot be excluded from the typing

Table 2: Characteristics of the investigated lesions

Patient	Lesion	Anatomical location	Classification
MS 1	1	Parietal white matter	Active
	2	Optic nerve	Active
	3	Frontal white matter	Chronic active
	4	Parietal white matter	Chronic active
	5	Lumbar spinal cord	Meningeal
	6	Optic nerve	NAWM
MS 2	7	Frontal white matter	Active
	8	Cervical spinal cord	Active
	9	Cerebellar white matter	Chronic active
	10	Optic nerve + meninges	Meningeal
	11	Meninges	Meningeal
	12	Frontal white matter	NAWM
	13	Corpus Callosum (frontal)	NAWM
	14	Frontal lobe	NAWM
MS 3	15	Frontal white matter	Active
	16	Frontal white matter	Active
	17	Frontal white matter	Active
	18	Cerebellar white matter	Active
	19	Spinal cord	Active
	20	Cerebellar white matter	Chronic active
	21	Cerebellar white matter	Chronic active
	22	Optic nerve	NAWM

NAWM = Normal Appearing White Matter

Table 3: Comparison of the Vβ families of the blood and the CSF with mono and oligoclonal CDR3-LD with the distributions in the CNS

		Comparison Blood CD4 → CNS		Comparison Blood CD8 → CNS		Comparison CSF → CNS	
Patient	CDR3-LD	N° of blood CD4 Vβ families	N° of Vβ CNS families with similar alterations*	N° of blood CD8 Vβ families	N° of Vβ CNS families with similar alterations*	N° of CSF Vβ families	N° of Vβ CNS families with similar alterations*
MS 1	Monoclonal	1	0	2	2	3	3
	Oligoclonal	9	3	12	4	6	4
	Total	3/10 (30%)		6/14 (43%)		7/9 (78%)	
MS 2	Monoclonal	0	0	2	1	2	2
	Oligoclonal	13	3	21	9	18	12
	Total	3/13 (23%)		10/23 (43%)		14/20 (70%)	
MS 3	Monoclonal	1	1	1	1	4	4
	Oligoclonal	3	0	12	2	16	14
	Total	1/4 (25%)		3/13 (23%)		18/20 (90%)	
Total for the 3 patients		26%		36%		79%	

* in at least one CNS location
Similarity score was used.

Supplementary table 1: Characteristic of the antibodies used.

Antibody	Clone	Fluorochrome	Provider	Application
CCR5 (CD195)	2D7/CCR5	PE-Cy7	BD Biosciences	<i>FC</i>
CCR7	3D12	PE-Cy7	BD Biosciences	<i>FC</i>
CD11a (LFA1)	HI111	PE-Cy5	BD Biosciences	<i>FC</i>
CD11a (LFA1)	G43-25B	FITC	BD Biosciences	<i>IHF</i>
CD27	CLB-27/1	Qdot 605	Invitrogen	<i>FC</i>
CD28	CD28.2	PE	BD Biosciences	<i>FC</i>
CD3	poly	purified	DAKO	<i>IHC</i>
CD45RA	HI100	PE-Cy5	BD Biosciences	<i>FC</i>
CD68	KP1	purified	Cliniscience	<i>IHC</i>
CD8	RPA-T8	BD Horizon V450	BD Biosciences	<i>FC</i>
CD8	RPA-T8	Alexa 647	BD Biosciences	<i>IHF</i>
Granzyme B	GB11	Alexa 647	BD Biosciences	<i>FC</i>
Granzyme B	GB11	FITC	Biolegend	<i>IHF</i>
PSGL1 (CD162)	FLEG	APC	eBioscience	<i>FC</i>
TCR V β 18	BA62.6	PE	Beckman Coulter	<i>FC</i>
TCR V β 17	E17.5F3.15.13	PE	Beckman Coulter	<i>FC</i>
TCR V β 14	CAS1.1.3	FITC	Beckman Coulter	<i>FC</i>
TCR V β 3	CH92	FITC	Beckman Coulter	<i>FC</i>
TCR V β 13.2	H132	PE	Beckman Coulter	<i>FC</i>
TCR V β 12	VER2.32.1	PE	Beckman Coulter	<i>FC</i>
TCR V β 20	ELL1.4	PE	Beckman Coulter	<i>FC</i>
TCR V β 16	TAMAYA1.2	FITC	Beckman Coulter	<i>FC</i>
TCR V β 2	MPB2D5	PE	Beckman Coulter	<i>FC</i>
TCR V β 13.1	IMMU 222	PE	Beckman Coulter	<i>FC</i>
TCR V β 5.2	36213	PE	Beckman Coulter	<i>FC</i>
anti-Rabbit IgG		Alexa 568	Invitrogen	<i>IHF</i>
anti-FITC		Alexa 488	Invitrogen	<i>IHF</i>

FC = Flow Cytometry, IHF = Immunohistofluoresence, IHC = Immunohistochemistry

Supplementary table 2: Primers used for the CDR3 spectratyping

Vb family	Primer	Sequence	Patient and HV blood	Autopsy samples
1	BV1A	CAACAGTTCCTGACTTGAC	x	x
2	BV2A	TCAACCATGCAAGCCTGACCT	x	x
3	BV3A	TCTAGAGAGAAGAAGGAGCGC	x	x
4	BV4A	CATATGAGAGTGGATTTGTCATT	x	
	BV4U	TACCGTCAGCAACCTGGACA		x
	BV5.1A	TTCAGTGAGACACAGAGAAAC	x	
5	BV5.2A	CCTAACTATAGCTCTGAGCTG	x	
	BV5.1U	GGGCCTTCAGTTCCTCTTTG		x
	BV5.2U	AGCTGAATGTGAACGCCTTG		x
	BV6A	AGGCCTGAGGGATCCGTCTC	x	x
6	BV6.1U	GATCACACAGGTGCTGGAGTCT		x
	BV6.4U	ATCCAATTTCTGAACACAACCG		x
7	BV7A	CTGAATGCCCCAACAGCTCTC	x	
	BV7U	CAAGTCGCTTCTCACCTGAATG		x
8	BV8A	TACTTTAACAACAACGTTCCG	x	
	BV8U	TTCTGGTACAGACAGACCATGATG		x
9	BV9A	AAATCTCCAGACAAAGCTCAC	x	
	BV9U	TCTTCACATCAATTCCCTGGAG		x
11	BV11A	ACAGTCTCCAGAATAAGGACG	x	x
12	BV12A	GACAAAGGAGAAGTCTCAGAT	x	x
	BV12.2U	AGACCTGGGACATGGGCTG		x
	BV13.1A	GACCAAGGAGAAAGTCCCCAAT	x	x
13	BV13.2A	GTTGGTGAGGGTACAACTGCC	x	x
	BV13.1U	TCGACAAGACCCAGGCATG		x
	BV13.5U	GATGGTTATAGTGTCTCCAGAGCAA		x
14	BV14A	TCTCGAAAAGAGAAGAGGAAT	x	
	BV14U	AGGGAGATGTTTCTGAAGGGTA		x
15	BV15A	GTCTCTCGACAGGCACAGGCT	x	
	BV15U	TCTGATGGATACAGTGTCTCTCGAC		x
16	BV16A	GAGTCTAAACAGGATGAGTCC	x	
	BV16U	TCTACTCTGAAGGTGCAGCCTG		x
17	BV17A	CACAGATAGTAAATGACTTTCAG	x	x
18	BV18A	GAGTCAGGAATGCCAAAGGAA	x	
	BV18U	CTTATTTCTGTGCCAGCTCACC		x
20	BV20A	TCTGAGGTGCCCCAGAATCTC	x	
	BV20U	GCTGCTCTTCTACTCCGTTGG		x
21	BV21A	GATATGAGAATGAGGAAGCAG	x	x
	BV21U	CTCCACTCTCAAGATCCAGCCT		x
22	BV22A	CAGAGAAGTCTGAAATATTCGA	x	x
23	BV23A	TCATTTTCGTTTTATGAAAAGATGC	x	x
24	BV24A	AAAGATTTTAACAATGAAGCAGAC	x	x

Primers with 'A' and 'U' originate from different papers (Monteiro et al., 1995) and (Laplaud et al., 2004), respectively). All primers are named according to the nomenclature of Arden (Arden et al., 1995).

II. ARTICLE 2 : DEREGLATION DES CELLULES MAIT DANS LA SEP – ARTICLE EN PREPARATION

Les LT CD8⁺ et notamment les LT CD8⁺ producteurs d'IL-17 ont été impliqués dans la physiopathologie de la SEP. Les cellules MAIT font partie de cette population de LT, mais leur implication dans la maladie reste mal décrite. Nous avons travaillé à partir d'échantillons de sang d'une cohorte nantaise de patients et de témoins afin de déterminer si leur fréquence, leur phénotype et leur profil transcriptionnel étaient spécifiques de la maladie. En parallèle, le profil d'activation de ces cellules par une stimulation bactérienne engageant le TCR a été déterminé. La SEP étant une maladie du SNC, nous avons aussi étudié la présence de cellules MAIT au sein du SNC de 13 patients différents, ainsi que l'expression de MR1 et des cytokines IL-12 et IL-18, qui peuvent influencer sur la fonction des cellules MAIT. Leur capacité de transmigration à travers une barrière hématoencéphalique *in vitro* a aussi été étudiée. Bien que la fréquence des cellules MAIT dans le sang ne semble pas différente chez les patients et les témoins, ces cellules surexpriment des gènes suggérant un profil suractivé dans la SEP. En revanche, l'étude de l'activation et de la sécrétion d'IFN γ après stimulation du TCR révèle que le potentiel des cellules MAIT des patients et des témoins est le même. Bien que les cellules MAIT des patients expriment plus de PSGL-1 et CD11a, molécules impliquées dans la migration dans les tissus, et notamment dans le SNC, elles sont retrouvées en faible quantité dans le cerveau, ce qui suggère qu'elles aient plus un rôle non spécifique dans la maladie. Leur faible capacité de transmigration corrèle bien avec cette faible quantité *in situ*. En conclusion, bien que présentant divers marqueurs de dérégulation en périphérie, les cellules MAIT des patients SEP ne semblent pas impliquées de manière active dans la maladie, mais le microenvironnement cérébral est certainement favorable à leur activation, ces cellules pouvant alors avoir un rôle délétère non spécifique (*bystander*) *in situ*.

Cet article est en préparation. Les figures puis les tableaux sont présentés à la suite du texte.

DYSREGULATION OF MUCOSAL ASSOCIATED INVARIANT T CELLS IN PATIENTS WITH MULTIPLE SCLEROSIS.

M. Salou^{1,2¶}, B. Nicol^{1,2¶}, A. Garcia^{1,3}, D. Baron^{1,2,3}, L. Michel^{1,4}, A. Elong Ngono^{1,2}, P. Hulin⁶, S. Nedellec⁶, M. Jacq-Foucher⁷, F. Le Frère⁷, N. Jousset⁷, S. Wiertlewski^{4,7}, JP. Souillou¹, S. Brouard^{1,3}, A. Nicot¹, N. Degauque^{1,3*}, DA Laplaud^{1,4,7*}

1. INSERM, UMR 1064, Nantes, F-44093, France. 2. Université de Nantes, Faculté de Médecine, Nantes, F-44035, France. 3. CHU de Nantes, ITUN, Nantes, F-44093, France. 4. CHU de Nantes, Département de Neurologie, Nantes, France. 5. CHU de Nantes, Département de Pathologie, Nantes, France. 6. SFR François Bonamy, Cellular and Tissue Imaging Core Facility (MicroPICell), Nantes, France. 7. INSERM 004, Centre d'Investigation Clinique, Nantes, France. ¶These authors contributed equally to the work. *Both senior authors, listed by alphabetical order

Corresponding author: David-Axel Laplaud, David.laplaud@univ-nantes.fr

INSERM UMR 1064, 30 Bd J. Monnet, 44093 Nantes Cedex 1, France

Tel: + 33 240087410/Fax: + 33 240087411

Word Count:

Text: 5,413

Abstract: 329

Key words: Multiple sclerosis – Mucosal Associated T cells - Central Nervous System

Abbreviations: CNS: central nervous system - HV: Healthy Volunteers - IBD: Inflammatory Bowel Disease - LAG3: Lymphocyte-Activation Gene 3 - LFA: Lymphocyte Function-associated Antigen - MAIT: Mucosal Associated Invariant T - MFI: Mean Fluorescence Intensity - MOI: Mean Of Infection - MR1: MHC class I-related protein 1 - MS: Multiple Sclerosis - PP: Primary Progressive - RR: Relapsing Remitting - SP: Secondary Progressive - TLDA: TaqMan Low Density Array

ABSTRACT.

Introduction: Mucosal Associated Invariant T (MAIT) cells are anti-bacterial T cells bearing a semi-invariant T cell receptor (V α 7.2-J α 33). To date, divergent results were obtained about their implication into the pathophysiology of multiple sclerosis (MS).

Objectives: Deciphering the role of MAIT cells in the inflammatory process of MS.

Methods: MAIT cells frequency was studied *ex vivo* in the blood of MS patients (n=50) as compared to age- and sex- matched healthy volunteers (HV, n=30). The *ex vivo* phenotype and the transcriptional profile of blood MAIT cells were analyzed by flow cytometry and TaqMan low density array. *In vitro* experiments were performed with blood MAIT cells from HV and MS, to compare their activation after TCR stimulation and their transmigration abilities through an *in vitro* blood brain barrier. Immunofluorescent staining of MAIT cells with anti-CD3/CD161/V α 7.2 was performed on 39 central nervous system (CNS) lesions from 13 MS patients, and MR1, IL-12 and IL-18 gene expression was tested.

Results: MAIT cells frequency is decreased in the blood of progressive MS (p<0.01), who are older, as compared to relapsing-remitting MS and HV. In MS patients, LAG3 and CD244 were downregulated in qPCR experiments, but no difference in activation markers or IFN γ -secretion after bacterial stimulation was observed. MAIT cells from MS patients exhibited increased surface expression of PSGL-1 (p<0.01) and CD11a (p<0.05), suggesting an increased migration potential into the CNS. However, MAIT cells were identified in CNS lesions at a low frequency, representing between 0 to 3% of total infiltrating T cells. A low transmigration rate was suggested by the *in vitro* experiments, and could explain that low frequency in the CNS. IL-12 and IL-18 are expressed in the brain of MS patients, together with a low expression of MR1, suggesting that the CNS microenvironment could shape MAIT cells response profile.

Conclusion: MAIT cells from MS patients and HV have similar activation abilities. Their rarity in MS lesions suggests a by-stander implication in the disease, but the CNS microenvironment seems suited to activate them.

INTRODUCTION

Numerous lines of evidence suggest the involvement of CD8⁺ T cells in the pathophysiology of MS, an inflammatory disease of the central nervous system. These cells are more suited to damage the CNS as compared to CD4⁺ T cells and have been found to predominate in white matter lesions¹⁻³. These infiltrating CD8⁺ T cells have a limited repertoire, suggesting an antigen-driven infiltration or an *in situ* proliferation^{3,4}. Interestingly, numerous IL-17-secreting T cells, both CD4⁺ and CD8⁺, were found within CNS lesions, reaching 80% of the total T cells within active and chronic active lesions⁵.

In humans, IL-17-producing CD8⁺ T cells express high levels of CD161, IL-18R α , IL23R and ROR γ T and are almost all comprised within the Mucosal Associated Invariant T (MAIT) subset⁶⁻⁸. MAIT cells, mainly CD8⁺CD4⁻ and CD8⁻CD4⁻ T cells, are a subset of innate effector memory T cells bearing a semi-invariant TCR (V α 7.2-J α 33/12/20 in humans)⁷⁻¹². These cells, mainly found in the liver and in the gut, represent up to 8-10% of the circulating blood T cells⁹. They are restricted to the non classical MHC class I-related protein 1 (MR1) and are activated by vitamin B2 derivatives and pyrimidic adducts from different strains of bacteria and yeasts¹²⁻¹⁴. Accordingly, several studies have demonstrated the antimicrobial properties of MAIT cells, both *in vitro* and *in vivo*¹⁵⁻¹⁸. Once the TCR is engaged, these cells secrete variable amounts of cytokines, especially IFN γ and TNF α ^{9,17,19}. They also exert cytotoxic functions in coculture with MR1-overexpressing HeLa cells infected with different bacteria, by secreting granzyme B (GZM-B), perforin and granulysin²⁰. Finally, MAIT cells express a wide range of homing receptors such as CCR5, CCR6, α 4 β 1, suggesting an ability to migrate to inflamed tissues⁹.

The implication of MAIT cells in MS remains elusive but their proinflammatory pattern may suggest their implication in the lesion process. Indeed, MAIT cells were shown to be present in MS lesions, representing approximately 5% of infiltrating CD8⁺ T cells²¹⁻²³. Nevertheless, their function and frequency in periphery remains controversial. Indeed, as compared to healthy volunteers (HV), one study reported an increased amount of MAIT cells in the blood²⁴, while others observed a decreased frequency correlated with the clinical activity of the disease^{23,25}. However, to date, it is not known if MAIT cells from patients with MS have a specific phenotypic pattern and function.

Deciphering whether MAIT cells are implicated in the disease, even without a specific defect in MS, is important for understanding the pathophysiology and developing new therapies. Here, we investigate the frequency, phenotype and function of MAIT cells in a cohort of untreated relapsing-remitting and progressive patients with MS. As compared to HV, we show that blood MAIT cells from MS patients have a lower expression of co-inhibitory molecules together with an increased expression of homing markers such as PSGL-1 and CD11a. MAIT cells are present in CNS lesions of MS patients, but at a low frequency, consistent with their low transmigration rate.

MATERIAL AND METHODS

Human samples: Blood samples from MS patients, patients with inflammatory bowel diseases (IBD) and HV were obtained from Nantes hospital together with sex- and age-matched HV (CHU, Hôpital Nord Laennec). All experiments were performed on fresh blood samples less than two hours after sampling. Cumulatively, 74 samples from patients with relapsing-remitting (RR) MS, 7 from patients with secondary progressive (SP) MS, 8 from patients with primary progressive (PP) MS, 15 from patients with IBD (13 Crohn's disease and 2 ulcerative colitis) and 53 from HV were included in this study. For seven MS patients, paired samples of blood and cerebrospinal fluid (CSF) were obtained. The clinical and demographical characteristics of all patients and HV are summarized in table 1. MS patients had not received any disease modifying drugs for at least 6 months before sampling. IBD patients were either untreated (n=4) or treated with conventional immunosuppressant (n=4), anti-TNF α (n=3) or immunomodulator (n=4). For the different experiments, groups equivalent in sex and age were used within the above described cohort. The disease was considered as active when the patients presented a gadolinium enhancing lesion and/or a relapse during the month preceding or following the blood sample.

CNS samples from 10 MS patients were obtained from the UK MS tissue bank (Imperial College, London, approved by the Multicentre Research Ethics Committee, number 08/MRE09/31). Samples of brain and spinal cord of three patients from our local sample collection were also used (Biomedicine Agency identification number PFS13-003). CNS samples were characterized after Luxol Fast blue, CD3, CD68 and HLA-DR staining on 10 μ m serial sections. Lesions were classified as active (demyelination and homogeneous inflammatory infiltrate), chronic active (demyelination and inflammatory infiltrate at the surroundings), NAWM (no demyelination) with or without inflammatory infiltrate, and meningeal (infiltrate mainly localized in the meninges).

All donors provided informed consent in compliance with our local University hospital ethical committee. MS was diagnosed according to the Mc Donald 2005 Criteria²⁶.

MAIT cells frequency and phenotype: PBMCs were isolated using a standard Ficoll gradient according to the manufacturer's protocol (Eurobio). MAIT cells were studied by multi-color flow cytometry using the following antibodies (see supplementary table 1 for antibody

characteristics): CD3, CD4, CD8, CCR5, CCR7, CD27, CD28, PSGL-1, CD69, CD25, CD58, CD161, CD45RA, CD57, Vα7.2, CD62L, CD11a, CD49d, CD95, CD244, IFNγ, GZM-B. Dead cells were excluded from the analysis using LIVE/DEAD Fixable Aqua stain (Invitrogen) according to the manufacturer's guidelines. Unless stated otherwise, MAIT cells are characterized as CD3⁺CD161^{hi}Vα7.2⁺ cells, and samples that contained less than 500 CD3⁺MAIT cells were excluded from the phenotype analyses. For intracellular staining, cells were stained for viability and extracellular markers, permeabilized and fixed with Perm/Fix reagent (BD Biosciences) before labelling with the appropriate antibodies. Samples were acquired with a LSRII (BD Bioscience) on FACS DIVA software (version 6.1.3, BD Biosciences) and analyzed with FlowJo Software (V7.6.5, TreeStar). Application settings and rainbow beads (BD Bioscience) were used to monitor the lasers intensity, which is especially important for mean fluorescence intensity (MFI) analyses.

TaqMan Low Density Array (TLDA): *Ex vivo* transcriptional analysis of CD8⁺ MAIT cells from HV and MS patients was performed using a customized TLDA card (Applied Biosystems) to analyze the expression of a set of 96 genes (92 genes and 4 housekeeping genes). The 92 genes were chosen for their implication in CD8 lineage differentiation and effector functions and were selected from published DNA chip studies performed on purified CD8⁺ T cells subsets, with a special focus on genes associated with cytotoxic functions, anergy, exhaustion and memory phenotype^{27–33}. Our set of genes was validated in the lab to discriminate between differentiation as well as naïve versus activated subsets (data not shown). Fresh PBMC from 8 sex- and age-matched HV and RR-MS patients were isolated and the experiments were run in parallel. T cells were sorted with an AutoMACS cell sorter (Miltenyi) by negative selection (Pan T cell isolation Kit II, Miltenyi). CD8⁺ MAIT cells were then isolated (>88% purity) with a high speed cell sorter (FACS Aria II, BD Biosciences) using the following antibodies (see supplementary table 1 for antibody characteristics): CD8, CD161, Vα7.2, and DAPI to exclude dead cells. RNA was extracted using the RNeasy micro kit (Qiagen) according to the manufacturer's guidelines. RNA concentration and integrity were checked using a spectrophotometer (ND-1000, Nanodrop Technologies) and a picoRNA Chip (Agilent®), respectively. The RNA integrity number was comprised between 8.9 and 9.8. Amplification and reverse transcription of the RNA (18.2 ng) was performed using the CellAmp kit (TaKaRa) according to the manufacturer's instructions. The TLDA card was then

loaded using the whole amplification product, and amplification was performed in duplicates, using a Viia7 (Applied Biosystems). Data were collected in Sequence Detection System files which were then uploaded into Relative Quantification Manager software (Life Technologies) for automated data analysis of expression values. Normalization was performed using the mean level of three endogenous control genes (HPRT1, GAPDH, 18S).

MAIT cell activation: For *in vitro* activation, V α 7.2⁺ cells were isolated from PBMC with an Automacs cell sorter (Miltenyi) after staining with a biotinylated V α 7.2 antibody and anti-biotin magnetic beads (both from Miltenyi), according to the manufacturer's protocol. In parallel, 20,000 HeLa cells stably transfected with MR1 (HeLa-MR1, gift from Pr T. Hansen), or 20,000 untransfected HeLa cells were cultured in DMEM (Gibco) without supplement at 37°C with *Escherichia coli* (Dh5 α strain) diluted at various means of infection (MOI). After 3 hours, HeLa cells were washed twice with PBS and incubated 1 hour at 37°C with DMEM supplemented with 10% fetal calf serum (Biowest) and 50 μ g/ml gentamicin (Gibco). Purified V α 7.2⁺ T cells (1.10⁵ per well, 96-well plates) were added in DMEM supplemented with 10% fetal calf serum, 1% Penicillin-streptomycin (Invitrogen), 1% glutamine (Sigma) for an overnight incubation at 37°C. For blocking conditions, anti-MR1 (26.5, Pr Hansen's gift), anti class-I HLA (W6/32) or IgG2a isotype control (BD Biosciences) at 10 μ g/ml final concentration were added. Activation was assessed by flow cytometry using CD8, CD161, V α 7.2, CD69, CD25, IFN γ and LIVE/DEAD Fixable Aqua stain (Invitrogen)²⁰.

Immunofluorescence analysis of post-mortem brain samples: CNS samples from 10 MS patients from the UK MS tissue bank (2 lesions per patient), and from 3 patients of our local biobank (8, 8 and 6 lesions per patient) were used (total of 42 lesions). Ten μ m frozen sections were unfrozen, fixed in ethanol 100% (VWR), rinsed in PBS and incubated 30 minutes in blocking solution consisting of PBS, 10% normal goat serum (Sigma-Aldrich), to prevent non-specific staining. Sections were stained by overnight incubation at 4°C with purified anti-CD3, anti-CD161 and anti-V α 7.2 antibodies (see supplementary table 1 for antibody characteristics) diluted in the blocking solution. The corresponding secondary antibodies were incubated for 2h at room temperature in blocking solution: anti-mouse IgG1-Alexa 488, anti-mouse IgG2a-Alexa 468, anti-rabbit-Alexa 647. After a 10-minute incubation in PBS 1% DAPI, slides were mounted using prolong antifade reagent (Invitrogen). Sections from the 42 lesions were observed on an Axiovert 200m microscope (Zeiss), at a 20x

(NA0.75) optic magnification. Images were acquired in a sequential mode with an AxioCamR camera using Axiovision Software. The number of CD161⁺Vα7.2⁺ MAIT cells was counted when more than 50 CD3⁺ T cells could be observed. Therefore, the results are presented for 39 lesions, for which 52 to 1024 CD3⁺ T cells were counted (mean of 354 CD3⁺ T cells). MAIT cell frequency among CD3⁺ T cells was defined.

Transmigration assay: For transmigration assays, we used the human brain endothelial cell line hCMEC/D3 (Gift from PO Courraud), which has been demonstrated to closely mimic *in vitro* the characteristics of the blood-brain barrier³⁴. Cells ($2.5 \cdot 10^5$) were seeded on an 8.0 μm pore size transwell (Corning) 2 days before the migration experiment in EMB2 (Lonza) supplemented according to P.O. Courraud's protocol. The number of cells seeded was adjusted to obtain, after 2 days of culture, a one-layer barrier allowing the migration of less than 5% of Alexa-488-labelled Albumin (Life Technologies) after 6 hours, as already described³⁵. In parallel, CD8⁺ (and CD8⁻CD4⁻) T cells were negatively isolated from fresh blood with an AutoMACS cell sorter (Miltenyi) using the CD8⁺ T cell isolation kit (Miltenyi) according to the manufacturer's guidelines. The purified CD8⁺ T cells ($5 \cdot 10^5$) were suspended in 1ml of supplemented RPMI and EBM2 (50% each) and added on top of the filter. After 12 hours at 37°C, the cells below the filter ('transmigrated fraction') were collected. The cells that had not transmigrated were adherent onto the hCMEC/D3 layer and were collected after Trypsin treatment ('adhered fraction'). A control well without filter was also collected and consisted of the 'total fraction' that had not undergone the transmigration experiment. The fractions were counted and stained for flow cytometry analysis with CD3, CD4, CD8, CD161, Vα7.2 and LIVE/DEAD Fixable Aqua stain (Invitrogen). The number of transmigrated cells was obtained by using CountBright™ Absoluted Counting Beads (Life Technologies). The experiments were run in parallel for patients and HV. When stated, the barrier cell line was cultured in inflammatory conditions, by adding 100 U/ml of TNFα and IFNγ (R&D Systems) for 8 h. The relative frequency was obtained by dividing the frequency of MAIT cells within the considered fraction by the frequency of MAIT cells in the total fraction.

Quantitative PCR on frozen brain samples: Total RNA was extracted from CNS frozen sections from MS patients from the MS tissue bank using Trizol reagent (Life Technologies) according to the manufacturer's guidelines. Paired active, chronic active and NAWM lesions as well as control block from 10 patients were used. RNA concentration and integrity were

checked using a spectrophotometer and a picoRNA Chip as described above. Reverse transcription (10 µg of RNA) was performed with MML-V (Life Technologies) and poly-dT (Life Technologies) in a 50 µl final volume. RT reaction without MML-V was performed to evaluate genomic DNA contamination. One hundred ng were used for quantitative PCR using the following ready-to-use primers/probes mixes (Life technologies): MR1 (hs001155420-m1), IL-12A (p35) (hs00168405-m1), IL-18 (hs01038788-m1) and IL-23A (hs00900828-g1). HPRT (hs99999909-m1) was used for normalization. RNA from a commercialized pool of human thymuses (Life Technologies) was used as a calibrator. Amplification was performed in duplicates on a Viia7 (Applied Biosystems). Relative expression was calculated using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method, in which the calibrator represents 1-fold expression, as previously described³⁶.

Statistical analyses: Statistics were performed using PRISM software (V5.03, GraphPad Software). When comparing two groups (MS patients vs HV, blood vs CSF), a Mann-Whitney test was performed. When comparing three or more groups (HV, IBD and MS patients, quantitative PCR), Kruskal-Wallis test was performed, followed by a Dunn's multiple comparison test. $p < 0.05$ was assumed as significant for flow cytometry and quantitative PCR on CNS samples. A Spearman correlation was used to correlate the frequency of MAIT cell with the age or with the EDSS score. For the TLDA card analysis, differentially expressed genes were selected using a student's T-test with less than 1% false discovery rate ($p < 0.01$). Data (median-centred gene expression) were visualized with Treeview software³⁷.

RESULTS

MAIT cells frequency in the blood is similar between MS patients and HV but different according to the disease type.

So far, the results regarding the frequency of MAIT cells in the blood of MS patients have been controversial. Using CD161 and V α 7.2 antibodies, we identified MAIT cells among the CD3⁺ T cell population in the blood of HV, MS and IBD patients (used as an inflammatory control group, examples in fig. 1A). As already reported, the frequency of MAIT cells in the different groups was very variable, between 1 to 10%^{7,38,39}. This was not statistically different between HV and MS patients (median: 4.80% vs 3.68%, respectively), but a clear decrease was observed in the positive control IBD group (median: 1.01%, $p < 0.0001$) (fig. 1B). As compared with two previously published studies^{23,24}, no difference was observed between MS patients and HV when comparing the frequency of CD8⁺CD161^{hi} among CD3⁺ T cells (median: 4.06% for HV, 3.41% for MS, $p = 0.56$) or the frequency of CD161^{hi} within CD8⁺CD45RA⁻ cells (median: 33.0% for HV, 26.5% for MS, $p = 0.36$), both populations containing about 90% of MAIT cells (suppl. fig. 1). No difference was observed either when comparing active and inactive forms of MS (median: 4.41% vs 3.34%, respectively, $p = 0.34$) (fig. 1C). Interestingly, progressive patients had a decreased frequency of MAIT cells as compared to relapsing ones (fig. 1D, median: 2.32% vs 4.41%, $p < 0.01$). However, this decrease can be explained, at least in part, by the fact that progressive patients are older than relapsing ones (table 1): there is a negative correlation between the frequency of MAIT cells and the age of the patients (fig. 1F). This correlation is not significantly significant when only considering relapsing patients (data not shown). No correlation was observed between MAIT cell frequency and the EDSS score (fig. 1E). Finally, seven patients were sampled twice, and MAIT cell frequency was not different between these two samplings (fig. 1G).

MAIT cells from MS patients and HV differentially express genes associated with CD8 differentiation and activation status.

Blood sorted CD8⁺ MAIT cells from MS patients and HV were studied by quantitative PCR using custom TLDA cards probing expression of genes associated with CD8 activation and differentiation (suppl. table 2). The results are presented in figure 2. The majority of differentially expressed genes were downregulated in MS patients as compared to HV. These

genes were not associated to one cell function, but have implications in different processes, including cell cytotoxicity, migration and activation. Three genes were up-regulated in MAIT cells from MS patients: KLRC1 – killer cell lectin-like receptor subfamily C, also called NKG2A –, the TNF receptor-associated protein 1 TRAP1 and the TNF receptor CD27 – also used to characterize differentiation subsets of T cells. CCL4 was downregulated in MAIT cells from MS patients as compared to HV, which is consistent with the results already obtained on CD8⁺ T cells from twins discordant for MS²⁴. MAIT cells from MS patients expressed less CD58, a gene implicated in MS susceptibility that encodes the adhesion molecule lymphocyte function-associated antigen 3 LFA3⁴⁰. Interestingly, MAIT cells from MS patients expressed less LAG3 (lymphocyte-activation gene 3) and CD244, two co-inhibitory molecules, raising the possibility that they have an increased activation state or potential. However, they also express less GZM-H, GZM-K, lymphotoxin b and granulysin, suggesting a decreased cytotoxic potential at least in the periphery.

***Ex vivo* circulating MAIT cells have a similar effector phenotype between MS patients and HV.**

The transcription analysis suggested that MAIT cells from MS patients might have increased activation potential. We thus studied the expression of several effector and differentiation molecules on MAIT cells from MS patients and HV by flow cytometry (fig. 3A). As already described, *ex vivo* MAIT cells are effector memory cells CD45RA⁻CCR7⁻CD27⁺CD28⁺. They express large amounts of CD95 (Fas) but no GZM-B. MAIT cells express variable but usually low amounts of CD57, a hallmark of cytolytic T cells⁴¹. Almost all MAIT cells have extracellular expression of CD244, and some also express the activation marker CD69 in absence of any stimulation. When comparing MS patients and HV (fig. 3B-C and suppl. fig. 2), no differences were observed for these different markers, except a slight non-statistically significant increase in the expression of CD95 for MAIT cells from MS patients (p=0.05). Of note, MAIT cells express more CD244 than their CD161^{hi}Vα7.2⁻ counterparts (median: 59.45% vs 28.35% for HV, 65.65% vs 26.70% for MS patients, p<0.05 and p<0.01, respectively) (fig. 3C), suggesting that MAIT cells might be regulated by inhibitory receptors.

MAIT cells from HV and MS patients have similar activation levels when stimulated by a MR1-dependent mechanism.

Previous studies on MAIT cells in MS focused on the abilities of these cells to be activated by PMA/Ionomycin²⁵, by anti-CD3/anti-CD161²⁴ or by IL-18²³. However, their activation potential after TCR stimulation with a natural ligand has never been described. Here, we activated *ex vivo* sorted Vα7.2⁺ T cells with HeLa cells, transfected or not with MR1, and previously cultured with *Escherichia coli* at various MOI. CD25, CD69 and IFNγ expression were studied by flow cytometry as a read out of MAIT cell activation. Representative dot plots of CD25/CD69 staining on MAIT cells after overnight culture with HeLa transfected of not, infected or not, are presented in figure 4A. The frequencies of CD25⁺CD69⁺ and of IFNγ⁺ MAIT cells (CD161^{hi}Vα7.2⁺) increased in contact with HeLa transfected with MR1 cultured in growing MOI, in agreement with a previous report²⁰ (fig. 4B). No differences were observed between MS patients and HV (fig. 4B). This activation was severely hampered after addition of an anti-MR1 blocking antibody, but not when blocking HLA or using a control isotype (fig. 4C). Altogether, these data show that MAIT cells from MS patients have the potential to be activated in response to bacterial stimulation through the interaction of the TCR and MR1. However, this potential is not different from HV, showing that blood MAIT cell activation through the TCR is not dysregulated in MS in our *in vitro* test.

MAIT cells from MS patients have a higher expression of homing markers as compared to HV.

MAIT cells are effector memory cells bearing homing markers, such as CCR5, CCR6 and the integrin α4β1. These molecules have been implicated in homing to mucosal tissues but also to the CNS. Thus, MAIT cells have the potential to migrate and exert damages in the CNS in an inflammatory context. This migration could also explain the slight decrease in frequency observed in periphery by some studies. We characterized the expression of different selectins, integrins and chemokine receptors on MAIT cells from both MS patients and HV. MAIT cells are CD62L⁻CD11a^{hi}PSGL-1⁺CCR5⁺CD49d⁺, which is in accordance with their homing phenotype (fig. 5A, CD11a is part of the integrin LFA1 and CD49d is the integrin α4). CD58 was also studied as the TLDA card revealed a decreased expression of the gene in MAIT cells from MS patients. No difference in CD62L, CCR5, CD49d or CD58 expression was observed

between MS patients and HV (suppl. fig. 3). In contrast, MAIT cells from MS patients had an increased expression of PSGL-1 (median MFI: 12600 for HV, 17000 for MS, $p < 0.01$) and CD11a (median MFI: 6451 for HV, 8250 in MS, $p < 0.05$) mean fluorescence intensity, suggesting that they could migrate more easily into the CNS (fig. 5B-C). No increased expression of CD11a and PSGL-1 is observed on MAIT cells from IBD patients (fig. 5B-C), suggesting that this is specific to MS.

MAIT cells can be found in MS lesions, but not in the CSF.

As MAIT cells harbour a phenotype suggesting their ability to migrate into the CNS, we then searched for the presence of MAIT cells of 39 CNS samples from 13 different MS patients. For 9 patients, we had both active and chronic active lesions (2 lesions per patient). For four other patients, 21 different lesion types (active, chronic active, NAWM with infiltrate, meningeal infiltrates) and locations (spinal cord, meninges, optic nerves, brain) were available. CD3⁺CD161⁺V α 7.2⁺ MAIT cells were observed by immunofluorescence (example in fig. 6A). MAIT cell frequency within CD3⁺ T cells was comprised between 0 and 3% (median: 0.52%), which is less than observed in the blood (fig. 6B). Of note, almost all patients studied for CNS infiltration were progressive patients with a median age of 46. MAIT cells were not present in a particular lesion type or location (suppl. fig.4). We then wondered whether MAIT cells could be activated *in situ* in the brain of MS patients. To answer this question, we analyzed the gene expression of MR1, IL-12 and IL-18 in the CNS of 10 MS patients. Paired samples of active, chronic active and NAWM with or without inflammatory infiltrate from the same patients were used. MR1 is expressed at a low level in the CNS, and maybe even less expressed in the CNS samples without demyelination nor infiltrate (fig. 6C). IL-12 and IL-18 were expressed at variable levels among the different lesion types (suppl. Fig 4). Finally, MAIT cell frequency in the CSF was decreased as compared to the blood (median: 0.44 vs 2.12, $p < 0.05$) in seven MS patients (fig. 6D).

The low frequency in the CNS could be explained by a default in transmigration for MAIT cells. To answer this hypothesis, we performed transmigration experiments using hCMEC/D3 cell line, which mimics the characteristics of the *in vivo* blood brain barrier³⁴. Figure 7A shows dot plots representative of MAIT cell staining or CD4/CD8 staining on MAIT cells in the total fraction (representative for *ex vivo* cells) or in the transmigrated and non-transmigrated

fractions. The results are presented for two HV and two MS patients, but we are currently increasing the cohort (fig. 7B). So far, MAIT cells are enriched in the non-transmigrated fraction as compared to the migrated fraction, both in inflamed and non-inflamed conditions, for HV and MS patients. This suggests that MAIT cells, although expressing homing molecules necessary for the migration into the CNS, do not transmigrate efficiently through the blood brain barrier, hence explaining the small quantity of MAIT cells observed in the lesions. As observed in figure 7A, lower panel, $CD8^+$ MAIT cells migrate preferentially compared to $CD8^-CD4^-$ MAIT cells, but this has to be confirmed due to the low number of cells analyzed.

DISCUSSION

Taken together, our data indicates that blood MAIT cell frequency do not differ between RR-MS patients and HV, but is decreased in progressive patients. Strikingly, blood MAIT cells expressed less co inhibitory molecules, suggesting an increased activation potential. When activated *in vitro* through the TCR, they showed unaltered response as compared to HV. Concerning their homing abilities, circulating MAIT cells from MS patients express more PSGL-1 and CD11a than MAIT cells from HV, suggesting that they are more suited to enter the brain. However, in the brain, the frequency of MAIT cells is low as compared to their frequency in the blood, consistent with their low ability to cross an *in vitro* blood brain barrier.

Three other studies investigated the frequency of MAIT cells in the blood of MS patients, and the results were inconsistent^{23–25}. Our cohorts of patients and HV were analyzed using the different gating strategies from these studies and no difference was observed for MAIT cell frequency in the blood of our MS patients, even when splitting active and inactive forms of the disease. In contrast, a decrease was observed for IBD patients, as already described⁴². Interestingly, progressive patients had less MAIT cells than relapsing patients. This decrease may be explained, at least in part, by the fact that progressive patients are older than relapsing ones. Indeed, MAIT cell frequency has been clearly shown to be decreased with age^{38,39}. We also observed a negative correlation between MAIT cell frequency and age in MS patients, but not in HV, which may be explained by the presence of older people in the MS patient cohort. Of note, there is no correlation when only RR patients, who are younger, are considered (data not shown). However, the specific implication of MAIT cells in progressive patients needs to be deeper investigated. The decrease frequency with age could also explain at least in part the results of one previous study, for which patients were younger than controls²⁴. A consistent finding of all these studies, including ours, is that MAIT cell frequency is variable and overlapping between the cohorts of patients and HV, making obvious that MAIT cell frequency is not a hallmark of MS.

The activation potential of MAIT cells after signaling through the TCR using a natural ligand has never been studied. Indeed, MAIT cells in MS were studied *in vitro* by anti-CD3/CD161 or by PMA/Ionomycin stimulations, resulting in a similar pro-inflammatory phenotype between

MS patients and HV^{24,25}. However, Miyazaki et al. suggested that MAIT cells could also exert a regulatory role by partially inhibiting IFN γ production by conventional T cells²⁵. However, this remains questionable, as this effect was observed on a total population of PBMC with or without MAIT cell depletion. Using the animal model of MS, the same group had previously described an anti-inflammatory role for MAIT cell, with mice overexpressing MAIT cells having a reduced disease⁴³. However, this is in contrast with all the other studies which attributed a proinflammatory role for these cells. Here, we show that although MAIT cells from MS patients have a decreased transcriptional level of CD244 and LAG3, this does not impact their expression of CD69, CD25 and IFN γ after stimulation with antigen presenting cells that had been in contact with bacterial-derived ligand. We cannot rule out that the decreased expression of CD244 and LAG3 would be implicated later during activation, for the return to the basal activation level. The transcriptional analysis also indicates a decreased expression of cytolytic genes, suggesting that they might have less cytotoxic properties, but our results did not answer this question. Apart from the TCR activation, MAIT cells can be activated with IL-12 and/or IL-18^{23,44,45}. A recent paper indicates that the frequency of circulating MAIT cells correlates negatively with the IL-18 level in the serum of MS patients²³, and two other studies observed an increased IL-18 concentration in the serum of MS patients^{46,47}. Although our results are against an increased activation status of circulating MAIT cells in MS patients, the CNS microenvironment may be decisive for the activation of these cells. Consistent with previous data, our results show that IL-12 and IL-18 are expressed in the CNS lesions of MS patients, but in variable amounts^{48,49}. Besides, MR1 is expressed at low levels in the lesions. This suggests that MAIT cells can be activated *in situ*.

MAIT cells express various homing markers, especially CCR5, CCR6, the integrins $\alpha 4\beta 1$ and LFA1, that enable them to enter the CNS in inflammatory conditions^{50,51}, as shown in the lungs after bacterial infection¹⁵. Besides, the increased expression of PSGL-1 and CD11a in MAIT cells from MS patients would suggest increased abilities to home into the CNS. Indeed, CD8⁺ T cells of RR-MS patients in relapse were shown to have an increased adhesiveness to brain venules through PSGL-1/P-selectin interaction⁵². However, the implication of PSGL-1 in the transmigration into the CNS remains unclear according to animal models in which PSGL-1 is dispensable for disease development^{53–55}, even if blocking PSGL-1 decreases the rolling and arrest of T cells specific for myelin components⁵⁶. CD11a, as part of the integrin LFA-1,

has been shown to be involved in the arrest and crawling steps⁵⁰. CD11a⁺ inflammatory cells have been found in MS lesions, together with an increased ICAM-1 (LFA-1 ligand) expression on the vessels from MS lesions⁵⁷. Besides, a decreased *in vitro* transmigration was reported for T cells from a patient treated with efalizumab, a monoclonal antibody against CD11a⁵⁸. Strikingly, only a small amount of MAIT cells was found within the CNS, which is consistent with very recently published results²³. Most of the patients studied here presented a progressive form of the disease, which we showed to be associated with a low frequency of MAIT cells in periphery. However, MAIT cells in the CNS represented at most half as much cells as in the blood of progressive patients, for a younger median age. To assess whether a default in transmigration could explain that low frequency in the CNS, we tested the transmigration abilities of MAIT cells using a well defined cell line that mimics *in vitro* the characteristics of the human blood brain barrier. Although we only performed the experiment on two MS patients and 2 HV, our data support that MAIT cells do not transmigrate at a high rate through such an *in vitro* barrier, in accordance with the low frequency observed in the CNS. However, we cannot rule out that MAIT cells in the CNS undergo apoptosis, as suggested by their high susceptibility to apoptosis as compared to conventional T cells⁵⁹. This mechanism was also proposed for regulatory T cells which are absent from CNS lesions^{5,60}. The low frequency of MAIT cells in CNS lesions led us to the hypothesis that they are not specifically recruited to the CNS. However, Vα7.2 MAIT cell transcripts but not Vα19 transcripts were found in CNS lesions of other MS patients, suggesting that the migration was specific²². Altogether, even if MAIT cells are recruited to the CNS by a bystander effect, they may still contribute to the pathology. The preferential location of MAIT cells in the gut and their direct interaction with the gut microbiota make them good candidates to explain the link between the microbiota and the CNS diseases^{61,62}. Although other T cell subsets have been implicated, such as T regs, the implication of MAIT cells cannot be ruled out.

MAIT cells are part of the IL-17-producing CD8⁺ T cells, which have been implicated in MS. However, the exact subpopulation participating in the disease process is unknown. IL-17⁺ CD8⁺ T cells have been described in the CNS of MS patients, especially in active lesions where they reach 73% of CD8⁺ T cells⁵. In CNS lesions from SP-MS patients, eight to 12% of CNS infiltrating CD3⁺CD8⁺ T cells were shown to express CD161, a hallmark of IL-17-producing T

cells^{6,24}. A lot of CNS-infiltrating CD8⁺ T cells also express IFN γ and GZM-B, suggesting their involvement in the disease process^{24,63}. In periphery, the number of circulating blood CD8⁺ T cells producing IL-17 were increased in MS patients as compared to HV⁶⁴. As MAIT cells comprise almost all IL-17-producing CD8⁺ T cells, it is tempting to implicate them in the process. However, in psoriasis, CD8⁺ T cells producing IL-17 in lesional skin also included a large proportion of conventional CD8⁺ T cells⁶⁵. This suggests that this subpopulation may also have important involvement in inflammatory processes and emphasizes the need for a deeper understanding of the contribution of these different IL-17-producing CD8⁺ T cells in MS.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank all the patients who accepted to participate in this study and who gave their time and their biological samples, T. Hansen and N. Myers for their gift of Hela-MR1 transfected cells and anti-MR1 antibody, O. Lantz for the gift of 3C10 antibody, PO Courraud for the gift au hCMEC/D3 cell line and B. Charreau for the gift of the W6/32 antibody. Many thanks also to K. Dornmair and D. Lefranc for the fruitful discussions on the experiments.

Tissue samples and associated clinical and neuropathological data were supplied by the Multiple Sclerosis Society Tissue Bank, funded by the Multiple Sclerosis Society of Great Britain and Northern Ireland, registered charity 207495.

This work has been funded by the ARSEP Fondation and the ANTARES Association.

REFERENCES

1. Babbe H, Roers A, Waisman A, et al. Clonal expansions of CD8+ T cells dominate the T cell infiltrate in active multiple sclerosis lesions as shown by micromanipulation and single cell polymerase chain reaction. *J. Exp. Med.* 2000;192(3):393–404.[cited 2014 Apr 11]
2. Booss J, Esiri MM, Tourtellotte WW, Mason DY. Immunohistological analysis of T lymphocyte subsets in the central nervous system in chronic progressive multiple sclerosis. *J. Neurol. Sci.* 1983;62(1-3):219–232.
3. Salou M, Garcia A, Michel L, et al. Expanded CD8 T cell sharing between periphery and CNS in multiple sclerosis. In submission
4. Junker A, Ivanidze J, Malotka J, et al. Multiple sclerosis: T-cell receptor expression in distinct brain regions. *Brain* 2007;130(11):2789–2799.[cited 2014 Apr 11]
5. Tzartos JS, Friese MA, Craner MJ, et al. Interleukin-17 production in central nervous system-infiltrating T cells and glial cells is associated with active disease in multiple sclerosis. *Am. J. Pathol.* 2008;172(1):146–155.[cited 2012 Aug 2]
6. Maggi L, Santarlasci V, Capone M, et al. CD161 is a marker of all human IL-17-producing T-cell subsets and is induced by RORC. *Eur. J. Immunol.* 2010;40(8):2174–2181.
7. Martin E, Treiner E, Duban L, et al. Stepwise development of MAIT cells in mouse and human. *PLoS Biol.* 2009;7(3):e54.[cited 2011 Jan 6]
8. Walker LJ, Kang Y-H, Smith MO, et al. Human MAIT and CD8 $\alpha\alpha$ cells develop from a pool of type-17 precommitted CD8+ T cells. *Blood* 2012;119(2):422 –433.[cited 2012 Jan 27]
9. Dusseaux M, Martin E, Serriari N, et al. Human MAIT cells are xenobiotic-resistant, tissue-targeted, CD161hi IL-17-secreting T cells. *Blood* 2011;117(4):1250–1259.[cited 2012 Apr 19]
10. Patel O, Kjer-Nielsen L, Le Nours J, et al. Recognition of vitamin B metabolites by mucosal-associated invariant T cells. *Nat. Commun.* 2013;4:2142.
11. Reantragoon R, Corbett AJ, Sakala IG, et al. Antigen-loaded MR1 tetramers define T cell receptor heterogeneity in mucosal-associated invariant T cells. *J. Exp. Med.* 2013;210(11):2305–2320.
12. Treiner E, Duban L, Bahram S, et al. Selection of evolutionarily conserved mucosal-associated invariant T cells by MR1. *Nature* 2003;422(6928):164–169.[cited 2012 Apr 19]
13. Corbett AJ, Eckle SBG, Birkinshaw RW, et al. T-cell activation by transitory neo-antigens derived from distinct microbial pathways. *Nature* 2014;509(7500):361–365.
14. Kjer-Nielsen L, Patel O, Corbett AJ, et al. MR1 presents microbial vitamin B metabolites to MAIT cells. *Nature* 2012;491(7426):717–723.
15. Le Bourhis L, Martin E, Péguillet I, et al. Antimicrobial activity of mucosal-associated invariant T cells. *Nat. Immunol.* 2010;11(8):701–708.[cited 2012 Apr 19]
16. Chua W-J, Truscott SM, Eickhoff CS, et al. Polyclonal mucosa-associated invariant T cells have unique innate functions in bacterial infection. *Infect. Immun.* 2012;80(9):3256–3267.
17. Gold MC, Cerri S, Smyk-Pearson S, et al. Human mucosal associated invariant T cells detect bacterially infected cells. *PLoS Biol.* 2010;8(6):e1000407.[cited 2012 Apr 19]
18. Meierovics A, Yankelevich W-JC, Cowley SC. MAIT cells are critical for optimal mucosal immune responses during in vivo pulmonary bacterial infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2013;
19. Salerno-Goncalves R, Rezwan T, Szein MB. B cells modulate mucosal associated invariant T cell immune responses. *Front. Immunol.* 2014;4:511.
20. Le Bourhis L, Dusseaux M, Bohineust A, et al. MAIT cells detect and efficiently lyse bacterially-infected epithelial cells. *PLoS Pathog.* 2013;9(10):e1003681.
21. Abrahamsson SV, Angelini DF, Dubinsky AN, et al. Non-myeloablative autologous haematopoietic stem cell transplantation expands regulatory cells and depletes IL-17 producing mucosal-associated invariant T cells in multiple sclerosis. *Brain* 2013;136(Pt 9):2888–2903.
22. Illés Z, Shimamura M, Newcombe J, et al. Accumulation of V α 7.2-J α 33 invariant T cells in human autoimmune inflammatory lesions in the nervous system. *Int. Immunol.* 2004;16(2):223–230.[cited 2012 Apr 19]
23. Willing A, Leach OA, Ufer F, et al. CD8(+) MAIT cells infiltrate into the CNS and alterations in their blood frequencies correlate with IL-18 serum levels in multiple sclerosis. *Eur. J. Immunol.* 2014;
24. Annibaldi V, Ristori G, Angelini DF, et al. CD161(high)CD8+T cells bear pathogenetic potential in multiple sclerosis. *Brain J. Neurol.* 2011;134(Pt 2):542–554.[cited 2012 Apr 19]
25. Miyazaki Y, Miyake S, Chiba A, et al. Mucosal-associated invariant T cells regulate Th1 response in multiple sclerosis. *Int. Immunol.* 2011;23(9):529–535.[cited 2012 Apr 19]

26. Polman CH, Reingold SC, Edan G, et al. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2005 revisions to the "McDonald Criteria." *Ann. Neurol.* 2005;58(6):840–846.[cited 2012 Jun 22]
27. Blackburn SD, Shin H, Haining WN, et al. Coregulation of CD8+ T cell exhaustion by multiple inhibitory receptors during chronic viral infection. *Nat. Immunol.* 2009;10(1):29–37.
28. Holmes S, He M, Xu T, Lee PP. Memory T cells have gene expression patterns intermediate between naive and effector. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2005;102(15):5519–5523.
29. Kalia V, Sarkar S, Subramaniam S, et al. Prolonged interleukin-2R α expression on virus-specific CD8+ T cells favors terminal-effector differentiation in vivo. *Immunity* 2010;32(1):91–103.
30. Knoechel B, Lohr J, Zhu S, et al. Functional and molecular comparison of anergic and regulatory T lymphocytes. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 2006;176(11):6473–6483.
31. Macián F, García-Cózar F, Im S-H, et al. Transcriptional mechanisms underlying lymphocyte tolerance. *Cell* 2002;109(6):719–731.
32. Parish IA, Rao S, Smyth GK, et al. The molecular signature of CD8+ T cells undergoing deletional tolerance. *Blood* 2009;113(19):4575–4585.
33. Pipkin ME, Sacks JA, Cruz-Guilloty F, et al. Interleukin-2 and inflammation induce distinct transcriptional programs that promote the differentiation of effector cytolytic T cells. *Immunity* 2010;32(1):79–90.
34. Weksler BB, Subileau EA, Perrière N, et al. Blood-brain barrier-specific properties of a human adult brain endothelial cell line. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 2005;19(13):1872–1874.
35. Prat A, Biernacki K, Lavoie J-F, et al. Migration of multiple sclerosis lymphocytes through brain endothelium. *Arch. Neurol.* 2002;59(3):391–397.
36. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻($\Delta\Delta C_T$) Method. *Methods San Diego Calif* 2001;25(4):402–408.
37. Eisen MB, Spellman PT, Brown PO, Botstein D. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1998;95(25):14863–14868.
38. Lee O-J, Cho Y-N, Kee S-J, et al. Circulating mucosal-associated invariant T cell levels and their cytokine levels in healthy adults. *Exp. Gerontol.* 2014;49:47–54.
39. Novak J, Dobrovolny J, Novakova L, Kozak T. The decrease in number and change in phenotype of mucosal-associated invariant T cells in the elderly and differences in males and females of reproductive age. *Scand. J. Immunol.* 2014;
40. De Jager PL, Baecher-Allan C, Maier LM, et al. The role of the CD58 locus in multiple sclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2009;106(13):5264–5269.[cited 2012 Jul 18]
41. Chattopadhyay PK, Betts MR, Price DA, et al. The cytolytic enzymes granzyme A, granzyme B, and perforin: expression patterns, cell distribution, and their relationship to cell maturity and bright CD57 expression. *J. Leukoc. Biol.* 2009;85(1):88–97.
42. Serriari N-E, Eoche M, Lamotte L, et al. Innate mucosal-associated invariant T (MAIT) cells are activated in inflammatory bowel diseases. *Clin. Exp. Immunol.* 2014;176(2):266–274.
43. Croxford JL, Miyake S, Huang Y-Y, et al. Invariant V(α)19i T cells regulate autoimmune inflammation. *Nat. Immunol.* 2006;7(9):987–994.[cited 2011 Jan 6]
44. Havenith SHC, Yong SL, Henson SM, et al. Analysis of stem-cell-like properties of human CD161⁺IL-18R α ⁺ memory CD8+ T cells. *Int. Immunol.* 2012;24(10):625–636.
45. Turtle CJ, Delrow J, Joslyn RC, et al. Innate signals overcome acquired TCR signaling pathway regulation and govern the fate of human CD161(hi) CD8 α ⁺ semi-invariant T cells. *Blood* 2011;118(10):2752–2762.
46. Losy J, Niezgoda A. IL-18 in patients with multiple sclerosis. *Acta Neurol. Scand.* 2001;104(3):171–173.
47. Nicoletti F, Di Marco R, Mangano K, et al. Increased serum levels of interleukin-18 in patients with multiple sclerosis. *Neurology* 2001;57(2):342–344.
48. Balashov KE, Rottman JB, Weiner HL, Hancock WW. CCR5+ and CXCR3+ T cells are increased in multiple sclerosis and their ligands MIP-1 α and IP-10 are expressed in demyelinating brain lesions. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1999;96(12):6873–6878.[cited 2014 Apr 16]
49. Windhagen A, Newcombe J, Dangond F, et al. Expression of costimulatory molecules B7-1 (CD80), B7-2 (CD86), and interleukin 12 cytokine in multiple sclerosis lesions. *J. Exp. Med.* 1995;182(6):1985–1996.
50. Engelhardt B, Ransohoff RM. Capture, crawl, cross: the T cell code to breach the blood-brain barriers. *Trends Immunol.* 2012;33(12):579–589.
51. Hamann I, Zipp F, Infante-Duarte C. Therapeutic targeting of chemokine signaling in Multiple Sclerosis. *J. Neurol. Sci.* 2008;274(1-2):31–38.[cited 2014 Apr 16]

52. Battistini L, Piccio L, Rossi B, et al. CD8⁺ T cells from patients with acute multiple sclerosis display selective increase of adhesiveness in brain venules: a critical role for P-selectin glycoprotein ligand-1. *Blood* 2003;101(12):4775–4782.
53. Bill R, Döring A, Deutsch U, Engelhardt B. PSGL-1 is dispensible for the development of active experimental autoimmune encephalomyelitis in SJL/J mice. *J. Neuroimmunol.* 2011;232(1-2):207–208.
54. Engelhardt B, Kempe B, Merfeld-Clauss S, et al. P-selectin glycoprotein ligand 1 is not required for the development of experimental autoimmune encephalomyelitis in SJL and C57BL/6 mice. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 2005;175(2):1267–1275.
55. Osmers I, Bullard DC, Barnum SR. PSGL-1 is not required for development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Neuroimmunol.* 2005;166(1-2):193–196.
56. Piccio L, Rossi B, Scarpini E, et al. Molecular mechanisms involved in lymphocyte recruitment in inflamed brain microvessels: critical roles for P-selectin glycoprotein ligand-1 and heterotrimeric G(i)-linked receptors. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 2002;168(4):1940–1949.
57. Bö L, Peterson JW, Mørk S, et al. Distribution of immunoglobulin superfamily members ICAM-1, -2, -3, and the beta 2 integrin LFA-1 in multiple sclerosis lesions. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 1996;55(10):1060–1072.
58. Schwab N, Ulzheimer JC, Fox RJ, et al. Fatal PML associated with efalizumab therapy: insights into integrin α L β 2 in JC virus control. *Neurology* 2012;78(7):458–467; discussion 465.
59. Gérard S, Sibérl S, Martin E, et al. Human iNKT and MAIT cells exhibit a PLZF-dependent proapoptotic propensity that is counterbalanced by XIAP. *Blood* 2013;121(4):614–623.
60. Fritzsche B, Haas J, König F, et al. Intracerebral human regulatory T cells: analysis of CD4⁺ CD25⁺ FOXP3⁺ T cells in brain lesions and cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients. *PloS One* 2011;6(3):e17988.[cited 2012 Sep 7]
61. Berer K, Krishnamoorthy G. Commensal gut flora and brain autoimmunity: a love or hate affair? *Acta Neuropathol. (Berl.)* 2012;123(5):639–651.
62. Kosiewicz MM, Zirnheld AL, Alard P. Gut microbiota, immunity, and disease: a complex relationship. *Front. Microbiol.* 2011;2:180.
63. Ifergan I, Kebir H, Alvarez JI, et al. Central nervous system recruitment of effector memory CD8⁺ T lymphocytes during neuroinflammation is dependent on α 4 integrin. *Brain J. Neurol.* 2011;134(Pt 12):3560–3577.
64. Wang HH, Dai YQ, Qiu W, et al. Interleukin-17-secreting T cells in neuromyelitis optica and multiple sclerosis during relapse. *J. Clin. Neurosci. Off. J. Neurosurg. Soc. Australas.* 2011;18(10):1313–1317.
65. Teunissen MBM, Yermenko NG, Baeten DLP, et al. The IL-17A–Producing CD8⁺ T Cell Population in Psoriatic Lesional Skin Comprises Mucosa-Associated Invariant T cells and Conventional T Cells [Internet]. *J. Invest. Dermatol.* 2014;[cited 2014 Jun 25]

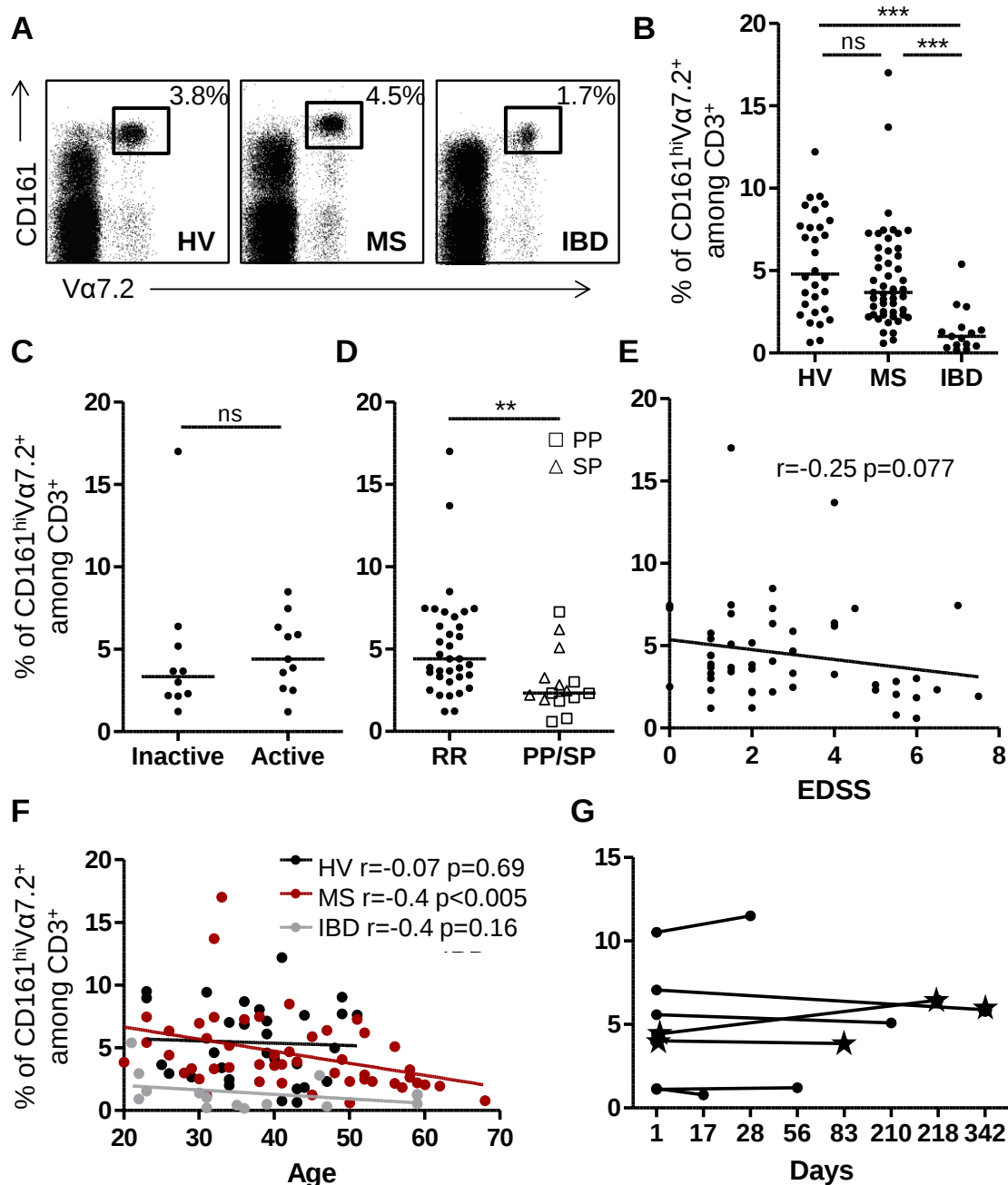


Figure 1: MAIT cell frequency in the blood is similar between HV and MS patients but is decreased in IBD patients. Fresh PBMC were stained and analysed by flow cytometry. (A) Representative dot plots of CD161^{hi}Va7.2⁺ staining, after gating on living CD3⁺ cells, for one HV, one MS and one IBD patient. (B-D) Comparison of the frequency of CD161^{hi}Va7.2⁺ MAIT cells among total CD3⁺ T cells between HV (n=30), MS patients (n=50) and IBD patients (n=15) (B), between active (n=11) and inactive (n=10) MS patients (C) and between relapsing (n=35) and progressive (n=15, 7 SP [triangles], 8 PP [squares]) forms of MS (D). Bars represent the median. A Mann-Whitney test or Kruskal-Wallis test followed by a Dunn's multiple comparison test were performed to compare two or three groups, respectively. ***p<0.001, **p<0.01, ns: non significant. (E-F) Frequency of CD3⁺ MAIT cells according to the EDSS score for MS patients (E), to the age for HV (black), MS patients (red) and IBD patients (grey) (F). Spearman correlation test was performed. (G) Frequency of CD3⁺ MAIT cells at two different samplings for 7 MS patients (stars represents sampling during a relapse).

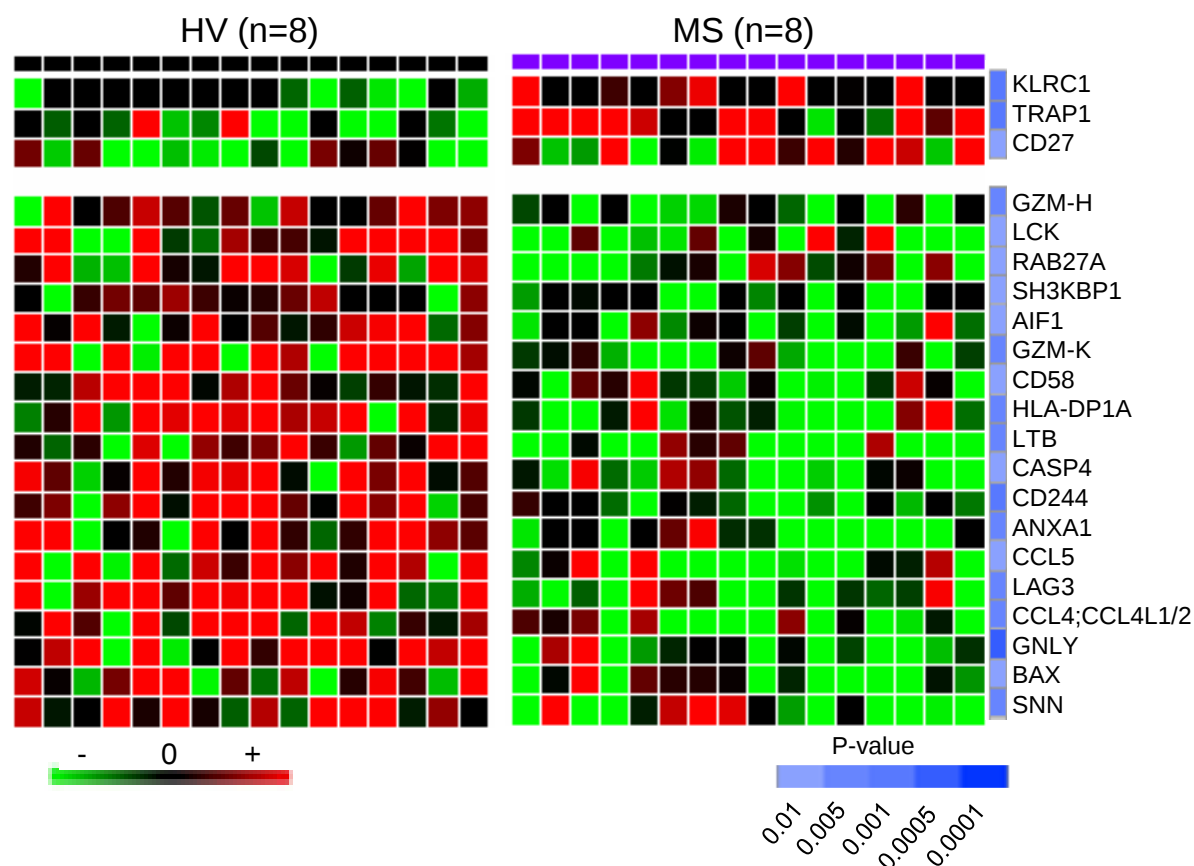


Figure 2: Differential transcriptional expression in *ex vivo* MAIT cells from the blood of HV and MS patients. Transcriptional profile of *ex vivo* sorted CD8⁺CD161^{hi}Vα7.2⁺ cells was assessed in duplicate by quantitative PCR using custom TLDA cards. The heat map represents the genes up- (red) or down- (green) regulated between HV (n=8) and MS patients (n=8), based on a 0.01 threshold for significance.

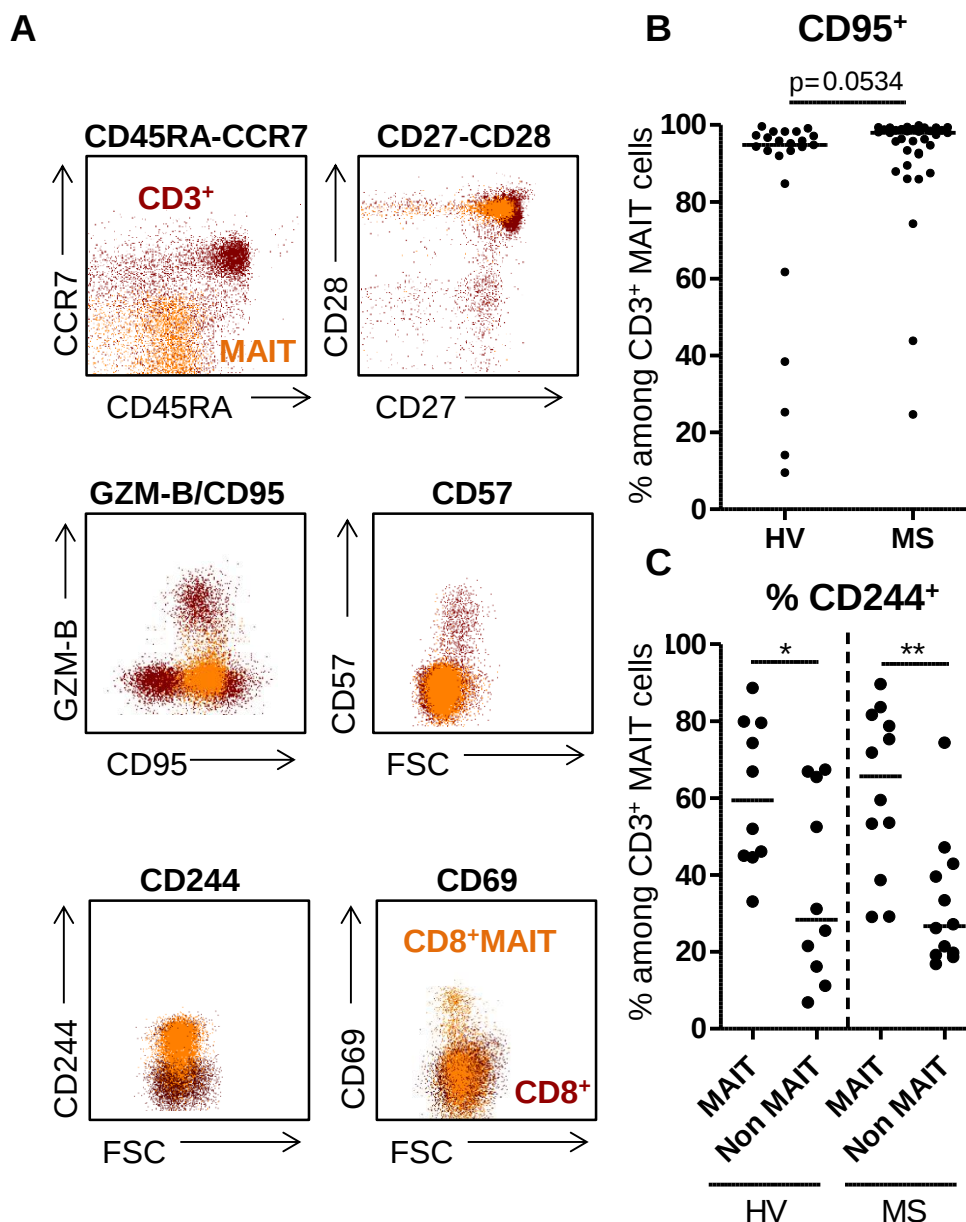


Figure 3: Ex vivo blood MAIT cells from HV and MS patients have a similar effector phenotype. Fresh PBMC were stained and analysed by flow cytometry. (A) Representative dot plots of CD45RA/CCR7, CD27/CD28, GZM-B, CD95, CD57 and CD69 staining on CD3⁺ (or CD8⁺) T cells (brown) and CD3⁺ (or CD8⁺) CD161^{hi}Vα7.2⁺ MAIT cells (orange). (B) Frequency of CD95⁺ CD3⁺ MAIT cells in HV (n=23) and MS patients (n=35). (C) Frequency of CD244⁺ cells among CD3⁺CD161^{hi}Vα7.2⁺ (MAIT) or CD3⁺CD161^{hi}Vα7.2⁻ (non MAIT) in HV (n=10) and MS patients (n=12). A Mann-Whitney test was performed to compare two groups. **p<0.01, *p<0.05. The bars represent the median.

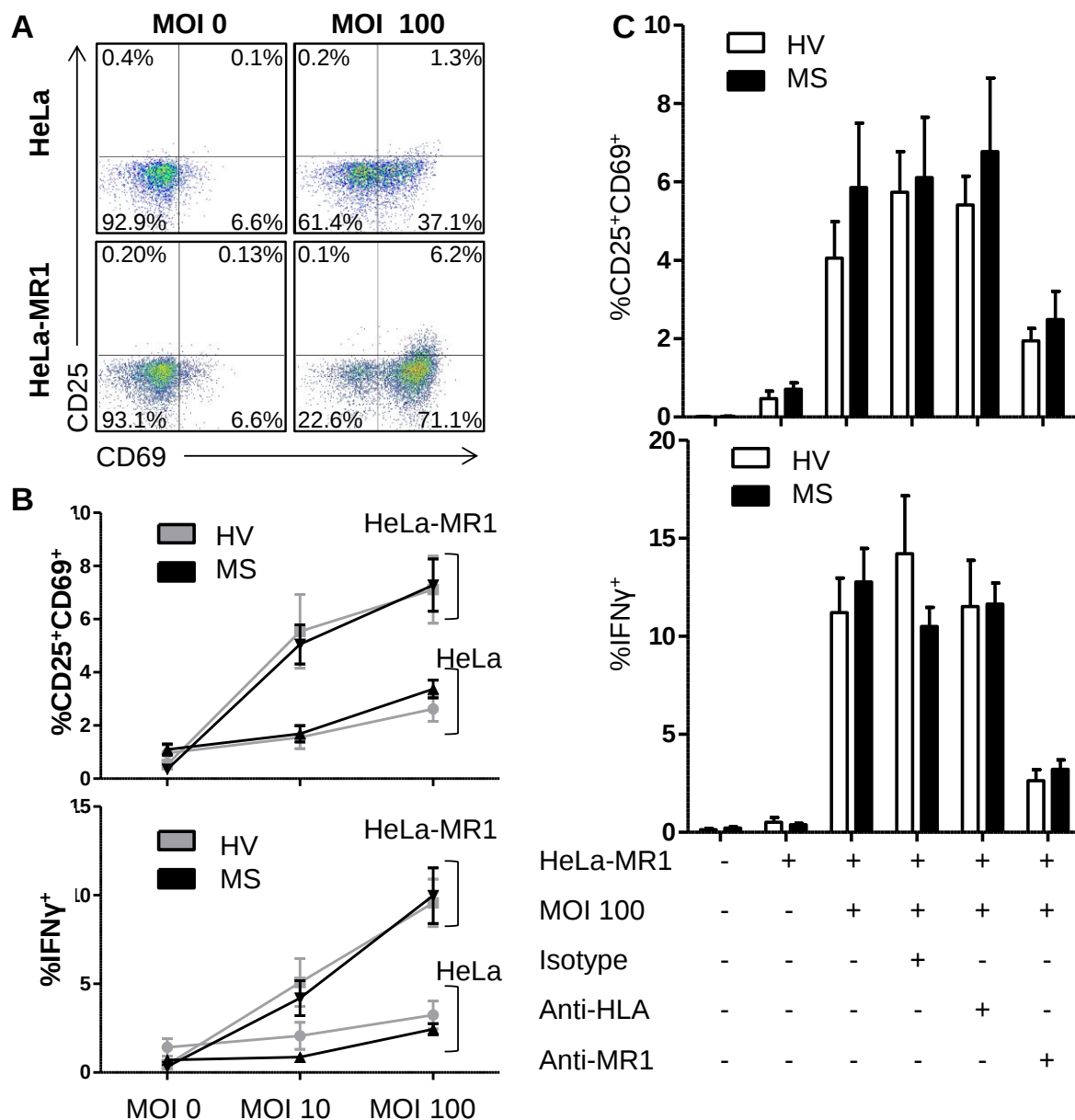


Figure 4: Blood MAIT cells from HV and MS patients have similar activation profiles. Blood sorted $V\alpha 7.2^+$ cells were incubated overnight with HeLa cells, transfected or not with MR1, and previously cultured for 3 hours with *Escherichia coli* at different MOI. Activation status of the $CD161^{hi}V\alpha 7.2^+$ MAIT cells was assessed by CD25, CD69 and IFN γ staining. (A) Representative dot plots of MAIT cells activation characterized by CD25 and CD69 expression. (B) Frequency of $CD25^+CD69^+$ (upper panel) and IFN γ^+ (lower panel) MAIT cells after activation at different MOI in 9 sex- and age-matched HV and MS patients. (C) Frequency of $CD25^+CD69^+$ (upper panel) and IFN γ^+ (lower panel) MAIT cells after activation with previous incubation of HeLa cells with antibodies against HLA, MR1 or the control isotype, for 4 sex- and age- matched HV and MS patients.

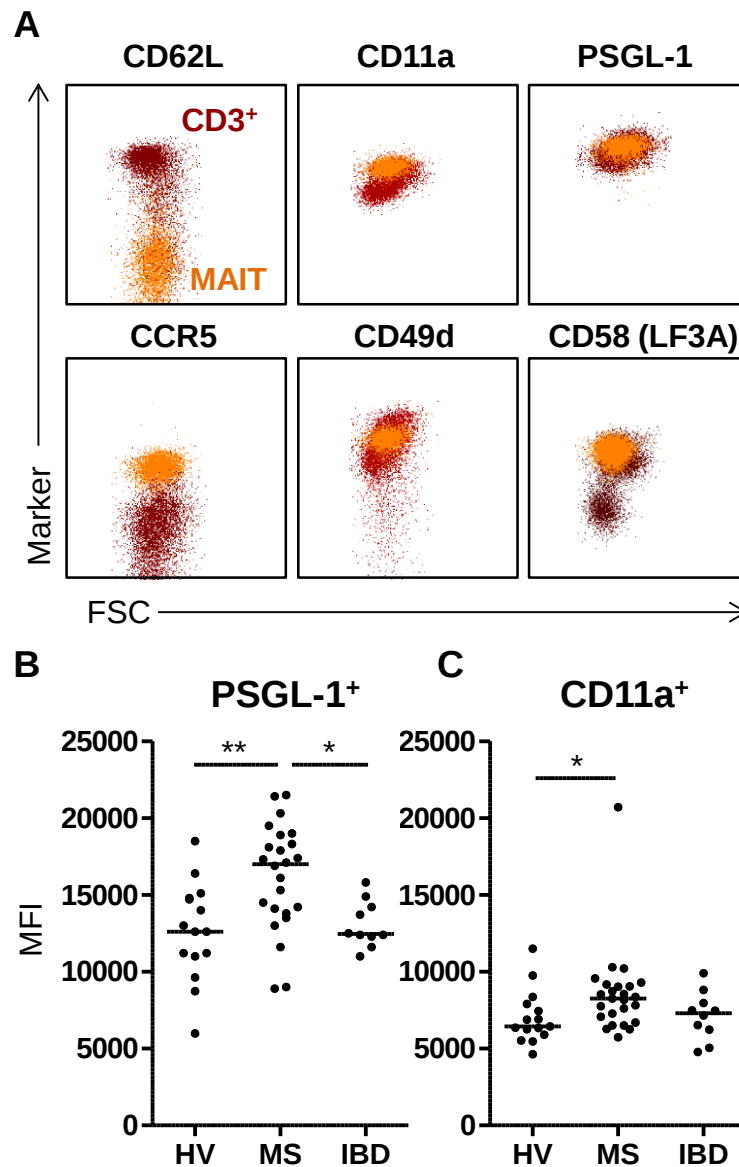


Figure 5: MAIT cells from MS patients display increased expression of homing receptors as compared to HV. (A) Representative dot plots of CD62L, CD11a, PSGL-1, CCR5, CD49d, CD58 staining on CD3⁺ T cells (brown) and CD3⁺CD161^{hi}Vα7.2⁺ MAIT cells (orange). (B-C) MFI comparison of PSGL-1 (B) and CD11a (C) positive CD3⁺CD161^{hi}Vα7.2⁺ MAIT cells between HV (n=15), IBD patients (n=10) and MS patients (n=24 in B, n=25 in C). A Kruskal-Wallis test followed by a Dunn's multiple comparison test was performed to compare three groups. **p<0.01, *p<0.05. The bars represent the median.

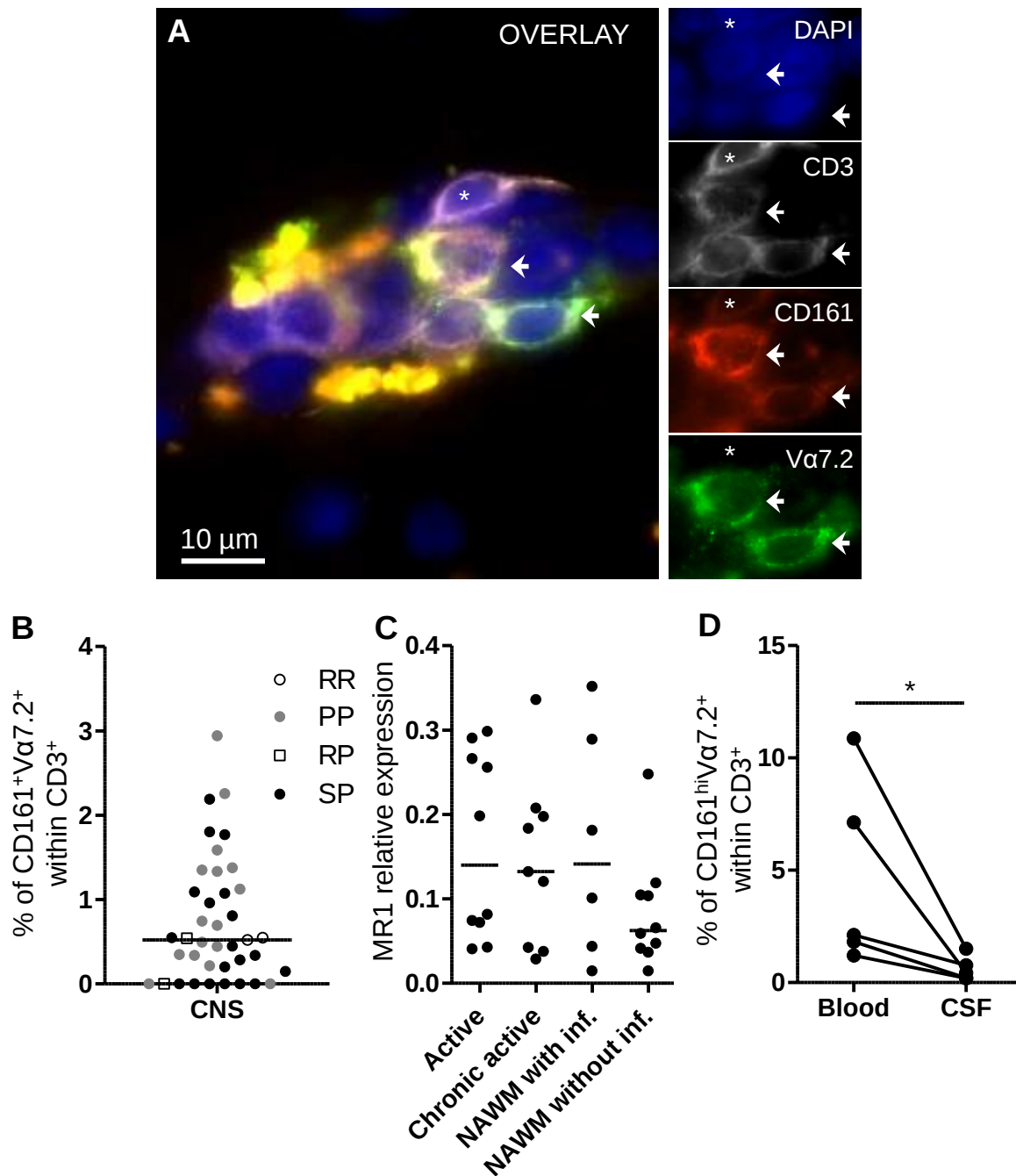


Figure 6: MAIT cells are present in low frequency in the CNS of MS patients. (A) Example of staining with CD3 (white), CD161 (red), Va7.2 (green) and DAPI (blue). Arrows show CD3⁺CD161⁺Va7.2⁺ MAIT cells. The star shows a CD3⁺CD161⁺Va7.2⁻ cell. (B) Frequency of CD161⁺Va7.2⁺ cells within CD3⁺ T cells in 39 SNC lesions from 13 different patients, classified according to the disease form: relapsing-remitting (white circle, n=2), primary progressive (grey circle, n=16), relapsing progressive (white square, n=2) and secondary progressive (black circle, n=19). (C) Relative expression of MR1 on paired CNS lesions (active, n=10; chronic active, n=9; NAWM with inflammatory infiltrate [inf.], n=6; NAWM without inflammatory infiltrate [inf.], n=10) from 10 MS patients, analyzed as described in the methods. (D) Frequency of CD161^{hi}Va7.2⁺ cells within CD3⁺ T cells in paired blood and CSF samples of 7 MS patients. A Mann-Whitney test was performed to compare the two groups. *p<0.05. A Kruskal-Wallis test followed by a Dunn's multiple comparison test was performed to compare four groups. The lines represent the median.

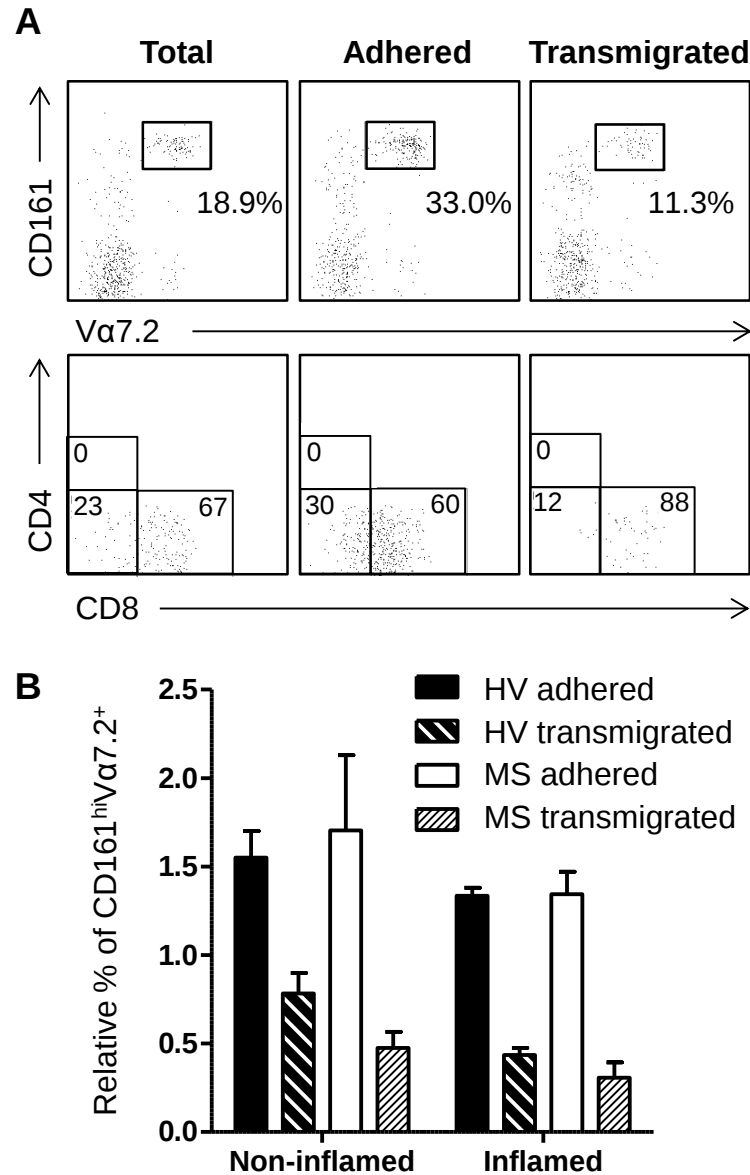
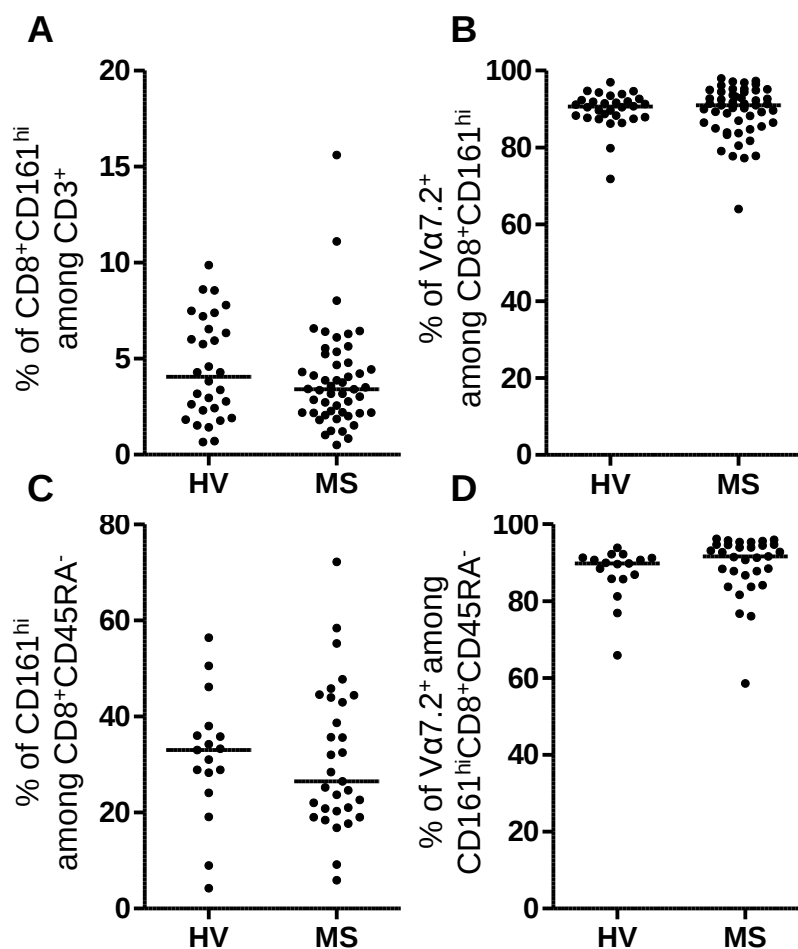
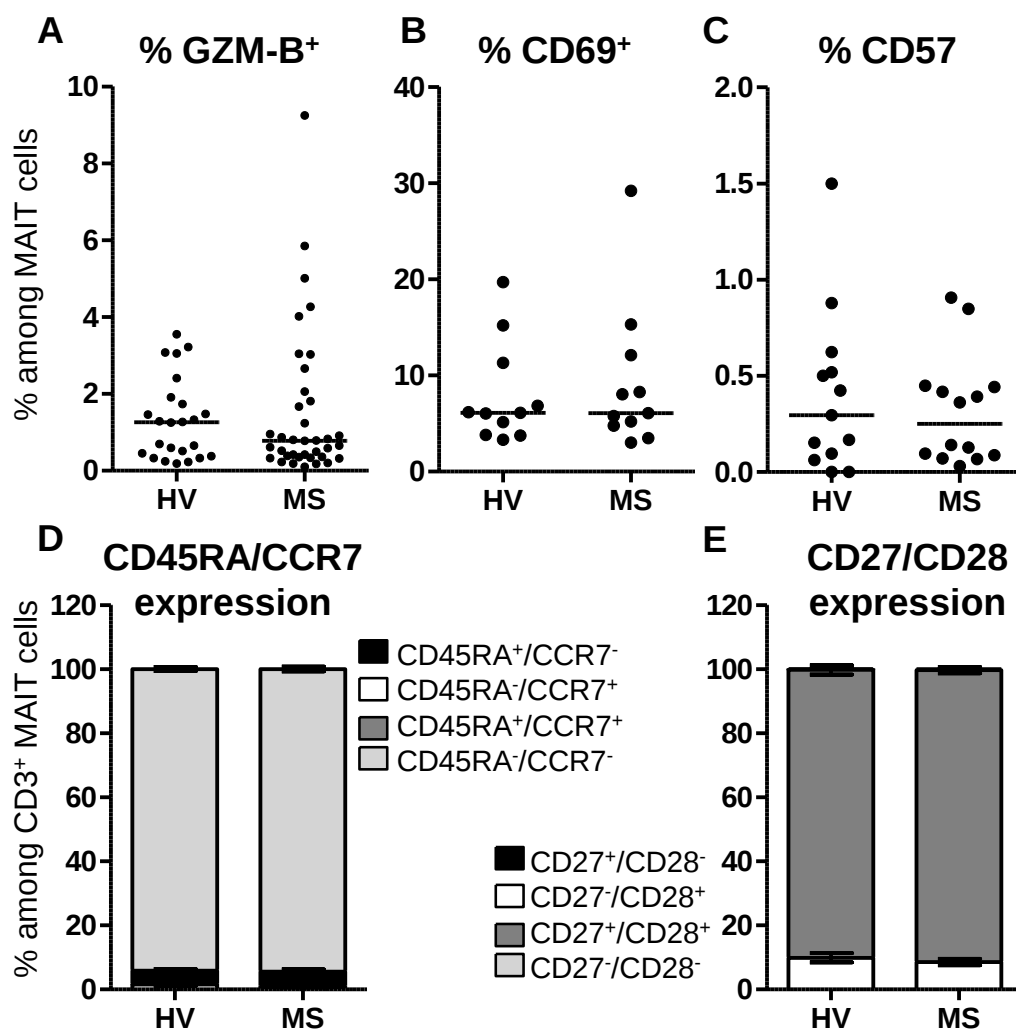


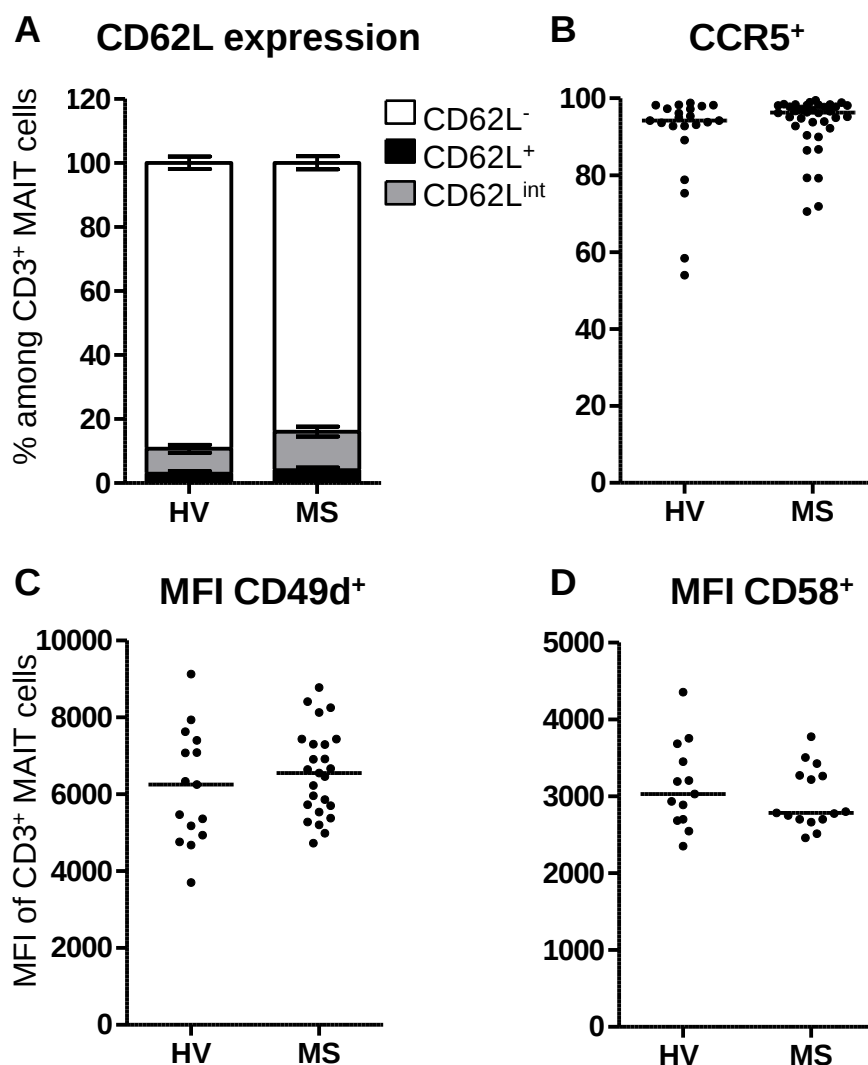
Figure 7: MAIT cells are enriched in the non transmigrated fraction through an *in vitro* blood brain barrier. CD8⁺ and CD8⁻CD4⁻ T cells were isolated and allowed to transmigrate on hCMEC/D3 cells for 12 hours, in inflammatory conditions or not (as described in the method section). (A) Representative dot plots of CD161/Vα7.2 staining on CD3⁺ T cells and CD4/CD8 staining on CD161^{hi}Vα7.2⁺ cells in the total fraction (without transmigration experiment), and in adhered or transmigrated fractions (above or below the barrier, respectively). (B) Relative frequency of CD3⁺CD161^{hi}Vα7.2⁺ MAIT cells in the adhered or transmigrated fractions as compared to the total non-transmigrated fraction, in non-inflamed or inflamed conditions, for HV (n=2) and MS patients (n=2) (mean±SEM). A Kruskal-Wallis test followed by a Dunn's multiple comparison test was performed to compare four groups.



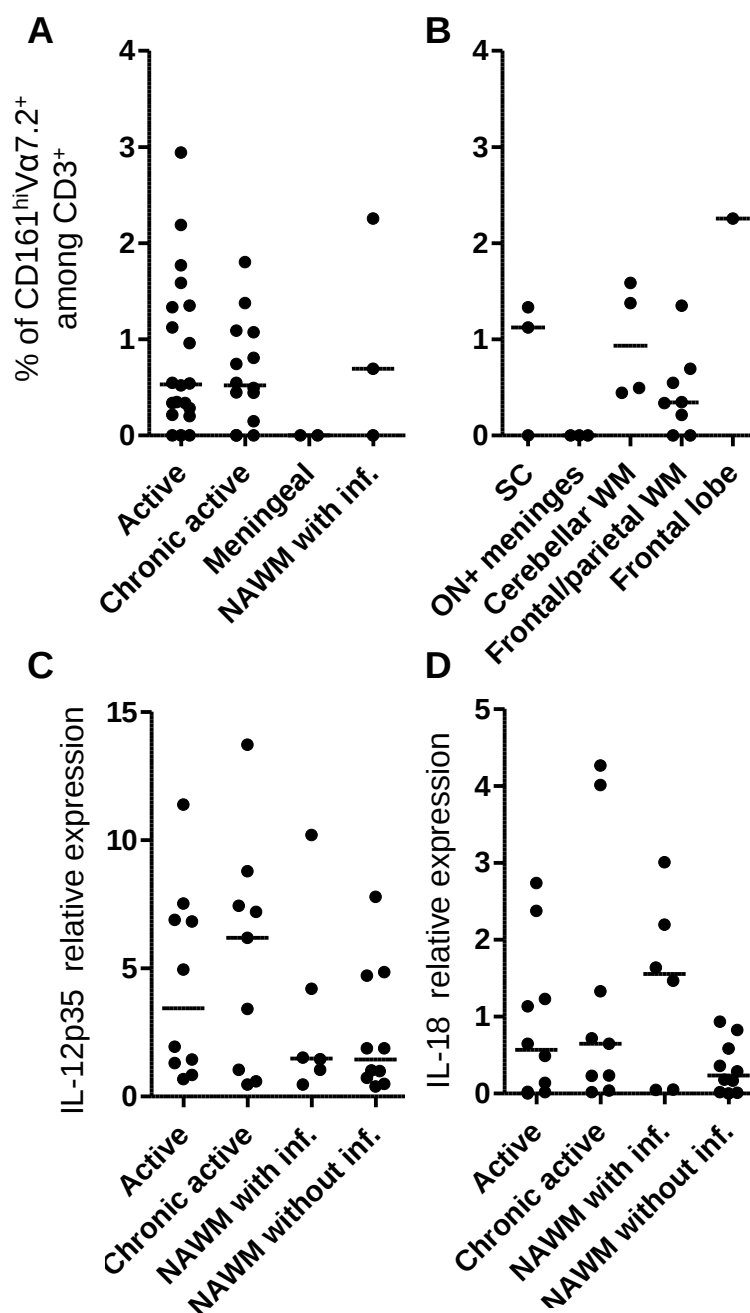
Supplementary figure 1: MAIT cell frequency as described in other studies. (A-D) Frequency of CD8⁺CD161^{hi} in CD3⁺ T cells (A), Vα7.2⁺ cells in CD8⁺CD161^{hi} cells (B), CD161^{hi}CD8⁺ in CD8⁺ T cells (C) and Vα7.2⁺ cells in CD8⁺CD161^{hi}CD45RA⁻ cells (D) for HV (n=30 in A-B, 17 in C-D) and MS patients (n=50 in A-B, 31 in C-D). A Mann-Whitney test was performed to compare two groups. The bars represent the median.



Supplementary figure 2: Blood MAIT cells from MS patients and HV have similar *ex vivo* effector characteristics. (A-C) Frequency comparison of GZM-B⁺ (A), CD69⁺ (B) or CD57 (C) CD161^{hi}Vα7.2⁺ MAIT (CD3⁺ in A and C, CD8⁺ in B) cells between HV (n=24 in A, 11 in B, 13 in C) and MS patients (n=37 in A, 11 in B, 14 in C). The bars represent the median. (D-E) CD45RA/CCR7 (D), CD27/CD28 (E) staining repartition (mean±SEM) on MAIT cells in HV (n=17 in D, 21 in E) and MS patients (n=31 in D, 34 in E). A Mann-Whitney test was performed to compare two groups.



Supplementary figure 3: Blood MAIT cells from MS patients and HV express similar levels of CD62L, CCR5, CD49d and CD58. CD3⁺CD161^{hi}Vα7.2⁺ MAIT cells were stained for different adhesion molecules. (A) CD62L⁻ (white), CD62L⁺ (black) and CD62L^{int} (gray) repartition on MAIT cells in HV (n=27) and MS patients (n=34) (mean±SEM). (B) Frequency of MAIT cells positive for CCR5 in HV (n=22) and MS patients (n=36). (C-D) MFI comparison of CD49d (C) and CD58 (C) positive MAIT cells between HV (n=15 in C, n=13 in D) and MS patients (n=25 in C, n=14 in D). A Mann-Whitney test was performed to compare two groups. The bars represent the median.



Supplementary figure 4: MAIT cells are not segregated within particular lesion type or location. (A) Frequency of CD161⁺Vα7.2⁺ cells among CD3⁺ T cells in 39 SNC lesions from 13 different patients, classified according to the lesion activity: active (n=20), chronic active (n=14), meningeal (n=2), NAWM with infiltrate (n=3). (B) The frequency is plotted for 3 patients, according to the lesion location: spinal cord (n=3), optic nerves (ON) and meninges (n=3), cerebellar white matter (WM, n=4), frontal/parietal WM (n=8) and frontal lobe (n=1). (C-D) Relative expression of IL-12p35 (C) and IL-18 (D) on paired CNS lesions (active, n=10; chronic active, n=9; NAWM with infiltrate, n=6; NAWM without infiltrate, n=10) from 10 MS patients, analyzed as described in the methods. A Kruskal-Wallis test followed by a Dunn's multiple comparison test was performed to compare more than two groups. The bars represent the median.

Table 1: Clinical and demographical characteristics of patients

Group	n	Sex ratio (F/M)	Age *	Death-sampling interval (hours)	Cause of death	Disease type	Disease Duration (years) *	EDSS
Blood samples for <i>ex vivo</i> frequency and CD45, CCR7, CD27, CD28, CCR5, CD11a, PSGL1, CD49d, GZM-B and CD95 staining								
Total MS	50	3.2 (38/12)	41.5 [20-68]	N/A	N/A	37 RR, 8 PP, 6 SP	6 [0-29]	2 [0-7.5]
Relapsing MS	35	4.8 (29/6)	36 [20-58]	N/A	N/A	37 RR	6 [0-29]	1.5 [0-7]
Progressive MS	15	1.5 (9/6)	53 [48-68]	N/A	N/A	6 SP, 8 PP	8 [1-32]	5.25 [1.5-7.5]
IBD	15	2 (10/5)	35 [21-59]	N/A	N/A	N/A	12 [2-17]	N/A
HV	30	3.3 (23/7)	39 [23-51]	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Blood samples for TLDA								
MS	8	3 (6/2)	29 [24-36]	N/A	N/A	RR	3 [1-11]	1.75 [0-3]
HV	8	3 (6/2)	27.50 [26-33]	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Blood samples for transmigration								
MS	2	2 (2/0)	37 [34-40]	N/A	N/A	RR	6 [4-8]	1.5 [1.5-1.5]
HV	2	2 (2/0)	40 [37-43]	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Blood samples for activation and CD69, CD244, CD58, CD57 and Tbet staining								
MS	14	6 (12/2)	29 [22-65]	N/A	N/A	RR	5 [0-13]	1 [0-4.5]
HV	13	5.5 (11/2)	27 [24-56]	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
CNS samples								
MS Tissue bank	10	4 (8/2)	45.50 [34-88]	15 [9-28]	8 inf., 2 others	1RR, 1PP, 1 RP, 7 SP	20 [6-30]	ND
Local Tissue bank	3	2 (2/1)	54 [45-66]	8 [6-12]	1 canc., 2 inf.	1 SP, 2 PP	12 [10-23]	8.5 [7.5-9]
Controls	5	1.5 (3/2)	82 [78-87]	23 [11-48]	3 canc., 2 others	N/A	N/A	N/A

*Median [range]

RR: relapsing-remitting - SP: secondary progressive - PP: primary progressive - RP: relapsing progressive - Canc.: cancer - Inf.: infection -

N/A: not applicable - ND: No Data

Supplementary Table 1: Characteristics of the antibodies used

Antigen	Clone	Fluorochrome	Provider	Application
CCR5 (CD195)	2D7	PE	BD Biosciences	FC
CCR7 (CD197)	3D12	PE-Cy7	BD Biosciences	FC
CD11a (LFA1)	HI111	PE	Biolegend	FC
CD161	191B8	PE	Miltenyi	FC
CD161	191B8	APC	Miltenyi	FC
CD161	191B8	Purified	Miltenyi	IF
CD244	C1.7	FITC	Biolegend	FC
CD25	M-A251	FITC	BD Biosciences	FC
CD27	1A4CD27	PE-Cy7	BD Biosciences	FC
CD28	CD28.2	PE	BD Biosciences	FC
CD3	UCHT1	Alexa 700	BD Biosciences	FC
CD3	Polyclonal	Purified	Dako	IF
CD4	RPA-T4	BD V500	BD Biosciences	FC
CD45RA	T6D11	APC Vio770	Miltenyi	FC
CD49d	9F10	PE-Cy7	Biolegend	FC
CD57	TB03	FITC	Miltenyi	FC
CD58	1C3	PE	BD Biosciences	FC
CD62L	DREG57	PE-Cy7	Biolegend	FC
CD69	FN50	PerCp-Cy5.5	BD Biosciences	FC
CD8	RPA-T8	BD V450	BD Biosciences	FC
CD95	DX2	PE-Cy7	Biolegend	FC
CTLA-4	BNI3	APC	BD Biosciences	FC
Granzyme-B	GB11	PE	BD Biosciences	FC
IFN γ	B27	Alexa 700	BD Biosciences	FC
PSGL-1	KPL-1	PE	BD Biosciences	FC
PSGL-1	KPL-1	Purified	BD Biosciences	Trsmg
TCR-V α 7.2	3C10	FITC	Biolegend	FC
TCR-V α 7.2	3C10	Purified	Biolegend	IF
TCR-V α 7.2	REA179	PE-Cy7	Miltenyi	FC
Mouse IgG1	Polyclonal	Alexa 488	Invitrogen	IF
Mouse IgG2a	Polyclonal	Alexa 568	Invitrogen	IF
Rabbit IgG	Polyclonal	Alexa 647	Invitrogen	IF
Streptavidin	Polyclonal	FITC	Invitrogen	FC

IF: Immunofluorescence - FC: Flow cytometry - Trsmg: transmigration

Supplementary table 2: Genes tested on the custom TLDA card

Gene Symbol	Gene name	Assay ID	Gene Symbol	Gene name	Assay ID
GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Hs99999905_m1	PBX3	pre-B-cell leukemia homeobox 3	Hs00608415_m1
GUSB	glucuronidase, beta	Hs00939626_m1	PDCD1	programmed cell death 1	Hs00169472_m1
HPRT1	hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1	Hs01003267_m1	PLCD1	phospholipase C, delta 1	Hs00196502_m1
CCR7	chemokine (C-C motif) receptor 7	Hs00171054_m1	PLSCR1	phospholipid scramblase 1	Hs00275514_m1
HLA-DPA1	major histocompatibility complex, class II, DP alpha 1	Hs00410276_m1	PRF1	perforin 1 (pore forming protein)	Hs00169473_m1
ACTN1	actinin, alpha 1	Hs00241650_m1	PTGER2	prostaglandin E receptor 2 (subtype EP2), 53kDa	Hs00168754_m1
AIF1	allograft inflammatory factor 1	Hs00741549_g1	PTPN6	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 6	Hs00169359_m1
ANXA1	annexin A1	Hs00167549_m1	RAB27A	RAB27A, member RAS oncogene family	Hs00608302_m1
FAS	Fas (TNF receptor superfamily, member 6)	Hs00163653_m1	RABGGTA	Rab geranylgeranyltransferase, alpha subunit	Hs00190170_m1
FASLG	Fas ligand (TNF superfamily, member 6)	Hs00181225_m1	REL	v-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog (avian)	Hs00231279_m1
18S	Eukaryotic 18S rRNA	Hs99999901_s1	CCL3	chemokine (C-C motif) ligand 3	Hs00234142_m1
BAX	BCL2-associated X protein	Hs00180269_m1	CCL4;CCL4L1;CCL4L2	chemokine (C-C motif) ligand 4;chemokine (C-C motif) ligand 4-like 1;chemokine (C-C motif) ligand 4-like 2	Hs00237011_m1
BCL2	B-cell CLL/lymphoma 2	Hs00153350_m1	CCL5	chemokine (C-C motif) ligand 5	Hs00174575_m1
BCL6	B-cell CLL/lymphoma 6	Hs00153368_m1	SELL	selectin L	Hs00174151_m1
PRDM1	PR domain containing 1, with ZNF domain	Hs00153357_m1	TGFB1	transforming growth factor, beta receptor 1	Hs00610318_m1
CASP3	caspase 3, apoptosis-related cysteine peptidase	Hs00234385_m1	TGFB2	transforming growth factor, beta receptor II (70/80kDa)	Hs00234253_m1
CASP4	caspase 4, apoptosis-related cysteine peptidase	Hs00233437_m1	TGFB3	transforming growth factor, beta receptor III	Hs00234257_m1
CD27	CD27 molecule	Hs00154297_m1	VCL	vinculin	Hs00243320_m1
CD28	CD28 molecule	Hs00174796_m1	SNN	stannin	Hs00705084_s1
CD58	CD58 molecule	Hs00156385_m1	EOMES	eomesodermin homolog (Xenopus laevis)	Hs00172872_m1
CD74	CD74 molecule, major histocompatibility complex, class II invariant chain	Hs00269961_m1	HYAL2	hyaluronoglucosaminidase 2	Hs00186839_m1
CKS2	CDC28 protein kinase regulatory subunit 2	Hs01048812_g1	TNFSF10	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10	Hs00234355_m1
CCR5	chemokine (C-C motif) receptor 5	Hs00152917_m1	TNFSF9	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 9	Hs00169409_m1
CTLA4	cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4	Hs00175480_m1	IL18RAP	interleukin 18 receptor accessory protein	Hs00187256_m1
DGKA	diacylglycerol kinase, alpha 80kDa	Hs00176278_m1	IL18R1	interleukin 18 receptor 1	Hs00175381_m1
DAPK3	death-associated protein kinase 3	Hs00154676_m1	SOCS2	suppressor of cytokine signaling 2	Hs00374416_m1
GZMH	granzyme H (cathepsin G-like 2, protein h-CCPX)	Hs00277212_m1	SOCS3	suppressor of cytokine signaling 3	Hs02330328_s1
GZMA	granzyme A (granzyme 1, cytotoxic T-lymphocyte-associated serine esterase 3)	Hs00196206_m1	SNPH	syntaphilin	Hs00207019_m1
GZMB	granzyme B (granzyme 2, cytotoxic T-lymphocyte-associated serine esterase 1)	Hs00188051_m1	SMC4	structural maintenance of chromosomes 4	Hs00193991_m1
GZMK	granzyme K (granzyme 3; tryptase II)	Hs00157878_m1	KLRG1	killer cell lectin-like receptor subfamily G, member 1	Hs00195153_m1
IFNG	interferon, gamma	Hs00174143_m1	CD96	CD96 molecule	Hs00175524_m1
IFNGR1	interferon gamma receptor 1	Hs00166223_m1	GNLY	granulysin	Hs00246266_m1
IFNGR2	interferon gamma receptor 2 (interferon gamma transducer 1)	Hs00194264_m1	CD160	CD160 molecule	Hs00199894_m1
IL7R	interleukin 7 receptor	Hs00233682_m1	KLRK1	killer cell lectin-like receptor subfamily K, member 1	Hs00183683_m1
IL10RA	interleukin 10 receptor, alpha	Hs00155485_m1	PLXND1	plexin D1	Hs00391129_m1
TNFRSF9	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 9	Hs00155512_m1	TBX21	T-box 21	Hs00203436_m1
ITGA4	integrin, alpha 4 (antigen CD49D, alpha 4 subunit of VLA-4 receptor)	Hs00168433_m1	SH3KBP1	SH3-domain kinase binding protein 1	Hs00230414_m1
ITK	IL2-inducible T-cell kinase	Hs00178571_m1	TRAP1	TNF receptor-associated protein 1	Hs00212474_m1
KLRB1	killer cell lectin-like receptor subfamily B, member 1	Hs00174469_m1	CD244	CD244 molecule, natural killer cell receptor 2B4	Hs00175568_m1
KLRC1	killer cell lectin-like receptor subfamily C, member 1	Hs00242628_m1	CD248	CD248 molecule, endosialin	Hs00535586_s1
KLRD1	killer cell lectin-like receptor subfamily D, member 1	Hs00233841_m1	RNF128	ring finger protein 128	Hs00226053_m1
LCK	lymphocyte-specific protein tyrosine kinase	Hs00178427_m1	CDC47	cell division cycle associated 7	Hs00230589_m1
LIMS1	LIM and senescent cell antigen-like domains 1	Hs00192181_m1	BTLA	B and T lymphocyte associated	Hs00699198_m1
LTB	lymphotoxin beta (TNF superfamily, member 3)	Hs00242737_m1	CCR2	chemokine (C-C motif) receptor 2	Hs00174150_m1
SMAD3	SMAD family member 3	Hs00232219_m1	LAG3	lymphocyte-activation gene 3	Hs00158563_m1
MYO5A	myosin VA (heavy chain 12, myoxin)	Hs00165309_m1	KLRC3	killer cell lectin-like receptor subfamily C, member 3	Hs00749702_s1
NFATC2	nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic, calcineurin-dependent 2	Hs00234855_m1	FTH1	ferritin, heavy polypeptide 1	Hs01694011_s1
NKG7	natural killer cell group 7 sequence	Hs00366585_g1	BAD	BCL2-associated agonist of cell death	Hs00188930_m1

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

L'implication des LT CD4⁺ dans la SEP est depuis longtemps avérée. Ces 20 dernières années, l'intérêt s'est aussi porté sur les LT CD8⁺, grâce en partie à des études chez l'homme et à la présence de LT CD8⁺ dans les lésions cérébrales de patients, en quantité variable mais souvent plus importante que les LT CD4⁺ (Babbe et al., 2000; Booss et al., 1983; Démoulins et al., 2003; Hauser et al., 1986; Junker et al., 2007; Skulina et al., 2004). Les deux projets sur lesquels j'ai travaillé portent sur l'implication de sous-populations lymphocytaires T CD8⁺ particulières dans la SEP.

A. ÉTUDE DU RÉPERTOIRE ET CARACTÉRISATION DE LT AUTOREACTIFS DANS LA SEP

L'étude du répertoire permet l'accès à des LT présentant des expansions clonales, c'est-à-dire qui ont proliféré en réponse à une stimulation. On peut donc imaginer que de tels LT soient impliqués dans la maladie, notamment lorsque les expansions sont retrouvées au sein de lésions du SNC. Ainsi, chez nos 3 patients, 80% des altérations présentes dans le LCR, mais aussi plus de 40% des altérations présentes dans les LT CD8⁺ du sang sont présentes dans les lésions. Cela est confirmé par séquençage des clones prédominants. La difficulté, et le cœur de la question, est de savoir à quel degré les LT ainsi définis sont pathogènes et participent donc à la formation des lésions. Nous montrons que les LT CD8⁺ appartenant aux familles Vβ avec des altérations fortes de leur répertoire présentent un biais vers un phénotype mémoire, et notamment central mémoire et TEMRA (*Terminally Effector Memory 45RA⁺*), chez les patients par rapport aux témoins. De plus, ces LT CD8⁺ expriment des niveaux élevés de CCR5, CD11a et GZM-B, leur conférant ainsi des propriétés effectrices et de migration dans le tissu cérébral. Les LT du cerveau, majoritairement des LT CD8⁺, expriment aussi ces marqueurs. Ces données suggèrent donc que les LT oligoclonaux du LCR, ainsi qu'une partie des LT CD8⁺ du sang reflètent des LT potentiellement autoagressifs présents au sein des lésions. Une bibliographie conséquente suggère l'implication des LT oligoclonaux périphériques, notamment CD8⁺, dans la maladie, mais aucune ne compare au même moment le répertoire entre la périphérie et les lésions (Gran et al., 1998; Laplaud et al., 2004, 2006; Matsumoto et al., 2003; Muraro et al., 2002; Musette et al., 1996; Warnke et al., 2013). Notre travail met de plus en évidence que ces LT sont identifiables et accessibles à partir d'une prise de sang et/ou d'une ponction lombaire.

Ce travail ouvre bien sûr la porte à de nombreuses perspectives. Des études fonctionnelles pourraient permettre d'étudier plus en profondeur les LT oligoclonaux retrouvés dans le LCR et dans le sang. Une caractérisation phénotypique plus poussée au niveau des lésions de SNC permettrait aussi de décrire ces LT CD8⁺ de façon plus détaillée : sécrétion de cytokines, localisation par rapport à d'autres types cellulaires, etc. La recherche de l'Ag reconnu par ces LT permettra de définir si oui ou non ces LT sont impliqués dans les processus physiopathologiques de la SEP. Pour cela, un projet au sein de l'équipe consiste à reconstruire les TCR des LT oligoclonaux présents dans le LCR et dans les LT CD8⁺ du sang. En comparaison à la reconstruction du TCR grâce à des LT présents dans des lésions cérébrales et nécessitant l'utilisation de techniques de microdissection laser (Dornmair et al., 2009; Siewert et al., 2012), cette approche offre l'avantage de travailler sur des cellules vivantes, facilement isolables à l'échelle unicellulaire en cytométrie. A ne pas perdre de vue tout de même que les phénomènes d'*epitope spreading* ou le relargage d'Ag cryptiques suite à la destruction tissulaire peuvent rendre l'identification du ou des antigène(s) difficile, d'où l'intérêt de travailler au plus près du début de la maladie c'est à dire au moment du premier événement démyélinisant.

Le développement du séquençage à haut débit constitue une avancée dans l'étude du répertoire par une résolution sans précédent, bien que de nombreux biais techniques et d'analyse soient encore à prendre en compte (Woodsworth et al., 2013). Dans une étude très récente, les auteurs ont étudié par séquençage à haut débit le répertoire des LT dans le sang et le LCR de 10 patients SEP (Lossius et al., 2014). Ils montrent qu'une grande partie des clones sont différents entre le sang et le LCR. De plus, chez les patients mais pas chez les témoins, le LCR présente un enrichissement en séquences V β portées par des LT CD8⁺ et associées à des réponses privées et publiques contre l'EBV. Cela est retrouvé pour les LT CD4⁺, mais ne semble pas spécifique à la maladie car présent aussi chez les contrôles. Ces données sont donc en accord avec l'implication de LT CD8⁺ prédominants dans le LCR de patients. Dans notre étude, une partie des familles avec un répertoire altéré dans le cerveau ne présente pas cette altération en périphérie. Il sera aussi intéressant de cibler ces familles en particulier pour connaître leur implication dans la maladie, par des études d'observation *in situ* ou de microdissection laser.

Il est donc très difficile d'identifier les LT CD8⁺ autoréactifs dans la SEP. Différentes études ont été réalisées chez l'homme, dans lesquelles les LT chez les patients et chez les témoins sont comparés pour leurs phénotypes, leurs propriétés effectrices, ou leur spécificité antigénique, mais ces études sont pour la plupart très descriptives et ne permettent pas de déterminer l'implication des sous-populations de LT CD8⁺ étudiées. Ainsi, par cytométrie en flux dans le sang de patients SEP par rapport aux témoins, une étude met en évidence une diminution des LT CD8⁺ effecteurs mémoire et TEMRA, et une autre une augmentation des LT CD8⁺ de type central mémoire (Liu et al., 2007; Pender et al., 2014a). Ces variations sont associées à une diminution des LT CD8⁺CD11a^{hi} chez les patients SEP et ceux présentant un premier événement démyélinisant, CD11a étant un marqueur associé à la transmigration dans le SNC (Matsui et al., 2010). Ces données suggèrent donc une répartition biaisée des LT CD8⁺ dans le sang de patients, mais ne permettent pas de déterminer leur implication dans la maladie. En parallèle, différentes études se sont intéressées aux LT CD8⁺ dans le LCR des patients SEP. Bien que sous-représentés par rapport aux LT CD4⁺, les LT CD8⁺ du LCR sont enrichis en cellules hautement différenciées, de type effecteur mémoire ou TEMRA, et en LT CD8⁺ producteurs de GZM-B par rapport au sang des patients. Cela suggère encore un mécanisme physiopathologique impliquant les LT CD8⁺, mais sans apporter de données mécanistiques (Iférgan et al., 2011; Jilek et al., 2007; Malmeström et al., 2008). Des études fonctionnelles sur des modèles animaux pertinents sont donc nécessaires pour essayer de comprendre au mieux l'implication de ces cellules. En parallèle, d'autres études se sont intéressées à des sous-populations de LT CD8⁺ précises, portant un TCR invariant, et à leur implication dans la maladie.

B. IMPLICATION DES CELLULES MAIT ET DU MICROBIOTE INTESTINAL DANS LA SEP

Mon deuxième projet a porté sur l'implication dans la SEP des cellules MAIT, très majoritairement des LT CD8⁺ ou DN. D'après nos données, ces cellules présentent des caractéristiques suggérant des capacités d'activation plus importantes chez les patients par rapport aux témoins. Cependant, un tel phénotype n'est pas été retrouvé lors de l'activation des cellules MAIT grâce à des CPA présentant des dérivés d'*E. coli*. De plus, les cellules MAIT des patients ont une expression augmentée de PSGL-1 et de CD11a par rapport aux témoins, ce qui laisse supposer une migration augmentée au sein du SNC. Cependant, elles ne sont présentes qu'en faible quantité au sein du tissu cérébral, en accord avec leur capacité de

migration moindre à travers un modèle de BHE *in vitro* (cellules hCMEC/D3). Ces données n'excluent pas qu'elles pourraient exercer un rôle non spécifique dans le développement et le maintien de la maladie.

L'identification primaire des cellules MAIT au niveau de l'intestin et leur rôle antimicrobien fait écho à la quantité croissante d'études reliant le microbiote intestinal et diverses maladies auto-immunes. En effet, il est clair que le microbiote a un rôle non négligeable dans le développement et l'homéostasie du système immunitaire (Berer and Krishnamoorthy, 2012; Kosiewicz et al., 2011; Wang and Kasper, 2014). Des souris transgéniques dépourvues de tous microorganismes (*germ-free*) ne développent pas d'EAE spontanée, alors que 80% de ces souris élevées dans des conditions où seulement certains pathogènes sont absents la développent (SPF, *specific pathogen-free*) (Berer et al., 2011). L'atténuation de l'EAE chez des souris *germ-free* ou traitées avec des antibiotiques déplaçant en partie la flore commensale est aussi observée en cas d'EAE induite par la MOG ou la PLP (Lee et al., 2011; Ochoa-Repáraz et al., 2009; Yokote et al., 2008). Cette réduction de l'EAE est associée à une diminution des réponses Th1 et Th17 et, selon les études, à une augmentation de LTregs CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ dans l'intestin et la moelle épinière, à une augmentation des LB CD5⁺ produisant de l'IL-10 ou à une altération de la fonction des iNKT (Lee et al., 2011; Ochoa-Repáraz et al., 2009, 2010a; Yokote et al., 2008). Ces données obtenues chez la souris n'ont pas de pendant chez l'homme mais sont en corrélation avec diverses données épidémiologiques. En effet, la prévalence de la SEP est forte dans les pays développés, dans lesquels le mode de vie est associé à un régime alimentaire faible en fibres mais riche en graisse et en protéines animales, à l'utilisation d'antibiotiques, etc (hypothèse hygiéniste). Tous ces paramètres peuvent avoir une influence sur le microbiote intestinal. Ainsi, dans des modèles murins d'EAE induite par la MOG, un régime gras ou élevé en sel semble entraîner une exacerbation de la maladie, associée à une augmentation des Th17 (Kleinewietfeld et al., 2013; Timmermans et al., 2014; Wu et al., 2013). Chez l'homme, la flore intestinale est composée à 90% de *Bacteroidetes* et de *Firmicutes*, en proportions complètement inversées entre les enfants d'Europe ou d'Afrique (Eckburg et al., 2005; De Filippo et al., 2010). De plus, d'autres facteurs de risque de développer la SEP, tels que la prise précoce d'antibiotiques, le régime alimentaire ou les césariennes ont été proposés et ont tous une influence sur le microbiote (Berer et al., 2014; Joscelyn and Kasper, 2014).

Enfin, certains microorganismes ont été éradiqués de nos pays urbanisés, tels que les helminthes, qui sont associés à des réponses Th2 protectrices dans l'EAE (Telesford et al., 2014). L'infection par les helminthes est corrélée à un nombre restreint de poussées et à une augmentation des réponses régulatrices chez les patients SEP (Correale and Farez, 2007; Correale et al., 2008). Ces données ouvrent la voie à l'utilisation thérapeutique de ces microorganismes. Ainsi, le polysaccharide A de *Bacteroides fragilis* confère une protection contre l'EAE, en augmentant les DC CD103⁺, qui induiraient la conversion de CD4⁺ naïves en LTregs producteurs d'IL-10 (Ochoa-Repáraz et al., 2010b, 2010c). Une étude récente montre que cet effet protecteur viendrait aussi de l'expansion de LT CD4⁺CD39⁺ induite par le TLR2 (Wang et al., 2014).

L'effet du microbiote sur le système immunitaire adaptatif est surtout décrit pour le développement des LT CD4⁺ Th17, et pour la mise en place de la réponse LTreg CD4⁺ (Joscelyn and Kasper, 2014; Telesford et al., 2014). D'autres études permettront certainement de comprendre leur implication précise dans le développement des LT CD8⁺, et notamment des cellules MAIT. On sait déjà que la flore commensale est nécessaire à l'accumulation périphérique des MAIT. Ces études, couplées à des analyses de microbiote chez les patients SEP, pourront certainement permettre le développement de stratégies thérapeutiques basées sur la modification du microbiote intestinal.

L'implication des cellules MAIT dans la SEP semble donc plutôt relever d'une activation non spécifique, mais ces cellules ne sont pas les seuls LT CD8⁺ ayant la capacité de produire de l'IL-17 (Fergusson et al., 2011; Walker et al., 2012). D'autres cellules peuvent entrer en jeu.

C. IMPLICATION DES LT CD8⁺ PRODUCTEURS D'IL-17 DANS LA SEP

Au cours des deux études réalisées pendant ma thèse, nous avons étudié la présence de LT au sein de 22 lésions issues de trois patients appartenant à notre banque locale d'échantillons. Les 2/3 des LT infiltrants sont des LT CD8⁺. Si, comme décrit dans un article de 2008, 80% des LT CD8⁺ des lésions actives sont des cellules productrices d'IL-17 (Tzartos et al., 2008) et si, comme dans le sang (Abrahamsson et al., 2013; Walker et al., 2012), 80-90% des CD8⁺ produisant de l'IL-17 dans le cerveau sont des cellules MAIT, on s'attendrait alors à observer entre 30 et 50% de cellules MAIT dans les lésions actives de nos patients. Ce n'est pas le cas d'après nos résultats, qui montrent qu'environ 0,5% des LT infiltrants sont des

cellules MAIT. Différentes hypothèses se dessinent alors : soit la fréquence des LT CD8⁺ produisant de l'IL-17 dans les lésions de notre cohorte est bien inférieure à ce qui a été décrit en 2008, soit nous avons affaire à une autre sous-population de LT CD8⁺ produisant de l'IL-17. Il se peut bien sûr que la réalité se trouve quelque part entre ces deux hypothèses, mais l'on peut aussi imaginer que le microenvironnement inflammatoire induise une différenciation en LT CD8⁺ producteurs d'IL-17. Nous n'avons pas étudié la production d'IL-17 par les LT infiltrants, mais l'expression de CD161, marqueur des cellules productrices d'IL-17 du sang (Maggi et al., 2010). La figure 11 représente les données obtenues dans le sang et le SNC de nos patients.

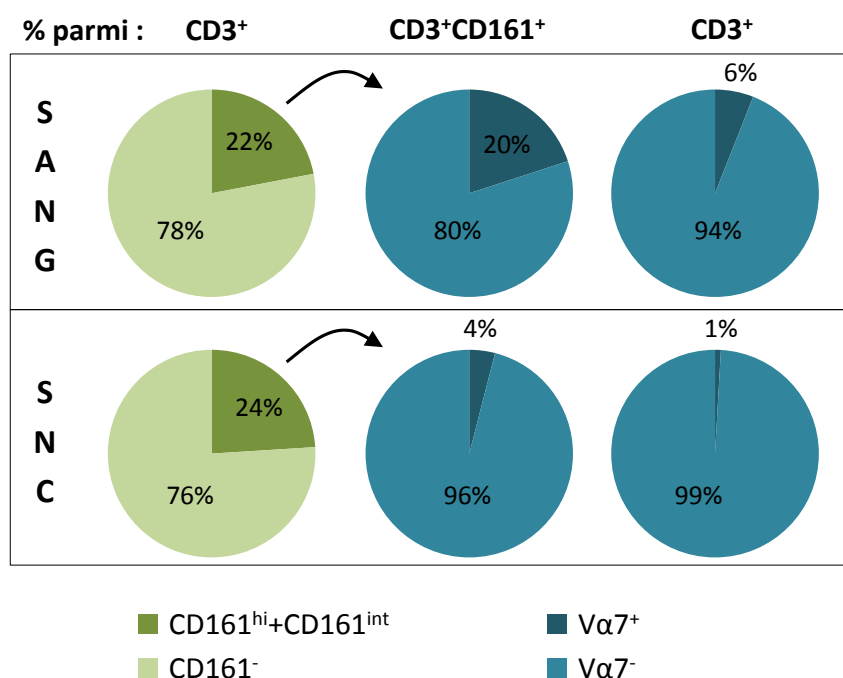


Figure 11 : Comparaison de l'expression de CD161 et de Vα7.2 parmi les LT CD3⁺ ou les LT CD3⁺CD161⁺, dans le sang de notre cohorte de patients recrutés pour l'étude sur les cellules MAIT, et dans les lésions actives (n=9) des trois patients décédés.

Dans le SNC, environ 17% des LT expriment CD161, jusqu'à 24% dans les lésions actives. Ces données sont donc bien en dessous des estimations de l'étude de 2008, si tant est que tous les LT CD161⁺ produisent de l'IL-17. La même proportion de LT exprime CD161 dans le sang (patients RR ou PP). En revanche, 20% des CD3⁺CD161⁺ expriment le Vα7.2 dans le sang contre seulement 4% dans les lésions. Cela suggère donc la présence dans le SNC de sous-populations de LT producteurs d'IL-17 autres que les cellules MAIT, comme cela a pu être décrit dans les lésions de psoriasis (Teunissen et al., 2014). Ces populations pourraient migrer spécifiquement ou alors s'expandre *in situ*. Les marquages réalisés ne nous permettent pas de différencier les LT CD4⁺ et CD8⁺, mais des marquages futurs permettront

de répondre à cette question. Ces marquages seront réalisés sur les lésions de nos trois patients mais aussi sur les lésions des 10 patients de la *UK MS tissue Bank*. De plus, les marquages cytométriques réalisés sur les cellules sanguines pour l'étude des cellules MAIT va aussi nous permettre d'étudier les LT CD8⁺CD161^{+/hi}Vα7.2⁻ chez les patients SEP.

Les LT CD8⁺ producteurs d'IL-17 ou Tc17 sont constitués de plusieurs sous-populations, des cellules MAIT à des cellules présentant des propriétés de cellules souches, en passant par des cellules CD8⁺ à propriétés antivirales (Fergusson et al., 2011). Finalement, assez peu d'études existent quant à leur implication dans la SEP. En plus de l'étude de 2008 qui montre la présence de LT CD8⁺ producteurs d'IL-17 dans les lésions de SEP, une étude de 2009 sur l'EAE retrouve de tels LT dans les ganglions lymphatiques de souris malades (Huber et al., 2009; Tzartos et al., 2008). La même équipe a proposé récemment, toujours dans un modèle animal, que les LT CD8⁺ Tc17 étaient nécessaires pour l'accumulation des LT CD4⁺ Th17 dans le SNC des souris et le développement de la maladie (Huber et al., 2013). De plus, les LT CD8⁺ producteurs d'IL-17 sont présents en plus grande quantité dans le LCR que dans le sang de patients en début de maladie, suggérant là encore leur implication (Huber et al., 2013). D'autres études se sont focalisées sur une population de LT CD8⁺ qui exprime le marqueur CD146 ou MCAM (*Melanoma Cell Adhesion Molecule*), et qui produit de l'IL-17 (Dagur et al., 2014). Cette molécule est exprimée par les cellules endothéliales, certains NK matures et certains LT et LB activés, et est impliquée dans l'adhésion cellulaire (Bardin et al., 2001; Dagur et al., 2014; Guezguez et al., 2007). Dans l'EAE, MCAM a été montré comme important pour la transmigration des LT CD4⁺ et CD8⁺. En effet, chez des souris déficientes en MCAM ou chez des souris sauvages traitées avec un anti-MCAM, la migration des LT Th17 et des CD8⁺ est diminuée et l'EAE réduite (Duan et al., 2013; Flanagan et al., 2012; Larochelle et al., 2012). Chez les patients SEP, les LT CD4⁺MCAM⁺ sont présents en plus grande quantité dans le sang, et de tels LT sont retrouvés dans le SNC (Larochelle et al., 2012). De plus, la forme soluble de MCAM est augmentée dans le LCR des patients, en corrélation avec les anticorps anti-MOG et MBP, ainsi que les niveaux d'IL-2, d'IL-17, de TNFα et d'IFNγ (Duan et al., 2013). A ma connaissance, l'expression de MCAM n'a pas été testée sur les cellules MAIT, mais les propriétés de cette molécule dans la transmigration en font une cible thérapeutique intéressante. D'autres études seront donc nécessaires pour clarifier l'implication des différentes sous-populations de LT CD8⁺ producteurs d'IL-17 dans la physiopathologie de la

SEP. Cependant, une des difficultés se présentant est la difficulté d'accès au siège de la maladie, le cerveau.

D. LA SEP, UNE MALADIE DU SNC

La majorité des études portant sur l'implication des LT dans la SEP utilise des échantillons de sang ou de LCR, beaucoup plus faciles d'accès que les échantillons de cerveau, les biopsies n'étant effectuées que dans de rares cas. Cette difficulté d'accès au matériel, et surtout à du matériel de qualité, en fait une maladie difficile à étudier. L'environnement inflammatoire du SNC pendant la maladie peut influencer sur les différents types cellulaires s'y trouvant, rendant les études périphériques peu pertinentes. Ainsi, il existe une plasticité importante entre les sous-populations Th1/Th17 et Th17/Tregs, médiée par différentes cytokines dont l'IL-23, et l'IL-6, l'IL-1 β et l'IL-21, respectivement (Beriou et al., 2009; Korn et al., 2007; Noack and Miossec, 2014; Sie et al., 2014). De plus, les cellules MAIT peuvent s'activer en présence de différentes cytokines, dont l'IL-18 (Ussher et al., 2014; Willing et al., 2014). Cette cytokine est retrouvée en phase aiguë de l'EAE dans un modèle de rat et des cellules positives pour l'IL-18 sont aussi présentes dans des lésions démyélinisées de patients SEP (Balashov et al., 1999; Jander and Stoll, 1998; Wildbaum et al., 1998). Les cellules MAIT étant des cellules effectrices mémoire portant des molécules impliquées dans la migration au sein du SNC, on peut ainsi imaginer qu'elles puissent migrer et s'activer au sein du SNC de manière non spécifique, et même TCR-indépendante. Cette hypothèse reste néanmoins à vérifier.

L'étude du LCR semble donc être un bon compromis, d'autant qu'il est souvent considéré comme un bon reflet du SNC, du moins meilleur que le sang (Stangel et al., 2013). Nos résultats sur le répertoire vont d'ailleurs dans ce sens, avec 80% des LT oligoclonaux retrouvés dans le LCR, certainement en majorité des LT CD8⁺, qui sont aussi présents dans le SNC.

E. DIFFERENTES HYPOTHESES DE DEVELOPPEMENT DE LA MALADIE

En conclusion, la SEP est une maladie complexe, et différentes hypothèses physiopathologiques ont été développées au cours des années. Je n'en présente ici que quelques unes parmi les plus décrites (figure 12).

La théorie qui a dominé la connaissance sur la SEP durant les dernières décennies est celle impliquant des LT Th1 autoréactifs (Sospedra and Martin, 2005). Les LT Th1 autoréactifs

seraient activés en périphérie par mimétisme moléculaire suite à la présentation d'épitopes de l'EBV proches de ceux de la myéline. Cette activation leur permettrait ensuite de migrer à travers la BHE, par des mécanismes de migration spécifique encore mal décrits, et de rejoindre le SNC au sein duquel ils exerceraient une action délétère notamment par création d'un environnement inflammatoire et recrutement d'autres cellules du système immunitaire.

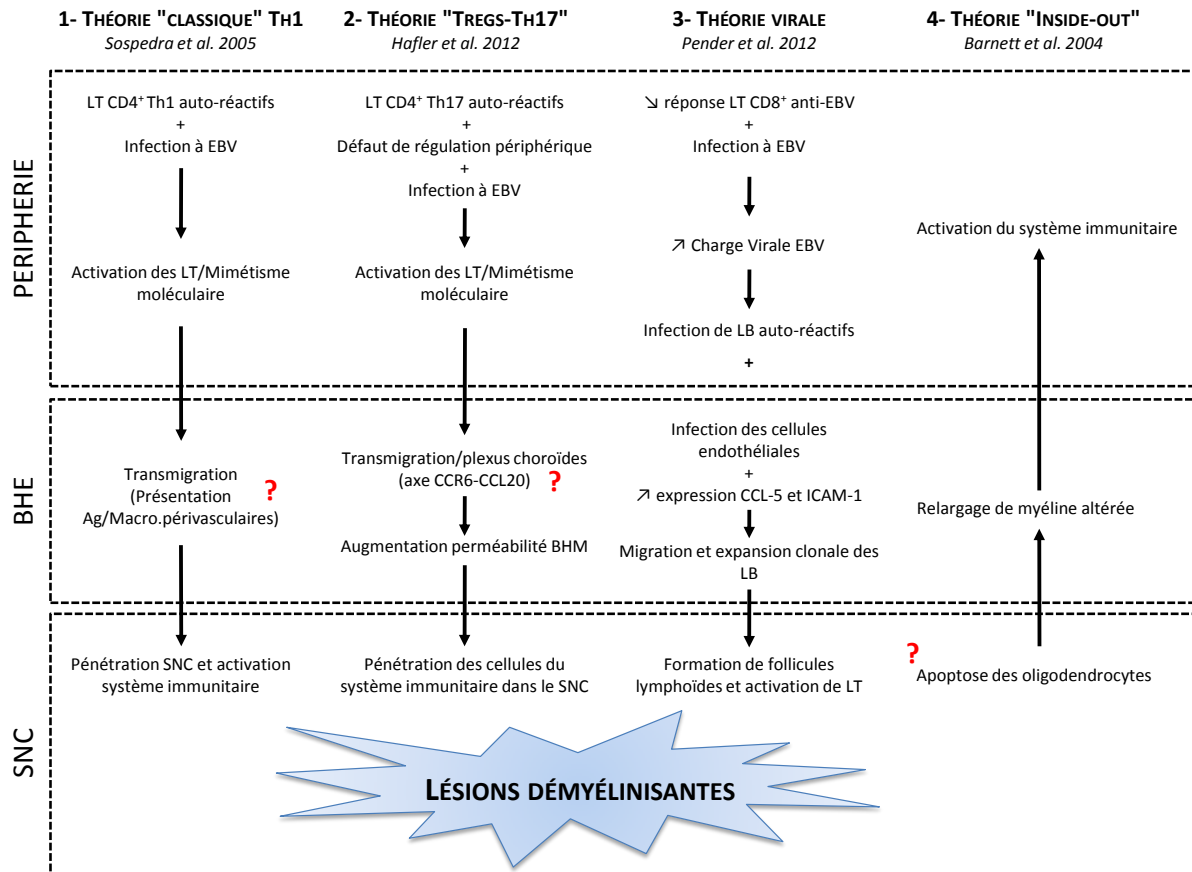


Figure 12 : Hypothèses mécanistiques majeures du développement de la maladie.

La deuxième hypothèse se base sur un défaut de régulation existant chez les patients SEP. Ainsi, certains auteurs proposent que l'activation en périphérie des LT par mimétisme moléculaire avec l'EBV n'est pas contenue par la régulation (Nylander and Hafler, 2012). Une première vague de migration dans le SNC mettrait alors en jeu des LT Th17 qui entreraient par les plexus choroïdes de façon dépendante de CCR6, et qui, après activation des cellules endothéliales, permettraient l'entrée d'autres LT Th17 et Th1 au sein du SNC (Becher and Segal, 2011; Reboldi et al., 2009).

La troisième hypothèse proposée récemment implique les LT CD8⁺, et a l'avantage de lier la génétique, l'environnement, et le système immunitaire. Dans cette hypothèse, l'infection à EBV serait mal contrôlée par les LT CD8⁺ des patients à cause d'un déficit fonctionnel d'origine génétique. Le virus pourrait alors infecter les cellules endothéliales de la BHE, entraînant une perméabilisation de la barrière (Casiraghi et al., 2011). Des LB autoréactifs et infectés par l'EBV pourraient alors gagner le parenchyme cérébral et y survivre. Ils seraient alors responsables de la survie de LT autoréactifs en apportant des signaux de costimulation et présenteraient des autoantigènes à ces LT autoréactifs. A leur tour, ces LT seraient responsables de dommages dans le SNC et entretiendraient la réaction inflammatoire locale. Cela entraînerait aussi la génération de follicules lymphoïdes ectopiques au sein du SNC (Pender, 2012). Récemment, l'équipe à l'origine de cette hypothèse a réalisé chez un patient des transfusions de LT autologues anti-EBV, surtout des LT CD8⁺, sans entraîner d'effet délétère, voire même une amélioration du patient (Pender et al., 2014b). Un essai clinique d'autotransfusion de LT cytotoxiques anti-EBV devrait démarrer en France en 2015, financé par l'ARSEP et dont notre centre sera l'investigateur principal.

La dernière hypothèse ne fait intervenir le système immunitaire qu'en second, la physiopathologie de la maladie s'expliquant alors par une dégénérescence primaire des oligodendrocytes par des mécanismes inconnus, menant à un relargage de peptides de la myéline en périphérie puis à une activation du système immunitaire entretenant ensuite les dommages (Barnett and Prineas, 2004).

D'autres hypothèses existent, comme celle développée récemment selon laquelle l'événement initiateur serait le dérèglement de la perméabilité de la BHE en raison de la présence d'anticorps reconnaissant des déterminants présents à la surface des cellules endothéliales. L'infection à l'EBV pourrait être responsable d'une augmentation de ces anticorps, concomitant donc avec une augmentation de la fréquence des LT et LB anti-EBV chez les patients. Ces LT et LB pourraient alors migrer dans le SNC, initier la réponse inflammatoire et entretenir la perméabilité de la barrière (Soullou, 2013).

En conclusion, malgré une quantité très importante de données générées par l'étude de la maladie, aucun mécanisme clair ne se dégage pour expliquer son développement. Les études sont de plus rendues difficiles du fait qu'il s'agit d'une maladie touchant le SNC,

auquel l'accès reste très restreint. Les études neuropathologiques n'apportant pas d'analyses dynamiques de la situation, elles restent d'interprétation délicate. Les études doivent donc se focaliser sur des compartiments accessibles tels que le sang ou le LCR, dans lesquels l'environnement inflammatoire est certainement très différent de celui du SNC.

Cependant, l'implication de l'immunité est claire, et met en jeu un enchevêtrement de différents sous-types cellulaires ayant eux-mêmes des effets multiples. De plus en plus d'études impliquent notamment les LT CD8⁺, ce qui multiplie encore les voies thérapeutiques à explorer.

RÉFÉRENCES

- Abós, B., Gómez Del Moral, M., Gozalbo-López, B., López-Relaño, J., Viana, V., and Martínez-Naves, E. (2011). Human MR1 expression on the cell surface is acid sensitive, proteasome independent and increases after culturing at 26°C. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *411*, 632–636.
- Abrahamsson, S.V., Angelini, D.F., Dubinsky, A.N., Morel, E., Oh, U., Jones, J.L., Carassiti, D., Reynolds, R., Salvetti, M., Calabresi, P.A., et al. (2013). Non-myeloablative autologous haematopoietic stem cell transplantation expands regulatory cells and depletes IL-17 producing mucosal-associated invariant T cells in multiple sclerosis. *Brain* *136*, 2888–2903.
- Acha-Orbea, H., Mitchell, D.J., Timmermann, L., Wraith, D.C., Tausch, G.S., Waldor, M.K., Zamvil, S.S., McDevitt, H.O., and Steinman, L. (1988). Limited heterogeneity of T cell receptors from lymphocytes mediating autoimmune encephalomyelitis allows specific immune intervention. *Cell* *54*, 263–273.
- Afshar, G., Muraro, P.A., McFarland, H.F., and Martin, R. (1998). Lack of over-expression of T cell receptor Vbeta5.2 in myelin basic protein-specific T cell lines derived from HLA-DR2 positive multiple sclerosis patients and controls. *J. Neuroimmunol.* *84*, 7–13.
- Akirav, E.M., Ruddle, N.H., and Herold, K.C. (2011). The role of AIRE in human autoimmune disease. *Nat. Rev. Endocrinol.* *7*, 25–33.
- Aldemir, H., Prod'homme, V., Dumaurier, M.-J., Retiere, C., Poupon, G., Cazareth, J., Bihl, F., and Braud, V.M. (2005). Cutting edge: lectin-like transcript 1 is a ligand for the CD161 receptor. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *175*, 7791–7795.
- Allen, S., Turner, S.J., Bourges, D., Gleeson, P.A., and van Driel, I.R. (2011). Shaping the T-cell repertoire in the periphery. *Immunol. Cell Biol.* *89*, 60–69.
- Alpdogan, O., and van den Brink, M.R.M. (2012). Immune tolerance and transplantation. *Semin. Oncol.* *39*, 629–642.
- Anderson, M.S., Venzani, E.S., Klein, L., Chen, Z., Berzins, S.P., Turley, S.J., von Boehmer, H., Bronson, R., Dierich, A., Benoist, C., et al. (2002). Projection of an immunological self shadow within the thymus by the aire protein. *Science* *298*, 1395–1401.
- Annibaldi, V., Ristori, G., Angelini, D.F., Serafini, B., Mechelli, R., Cannoni, S., Romano, S., Paolillo, A., Abderrahim, H., Diamantini, A., et al. (2011). CD161(high)CD8+T cells bear pathogenetic potential in multiple sclerosis. *Brain* *134*, 542–554.
- Arstila, T.P., Casrouge, A., Baron, V., Even, J., Kanellopoulos, J., and Kourilsky, P. (1999). A direct estimate of the human alphabeta T cell receptor diversity. *Science* *286*, 958–961.
- Artemiadis, A.K., and Anagnostouli, M.C. (2010). Apoptosis of oligodendrocytes and post-translational modifications of myelin basic protein in multiple sclerosis: possible role for the early stages of multiple sclerosis. *Eur. Neurol.* *63*, 65–72.

- Babbe, H., Roers, A., Waisman, A., Lassmann, H., Goebels, N., Hohlfeld, R., Friese, M., Schröder, R., Deckert, M., and Schmidt, S. (2000). Clonal expansions of CD8+ T cells dominate the T cell infiltrate in active multiple sclerosis lesions as shown by micromanipulation and single cell polymerase chain reaction. *J. Exp. Med.* **192**, 393–404.
- Bahbouhi, B., Pettré, S., Berthelot, L., Garcia, A., Elong Ngono, A., Degauque, N., Michel, L., Wiertlewski, S., Lefrère, F., Meyniel, C., et al. (2010). T cell recognition of self-antigen presenting cells by protein transfer assay reveals a high frequency of anti-myelin T cells in multiple sclerosis. *Brain* **133**, 1622–1636.
- Bahlo, M., Stankovich, J., Danoy, P., Hickey, P.F., Taylor, B.V., Browning, S.R., Australian and New Zealand Multiple Sclerosis Genetics Consortium (ANZgene), Brown, M.A., and Rubio, J.P. (2010). Saliva-derived DNA performs well in large-scale, high-density single-nucleotide polymorphism microarray studies. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev. Publ. Am. Assoc. Cancer Res. Cosponsored Am. Soc. Prev. Oncol.* **19**, 794–798.
- Balashov, K.E., Rottman, J.B., Weiner, H.L., and Hancock, W.W. (1999). CCR5+ and CXCR3+ T cells are increased in multiple sclerosis and their ligands MIP-1 α and IP-10 are expressed in demyelinating brain lesions. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96**, 6873–6878.
- Bankoti, J., Apeltsin, L., Hauser, S.L., Allen, S., Albertolle, M.E., Witkowska, H.E., and von Büdingen, H.-C. (2014). In multiple sclerosis, oligoclonal bands connect to peripheral B-cell responses. *Ann. Neurol.* **75**, 266–276.
- Baranzini, S.E., Wang, J., Gibson, R.A., Galwey, N., Naegelin, Y., Barkhof, F., Radue, E.-W., Lindberg, R.L.P., Uitdehaag, B.M.G., Johnson, M.R., et al. (2009). Genome-wide association analysis of susceptibility and clinical phenotype in multiple sclerosis. *Hum. Mol. Genet.* **18**, 767–778.
- Bardin, N., Anfosso, F., Massé, J.M., Cramer, E., Sabatier, F., Le Bivic, A., Sampol, J., and Dignat-George, F. (2001). Identification of CD146 as a component of the endothelial junction involved in the control of cell-cell cohesion. *Blood* **98**, 3677–3684.
- Barnett, M.H., and Prineas, J.W. (2004). Relapsing and remitting multiple sclerosis: pathology of the newly forming lesion. *Ann. Neurol.* **55**, 458–468.
- Baumann, N., and Pham-Dinh, D. (2001). Biology of oligodendrocyte and myelin in the mammalian central nervous system. *Physiol. Rev.* **81**, 871–927.
- Beall, S.S., Concannon, P., Charmley, P., McFarland, H.F., Gatti, R.A., Hood, L.E., McFarlin, D.E., and Biddison, W.E. (1989). The germline repertoire of T cell receptor β -chain genes in patients with chronic progressive multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.* **21**, 59–66.
- Becher, B., and Segal, B.M. (2011). T(H)17 cytokines in autoimmune neuro-inflammation. *Curr. Opin. Immunol.* **23**, 707–712.
- Becher, B., Durell, B.G., and Noelle, R.J. (2002). Experimental autoimmune encephalitis and inflammation in the absence of interleukin-12. *J. Clin. Invest.* **110**, 493–497.

- Berer, K., and Krishnamoorthy, G. (2012). Commensal gut flora and brain autoimmunity: a love or hate affair? *Acta Neuropathol. (Berl.)* 123, 639–651.
- Berer, K., Mues, M., Koutrolos, M., Rasbi, Z.A., Boziki, M., Johner, C., Wekerle, H., and Krishnamoorthy, G. (2011). Commensal microbiota and myelin autoantigen cooperate to trigger autoimmune demyelination. *Nature* 479, 538–541.
- Berer, K., Boziki, M., and Krishnamoorthy, G. (2014). Selective accumulation of pro-inflammatory T cells in the intestine contributes to the resistance to autoimmune demyelinating disease. *PLoS One* 9, e87876.
- Beriou, G., Costantino, C.M., Ashley, C.W., Yang, L., Kuchroo, V.K., Baecher-Allan, C., and Hafler, D.A. (2009). IL-17-producing human peripheral regulatory T cells retain suppressive function. *Blood* 113, 4240–4249.
- Berthelot, L., Laplaud, D.-A., Pettré, S., Ballet, C., Michel, L., Hillion, S., Braudeau, C., Connan, F., Lefrère, F., Wiertlewski, S., et al. (2008). Blood CD8+ T cell responses against myelin determinants in multiple sclerosis and healthy individuals. *Eur. J. Immunol.* 38, 1889–1899.
- Berzins, S.P., Smyth, M.J., and Baxter, A.G. (2011). Presumed guilty: natural killer T cell defects and human disease. *Nat. Rev. Immunol.* 11, 131–142.
- Bettelli, E., Sullivan, B., Szabo, S.J., Sobel, R.A., Glimcher, L.H., and Kuchroo, V.K. (2004). Loss of T-bet, but not STAT1, prevents the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Exp. Med.* 200, 79–87.
- Billerbeck, E., Kang, Y.-H., Walker, L., Lockstone, H., Grafmueller, S., Fleming, V., Flint, J., Willberg, C.B., Bengsch, B., Seigel, B., et al. (2010). Analysis of CD161 expression on human CD8+ T cells defines a distinct functional subset with tissue-homing properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 3006–3011.
- Birnbaum, M.E., Mendoza, J.L., Sethi, D.K., Dong, S., Glanville, J., Dobbins, J., Özkan, E., Davis, M.M., Wucherpfennig, K.W., and Garcia, K.C. (2014). Deconstructing the Peptide-MHC Specificity of T Cell Recognition. *Cell* 157, 1073–1087.
- Bitsch, A., Schuchardt, J., Bunkowski, S., Kuhlmann, T., and Brück, W. (2000). Acute axonal injury in multiple sclerosis. Correlation with demyelination and inflammation. *Brain J. Neurol.* 123 (Pt 6), 1174–1183.
- Blichfeldt, E., Munthe, L.A., Røtnes, J.S., and Bogen, B. (1996). Dual T cell receptor T cells have a decreased sensitivity to physiological ligands due to reduced density of each T cell receptor. *Eur. J. Immunol.* 26, 2876–2884.
- Booss, J., Esiri, M.M., Tourtellotte, W.W., and Mason, D.Y. (1983). Immunohistological analysis of T lymphocyte subsets in the central nervous system in chronic progressive multiple sclerosis. *J. Neurol. Sci.* 62, 219–232.

- Boucher, A., Desforges, M., Duquette, P., and Talbot, P.J. (2007). Long-term human coronavirus-myelin cross-reactive T-cell clones derived from multiple sclerosis patients. *Clin. Immunol. Orlando Fla* 123, 258–267.
- Bouillet, P., Metcalf, D., Huang, D.C., Tarlinton, D.M., Kay, T.W., Köntgen, F., Adams, J.M., and Strasser, A. (1999). Proapoptotic Bcl-2 relative Bim required for certain apoptotic responses, leukocyte homeostasis, and to preclude autoimmunity. *Science* 286, 1735–1738.
- Le Bourhis, L., Martin, E., Péguillet, I., Guihot, A., Froux, N., Coré, M., Lévy, E., Dusseaux, M., Meyssonier, V., Premel, V., et al. (2010). Antimicrobial activity of mucosal-associated invariant T cells. *Nat. Immunol.* 11, 701–708.
- Le Bourhis, L., Guerri, L., Dusseaux, M., Martin, E., Soudais, C., and Lantz, O. (2011). Mucosal-associated invariant T cells: unconventional development and function. *Trends Immunol.* 32, 212–218.
- Le Bourhis, L., Dusseaux, M., Bohineust, A., Bessoles, S., Martin, E., Premel, V., Coré, M., Sleurs, D., Serriari, N.-E., Treiner, E., et al. (2013a). MAIT cells detect and efficiently lyse bacterially-infected epithelial cells. *PLoS Pathog.* 9, e1003681.
- Le Bourhis, L., Mburu, Y.K., and Lantz, O. (2013b). MAIT cells, surveyors of a new class of antigen: development and functions. *Curr. Opin. Immunol.*
- Bour-Jordan, H., Esensten, J.H., Martinez-Llordella, M., Penaranda, C., Stumpf, M., and Bluestone, J.A. (2011). Intrinsic and extrinsic control of peripheral T-cell tolerance by costimulatory molecules of the CD28/B7 family. *Immunol. Rev.* 241, 180–205.
- Brabb, T., von Dassow, P., Ordonez, N., Schnabel, B., Duke, B., and Goverman, J. (2000). In situ tolerance within the central nervous system as a mechanism for preventing autoimmunity. *J. Exp. Med.* 192, 871–880.
- Brickshawana, A., Hinson, S.R., Romero, M.F., Lucchinetti, C.F., Guo, Y., Buttmann, M., McKeon, A., Pittock, S.J., Chang, M.-H., Chen, A.-P., et al. (2014). Investigation of the KIR4.1 potassium channel as a putative antigen in patients with multiple sclerosis: a comparative study. *Lancet Neurol.* 13, 795–806.
- Bright, J.J., Xin, Z., and Sriram, S. (1999). Superantigens augment antigen-specific Th1 responses by inducing IL-12 production in macrophages. *J. Leukoc. Biol.* 65, 665–670.
- Brocke, S., Gaur, A., Piercy, C., Gautam, A., Gijbels, K., Fathman, C.G., and Steinman, L. (1993). Induction of relapsing paralysis in experimental autoimmune encephalomyelitis by bacterial superantigen. *Nature* 365, 642–644.
- Brucklacher-Waldert, V., Stuermer, K., Kolster, M., Wolthausen, J., and Tolosa, E. (2009). Phenotypical and functional characterization of T helper 17 cells in multiple sclerosis. *Brain* 132, 3329–3341.
- Von Büdingen, H.-C., Bar-Or, A., and Zamvil, S.S. (2011). B cells in multiple sclerosis: connecting the dots. *Curr. Opin. Immunol.* 23, 713–720.

- Von Büdingen, H.-C., Kuo, T.C., Sirota, M., van Belle, C.J., Apeltsin, L., Glanville, J., Cree, B.A., Gourraud, P.-A., Schwartzburg, A., Huerta, G., et al. (2012). B cell exchange across the blood-brain barrier in multiple sclerosis. *J. Clin. Invest.* **122**, 4533–4543.
- Burns, F.R., Li, X.B., Shen, N., Offner, H., Chou, Y.K., Vandenbark, A.A., and Heber-Katz, E. (1989). Both rat and mouse T cell receptors specific for the encephalitogenic determinant of myelin basic protein use similar V alpha and V beta chain genes even though the major histocompatibility complex and encephalitogenic determinants being recognized are different. *J. Exp. Med.* **169**, 27–39.
- Burns, J., Rosenzweig, A., Zweiman, B., and Lisak, R.P. (1983). Isolation of myelin basic protein-reactive T-cell lines from normal human blood. *Cell. Immunol.* **81**, 435–440.
- Burns, J., Littlefield, K., Gill, J., and Trotter, J.L. (1992). Bacterial toxin superantigens activate human T lymphocytes reactive with myelin autoantigens. *Ann. Neurol.* **32**, 352–357.
- Cabre, P., Signate, A., Olindo, S., Merle, H., Caparros-Lefebvre, D., Béra, O., and Smadja, D. (2005). Role of return migration in the emergence of multiple sclerosis in the French West Indies. *Brain J. Neurol.* **128**, 2899–2910.
- Caielli, S., Sorini, C., and Falcone, M. (2011). The dangerous liaison between iNKT cells and dendritic cells: does it prevent or promote autoimmune diseases? *Autoimmunity* **44**, 11–22.
- Carrillo-Vico, A., Leech, M.D., and Anderton, S.M. (2010). Contribution of myelin autoantigen citrullination to T cell autoaggression in the central nervous system. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **184**, 2839–2846.
- Casiraghi, C., Dorovini-Zis, K., and Horwitz, M.S. (2011). Epstein-Barr virus infection of human brain microvessel endothelial cells: a novel role in multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.* **230**, 173–177.
- Cheng, W., Ma, Y., Gong, F., Hu, C., Qian, L., Huang, Q., Yu, Q., Zhang, J., Chen, S., Liu, Z., et al. (2012). Cross-reactivity of autoreactive T cells with MBP and viral antigens in patients with MS. *Front. Biosci. Landmark Ed.* **17**, 1648–1658.
- Chiba, A., Tajima, R., Tomi, C., Miyazaki, Y., Yamamura, T., and Miyake, S. (2012). Mucosal-associated invariant T cells promote inflammation and exacerbate disease in murine models of arthritis. *Arthritis Rheum.* **64**, 153–161.
- Chua, W.-J., Kim, S., Myers, N., Huang, S., Yu, L., Fremont, D.H., Diamond, M.S., and Hansen, T.H. (2011). Endogenous MHC-related protein 1 is transiently expressed on the plasma membrane in a conformation that activates mucosal-associated invariant T cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **186**, 4744–4750.
- Chua, W.-J., Truscott, S.M., Eickhoff, C.S., Blazevic, A., Hoft, D.F., and Hansen, T.H. (2012). Polyclonal mucosa-associated invariant T cells have unique innate functions in bacterial infection. *Infect. Immun.* **80**, 3256–3267.

- Chung, C.Y.J., Ysebaert, D., Berneman, Z.N., and Cools, N. (2013). Dendritic cells: cellular mediators for immunological tolerance. *Clin. Dev. Immunol.* *2013*, 972865.
- Cirone, M., Cuomo, L., Zompetta, C., Ruggieri, S., Frati, L., Faggioni, A., and Ragona, G. (2002). Human herpesvirus 6 and multiple sclerosis: a study of T cell cross-reactivity to viral and myelin basic protein antigens. *J. Med. Virol.* *68*, 268–272.
- Compston, A., and Coles, A. (2008). Multiple sclerosis. *Lancet* *372*, 1502–1517.
- Constantinescu, C.S., Wysocka, M., Hilliard, B., Ventura, E.S., Lavi, E., Trinchieri, G., and Rostami, A. (1998). Antibodies against IL-12 prevent superantigen-induced and spontaneous relapses of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *161*, 5097–5104.
- Corbett, A.J., Eckle, S.B.G., Birkinshaw, R.W., Liu, L., Patel, O., Mahony, J., Chen, Z., Reantragoon, R., Meehan, B., Cao, H., et al. (2014). T-cell activation by transitory neo-antigens derived from distinct microbial pathways. *Nature* *509*, 361–365.
- Correale, J., and Farez, M. (2007). Association between parasite infection and immune responses in multiple sclerosis. *Ann. Neurol.* *61*, 97–108.
- Correale, J., Farez, M., and Razzitte, G. (2008). Helminth infections associated with multiple sclerosis induce regulatory B cells. *Ann. Neurol.* *64*, 187–199.
- Corthay, A., Nandakumar, K.S., and Holmdahl, R. (2001). Evaluation of the percentage of peripheral T cells with two different T cell receptor alpha-chains and of their potential role in autoimmunity. *J. Autoimmun.* *16*, 423–429.
- Cosgrove, C., Ussher, J.E., Rauch, A., Gärtner, K., Kurioka, A., Hühn, M.H., Adelmann, K., Kang, Y.-H., Fergusson, J.R., Simmonds, P., et al. (2012). Early and non-reversible decrease of CD161⁺/MAIT cells in HIV infection. *Blood*.
- Croxford, J.L., Olson, J.K., and Miller, S.D. (2002). Epitope spreading and molecular mimicry as triggers of autoimmunity in the Theiler's virus-induced demyelinating disease model of multiple sclerosis. *Autoimmun. Rev.* *1*, 251–260.
- Croxford, J.L., Anger, H.A., and Miller, S.D. (2005). Viral delivery of an epitope from *Haemophilus influenzae* induces central nervous system autoimmune disease by molecular mimicry. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *174*, 907–917.
- Croxford, J.L., Ercolini, A.M., Degutes, M., and Miller, S.D. (2006a). Structural requirements for initiation of cross-reactivity and CNS autoimmunity with a PLP139-151 mimic peptide derived from murine hepatitis virus. *Eur. J. Immunol.* *36*, 2671–2680.
- Croxford, J.L., Miyake, S., Huang, Y.-Y., Shimamura, M., and Yamamura, T. (2006b). Invariant V(alpha)19i T cells regulate autoimmune inflammation. *Nat. Immunol.* *7*, 987–994.
- Cua, D.J., Sherlock, J., Chen, Y., Murphy, C.A., Joyce, B., Seymour, B., Lucian, L., To, W., Kwan, S., Churakova, T., et al. (2003). Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature* *421*, 744–748.

- Cusick, M.F., Libbey, J.E., and Fujinami, R.S. (2013). Multiple sclerosis: autoimmunity and viruses. *Curr. Opin. Rheumatol.* 25, 496–501.
- Dagur, P.K., Biancotto, A., Stansky, E., Sen, H.N., Nussenblatt, R.B., and McCoy, J.P. (2014). Secretion of interleukin-17 by CD8⁺ T cells expressing CD146 (MCAM). *Clin. Immunol. Orlando Fla* 152, 36–47.
- Davis, M.M., and Bjorkman, P.J. (1988). T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition. *Nature* 334, 395–402.
- Davodeau, F., Peyrat, M.A., Romagné, F., Necker, A., Hallet, M.M., Vié, H., and Bonneville, M. (1995). Dual T cell receptor beta chain expression on human T lymphocytes. *J. Exp. Med.* 181, 1391–1398.
- Degauque, N., Boeffard, F., Foucher, Y., Ballet, C., Brouard, S., and Soullillou, J.-P. (2011). The blood of healthy individuals exhibits CD8 T cells with a highly altered TCR Vb repertoire but with an unmodified phenotype. *PloS One* 6, e21240.
- Démoulin, T., Mouthon, F., Clayette, P., Bequet, D., Gachelin, G., and Dormont, D. (2003). The same TCR (N)Dβ(N)Jβ junctional region is associated with several different vβ13 subtypes in a multiple sclerosis patient at the onset of the disease. *Neurobiol. Dis.* 14, 470–482.
- Denic, A., Wootla, B., and Rodriguez, M. (2013). CD8(+) T cells in multiple sclerosis. *Expert Opin. Ther. Targets* 17, 1053–1066.
- Derbinski, J., Schulte, A., Kyewski, B., and Klein, L. (2001). Promiscuous gene expression in medullary thymic epithelial cells mirrors the peripheral self. *Nat. Immunol.* 2, 1032–1039.
- Disanto, G., Morahan, J.M., Barnett, M.H., Giovannoni, G., and Ramagopalan, S.V. (2012). The evidence for a role of B cells in multiple sclerosis. *Neurology* 78, 823–832.
- Dornmair, K., Meinl, E., and Hohlfeld, R. (2009). Novel approaches for identifying target antigens of autoreactive human B and T cells. *Semin. Immunopathol.* 31, 467–477.
- Drulović, J., Mostarica-Stojković, M., Lević, Z., Stojavljević, N., Pravica, V., and Mesaros, S. (1997). Interleukin-12 and tumor necrosis factor-alpha levels in cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients. *J. Neurol. Sci.* 147, 145–150.
- Duan, H., Xing, S., Luo, Y., Feng, L., Gramaglia, I., Zhang, Y., Lu, D., Zeng, Q., Fan, K., Feng, J., et al. (2013). Targeting endothelial CD146 attenuates neuroinflammation by limiting lymphocyte extravasation to the CNS. *Sci. Rep.* 3, 1687.
- Duddy, M., Niino, M., Adatia, F., Hebert, S., Freedman, M., Atkins, H., Kim, H.J., and Bar-Or, A. (2007). Distinct effector cytokine profiles of memory and naive human B cell subsets and implication in multiple sclerosis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 178, 6092–6099.
- Duddy, M.E., Alter, A., and Bar-Or, A. (2004). Distinct profiles of human B cell effector cytokines: a role in immune regulation? *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 172, 3422–3427.

- Dunne, M.R., Elliott, L., Hussey, S., Mahmud, N., Kelly, J., Doherty, D.G., and Feighery, C.F. (2013). Persistent changes in circulating and intestinal $\gamma\delta$ T cell subsets, invariant natural killer T cells and mucosal-associated invariant T cells in children and adults with coeliac disease. *PLoS One* 8, e76008.
- Durelli, L., Conti, L., Clerico, M., Boselli, D., Contessa, G., Ripellino, P., Ferrero, B., Eid, P., and Novelli, F. (2009). T-helper 17 cells expand in multiple sclerosis and are inhibited by interferon-beta. *Ann. Neurol.* 65, 499–509.
- Dusseaux, M., Martin, E., Serriari, N., Péguillet, I., Premel, V., Louis, D., Milder, M., Le Bourhis, L., Soudais, C., Treiner, E., et al. (2011). Human MAIT cells are xenobiotic-resistant, tissue-targeted, CD161hi IL-17-secreting T cells. *Blood* 117, 1250–1259.
- Eckburg, P.B., Bik, E.M., Bernstein, C.N., Purdom, E., Dethlefsen, L., Sargent, M., Gill, S.R., Nelson, K.E., and Relman, D.A. (2005). Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science* 308, 1635–1638.
- Eckle, S.B.G., Birkinshaw, R.W., Kostenko, L., Corbett, A.J., McWilliam, H.E.G., Reantragoon, R., Chen, Z., Gherardin, N.A., Beddoe, T., Liu, L., et al. (2014). A molecular basis underpinning the T cell receptor heterogeneity of mucosal-associated invariant T cells. *J. Exp. Med.* 211, 1585–1600.
- Eidson, M., Wahlstrom, J., Beaulieu, A.M., Zaidi, B., Carsons, S.E., Crow, P.K., Yuan, J., Wolchok, J.D., Horsthemke, B., Wieczorek, D., et al. (2011). Altered Development of NKT Cells, $\gamma\delta$ T Cells, CD8 T Cells and NK Cells in a PLZF Deficient Patient. *PLoS ONE* 6, e24441.
- Elliott, J.I. (1998). Selection of dual Valpha T cells. *Eur. J. Immunol.* 28, 2115–2123.
- Elliott, J.I., and Altmann, D.M. (1995). Dual T cell receptor alpha chain T cells in autoimmunity. *J. Exp. Med.* 182, 953–959.
- Elliott, J.I., and Altmann, D.M. (1996). Non-obese diabetic mice hemizygous at the T cell receptor alpha locus are susceptible to diabetes and sialitis. *Eur. J. Immunol.* 26, 953–956.
- Ellmerich, S., Takacs, K., Mycko, M., Waldner, H., Wahid, F., Boyton, R.J., Smith, P.A., Amor, S., Baker, D., Hafler, D.A., et al. (2004). Disease-related epitope spread in a humanized T cell receptor transgenic model of multiple sclerosis. *Eur. J. Immunol.* 34, 1839–1848.
- Elong Ngono, A., Pettré, S., Salou, M., Bahbouhi, B., Soullillou, J.-P., Brouard, S., and Laplaud, D.-A. (2012). Frequency of circulating autoreactive T cells committed to myelin determinants in relapsing-remitting multiple sclerosis patients. *Clin. Immunol. Orlando Fla* 144, 117–126.
- Ercolini, A.M., Ludovic Croxford, J., Degutes, M., and Miller, S.D. (2007). Cross-reactivity between peptide mimics of the immunodominant myelin proteolipid protein epitope PLP139-151: comparison of peptide priming in CFA vs. viral delivery. *J. Neuroimmunol.* 186, 5–18.
- Ferber, I.A., Brocke, S., Taylor-Edwards, C., Ridgway, W., Dinisco, C., Steinman, L., Dalton, D., and Fathman, C.G. (1996). Mice with a disrupted IFN-gamma gene are susceptible to the

- induction of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **156**, 5–7.
- Fergusson, J.R., Fleming, V.M., and Klenerman, P. (2011). CD161-expressing human T cells. *Front. Immunol.* **2**, 36.
- De Filippo, C., Cavalieri, D., Di Paola, M., Ramazzotti, M., Poullet, J.B., Massart, S., Collini, S., Pieraccini, G., and Lionetti, P. (2010). Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 14691–14696.
- Fillatreau, S., Sweeney, C.H., McGeachy, M.J., Gray, D., and Anderton, S.M. (2002). B cells regulate autoimmunity by provision of IL-10. *Nat. Immunol.* **3**, 944–950.
- Finnish-German APECED Consortium (1997). An autoimmune disease, APECED, caused by mutations in a novel gene featuring two PHD-type zinc-finger domains. *Nat. Genet.* **17**, 399–403.
- Fisher, G.H., Rosenberg, F.J., Straus, S.E., Dale, J.K., Middleton, L.A., Lin, A.Y., Strober, W., Lenardo, M.J., and Puck, J.M. (1995). Dominant interfering Fas gene mutations impair apoptosis in a human autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Cell* **81**, 935–946.
- Flanagan, K., Fitzgerald, K., Baker, J., Regnstrom, K., Gardai, S., Bard, F., Mocci, S., Seto, P., You, M., Larochelle, C., et al. (2012). Laminin-411 is a vascular ligand for MCAM and facilitates TH17 cell entry into the CNS. *PloS One* **7**, e40443.
- Fletcher, J.M., Lalor, S.J., Sweeney, C.M., Tubridy, N., and Mills, K.H.G. (2010). T cells in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *Clin. Exp. Immunol.* **162**, 1–11.
- Fossati, G., Cooke, A., Papafio, R.Q., Haskins, K., and Stockinger, B. (1999). Triggering a second T cell receptor on diabetogenic T cells can prevent induction of diabetes. *J. Exp. Med.* **190**, 577–583.
- Fritzsche, B., Haas, J., König, F., Kunz, P., Fritzsche, E., Pöschl, J., Krammer, P.H., Brück, W., Suri-Payer, E., and Wildemann, B. (2011). Intracerebral human regulatory T cells: analysis of CD4+ CD25+ FOXP3+ T cells in brain lesions and cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients. *PloS One* **6**, e17988.
- Fromont, A., Binquet, C., Sauleau, E.A., Fournel, I., Bellisario, A., Adnet, J., Weill, A., Vukusic, S., Confavreux, C., Debouverie, M., et al. (2010). Geographic variations of multiple sclerosis in France. *Brain J. Neurol.* **133**, 1889–1899.
- Fromont, A., Binquet, C., Sauleau, E., Fournel, I., Despalins, R., Rollot, F., Weill, A., Clerc, L., Bonithon-Kopp, C., and Moreau, T. (2012). National estimate of multiple sclerosis incidence in France (2001–2007). *Mult. Scler. Houndmills Basingstoke Engl.* **18**, 1108–1115.
- Fu, F., Li, Y., Qian, S., Lu, L., Chambers, F., Starzl, T.E., Fung, J.J., and Thomson, A.W. (1996). Costimulatory molecule-deficient dendritic cell progenitors (MHC class II+, CD80dim, CD86-)

prolong cardiac allograft survival in nonimmunosuppressed recipients. *Transplantation* 62, 659–665.

Fujinami, R.S., and Oldstone, M.B. (1985). Amino acid homology between the encephalitogenic site of myelin basic protein and virus: mechanism for autoimmunity. *Science* 230, 1043–1045.

Galea, I., Bechmann, I., and Perry, V.H. (2007). What is immune privilege (not)? *Trends Immunol.* 28, 12–18.

Gapin, L. (2014). Check MAIT. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 192, 4475–4480.

Georgel, P., Radosavljevic, M., Macquin, C., and Bahram, S. (2011). The non-conventional MHC class I MR1 molecule controls infection by *Klebsiella pneumoniae* in mice. *Mol. Immunol.* 48, 769–775.

Gérart, S., Sibénil, S., Martin, E., Lenoir, C., Aguilar, C., Picard, C., Lantz, O., Fischer, A., and Latour, S. (2013). Human iNKT and MAIT cells exhibit a PLZF-dependent proapoptotic propensity that is counterbalanced by XIAP. *Blood* 121, 614–623.

Germain, C., Meier, A., Jensen, T., Knapnougel, P., Poupon, G., Lazzari, A., Neisig, A., Håkansson, K., Dong, T., Wagtmann, N., et al. (2011). Induction of lectin-like transcript 1 (LLT1) protein cell surface expression by pathogens and interferon- γ contributes to modulate immune responses. *J. Biol. Chem.* 286, 37964–37975.

Gestri, D., Baldacci, L., Taiuti, R., Galli, E., Maggi, E., Piccinni, M.P., Vergelli, M., and Massacesi, L. (2001). Oligoclonal T cell repertoire in cerebrospinal fluid of patients with inflammatory diseases of the nervous system. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 70, 767–772.

Goebels, N., Hofstetter, H., Schmidt, S., Brunner, C., Wekerle, H., and Hohlfeld, R. (2000). Repertoire dynamics of autoreactive T cells in multiple sclerosis patients and healthy subjects: epitope spreading versus clonal persistence. *Brain J. Neurol.* 123 Pt 3, 508–518.

Gold, M.C., Cerri, S., Smyk-Pearson, S., Cansler, M.E., Vogt, T.M., Delepine, J., Winata, E., Swarbrick, G.M., Chua, W.-J., Yu, Y.Y.L., et al. (2010). Human mucosal associated invariant T cells detect bacterially infected cells. *PLoS Biol.* 8, e1000407.

Gold, M.C., Eid, T., Smyk-Pearson, S., Eberling, Y., Swarbrick, G.M., Langley, S.M., Streeter, P.R., Lewinsohn, D.A., and Lewinsohn, D.M. (2012). Human thymic MR1-restricted MAIT cells are innate pathogen-reactive effectors that adapt following thymic egress. *Mucosal Immunol.*

Gold, M.C., McLaren, J.E., Reistetter, J.A., Smyk-Pearson, S., Ladell, K., Swarbrick, G.M., Yu, Y.Y.L., Hansen, T.H., Lund, O., Nielsen, M., et al. (2014). MR1-restricted MAIT cells display ligand discrimination and pathogen selectivity through distinct T cell receptor usage. *J. Exp. Med.* 211, 1601–1610.

- Goldfinch, N., Reinink, P., Connelley, T., Koets, A., Morrison, I., and Van Rhijn, I. (2010). Conservation of mucosal associated invariant T (MAIT) cells and the MR1 restriction element in ruminants, and abundance of MAIT cells in spleen. *Vet. Res.* *41*, 62.
- Gotter, J., Brors, B., Hergenahm, M., and Kyewski, B. (2004). Medullary epithelial cells of the human thymus express a highly diverse selection of tissue-specific genes colocalized in chromosomal clusters. *J. Exp. Med.* *199*, 155–166.
- Goverman, J. (2009). Autoimmune T cell responses in the central nervous system. *Nat. Rev. Immunol.* *9*, 393–407.
- Goverman, J.M. (2011). Immune tolerance in multiple sclerosis. *Immunol. Rev.* *241*, 228–240.
- Gozalbo-López, B., Gómez del Moral, M., Campos-Martín, Y., Setién, F., Martín, P., Bellas, C., Regueiro, J.R., and Martínez-Naves, E. (2009). The MHC-related protein 1 (MR1) is expressed by a subpopulation of CD38+, IgA+ cells in the human intestinal mucosa. *Histol. Histopathol.* *24*, 1439–1449.
- Gran, B., Gestri, D., Sottini, A., Quiròs Roldàn, E., Bettinardi, A., Signorini, S., Primi, D., Ballerini, C., Taiuti, R., Amaducci, L., et al. (1998). Detection of skewed T-cell receptor V-beta gene usage in the peripheral blood of patients with multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.* *85*, 22–32.
- Greathead, L., Metcalf, R., Gazzard, B., Gotch, F., Steel, A., and Kelleher, P. (2014). CD8+/CD161++ mucosal-associated invariant T-cell levels in the colon are restored on long-term antiretroviral therapy and correlate with CD8+ T-cell immune activation. *AIDS Lond. Engl.*
- Greenaway, H.Y., Ng, B., Price, D.A., Douek, D.C., Davenport, M.P., and Venturi, V. (2013). NKT and MAIT invariant TCR α sequences can be produced efficiently by VJ gene recombination. *Immunobiology* *218*, 213–224.
- Greene, M.T., Ercolini, A.M., DeGutes, M., and Miller, S.D. (2008). Differential induction of experimental autoimmune encephalomyelitis by myelin basic protein molecular mimics in mice humanized for HLA-DR2 and an MBP(85-99)-specific T cell receptor. *J. Autoimmun.* *31*, 399–407.
- Griesemer, A.D., Sorenson, E.C., and Hardy, M.A. (2010). The role of the thymus in tolerance. *Transplantation* *90*, 465–474.
- Griewank, K., Borowski, C., Rietdijk, S., Wang, N., Julien, A., Wei, D.G., Mamchak, A.A., Terhorst, C., and Bendelac, A. (2007). Homotypic interactions mediated by Slamf1 and Slamf6 receptors control NKT cell lineage development. *Immunity* *27*, 751–762.
- Grimaldi, D., Le Bourhis, L., Sauneuf, B., Dechartres, A., Rousseau, C., Ouaz, F., Milder, M., Louis, D., Chiche, J.-D., Mira, J.-P., et al. (2014). Specific MAIT cell behaviour among innate-like T lymphocytes in critically ill patients with severe infections. *Intensive Care Med.* *40*, 192–201.

- Guezguez, B., Vigneron, P., Lamerant, N., Kieda, C., Jaffredo, T., and Dunon, D. (2007). Dual role of melanoma cell adhesion molecule (MCAM)/CD146 in lymphocyte endothelium interaction: MCAM/CD146 promotes rolling via microvilli induction in lymphocyte and is an endothelial adhesion receptor. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 179, 6673–6685.
- Hale, J.S., and Fink, P.J. (2010). T-cell receptor revision: friend or foe? *Immunology* 129, 467–473.
- Han, A., Glanville, J., Hansmann, L., and Davis, M.M. (2014). Linking T-cell receptor sequence to functional phenotype at the single-cell level. *Nat. Biotechnol.*
- Harding, F.A., McArthur, J.G., Gross, J.A., Raulet, D.H., and Allison, J.P. (1992). CD28-mediated signalling co-stimulates murine T cells and prevents induction of anergy in T-cell clones. *Nature* 356, 607–609.
- Harkiolaki, M., Holmes, S.L., Svendsen, P., Gregersen, J.W., Jensen, L.T., McMahon, R., Friese, M.A., van Boxel, G., Etzensperger, R., Tzartos, J.S., et al. (2009). T cell-mediated autoimmune disease due to low-affinity crossreactivity to common microbial peptides. *Immunity* 30, 348–357.
- Harp, C.T., Ireland, S., Davis, L.S., Remington, G., Cassidy, B., Cravens, P.D., Stuve, O., Lovett-Racke, A.E., Eagar, T.N., Greenberg, B.M., et al. (2010). Memory B cells from a subset of treatment-naïve relapsing-remitting multiple sclerosis patients elicit CD4(+) T-cell proliferation and IFN- γ production in response to myelin basic protein and myelin oligodendrocyte glycoprotein. *Eur. J. Immunol.* 40, 2942–2956.
- Harriff, M.J., Cansler, M.E., Toren, K.G., Canfield, E.T., Kwak, S., Gold, M.C., and Lewinsohn, D.M. (2014). Human Lung Epithelial Cells Contain Mycobacterium tuberculosis in a Late Endosomal Vacuole and Are Efficiently Recognized by CD8+ T Cells. *PLoS One* 9, e97515.
- Hashimoto, K., Hirai, M., and Kurosawa, Y. (1995). A gene outside the human MHC related to classical HLA class I genes. *Science* 269, 693–695.
- Hauser, S.L., Bhan, A.K., Gilles, F., Kemp, M., Kerr, C., and Weiner, H.L. (1986). Immunohistochemical analysis of the cellular infiltrate in multiple sclerosis lesions. *Ann. Neurol.* 19, 578–587.
- Hauser, S.L., Waubant, E., Arnold, D.L., Vollmer, T., Antel, J., Fox, R.J., Bar-Or, A., Panzara, M., Sarkar, N., Agarwal, S., et al. (2008). B-cell depletion with rituximab in relapsing-remitting multiple sclerosis. *N. Engl. J. Med.* 358, 676–688.
- Havenith, S.H.C., Yong, S.L., Henson, S.M., Piet, B., Idu, M.M., Koch, S.D., Jonkers, R.E., Kragten, N.A.M., Akbar, A.N., van Lier, R.A.W., et al. (2012). Analysis of stem-cell-like properties of human CD161++IL-18R α + memory CD8+ T cells. *Int. Immunol.* 24, 625–636.
- Heath, W.R., Carbone, F.R., Bertolino, P., Kelly, J., Cose, S., and Miller, J.F. (1995). Expression of two T cell receptor alpha chains on the surface of normal murine T cells. *Eur. J. Immunol.* 25, 1617–1623.

- Hedström, A.K., Olsson, T., and Alfredsson, L. (2012). High body mass index before age 20 is associated with increased risk for multiple sclerosis in both men and women. *Mult. Scler. Houndmills Basingstoke Engl.* 18, 1334–1336.
- Hellings, N., Barée, M., Verhoeven, C., D’hooghe, M.B., Medaer, R., Bernard, C.C., Raus, J., and Stinissen, P. (2001). T-cell reactivity to multiple myelin antigens in multiple sclerosis patients and healthy controls. *J. Neurosci. Res.* 63, 290–302.
- Hirota, K., Duarte, J.H., Veldhoen, M., Hornsby, E., Li, Y., Cua, D.J., Ahlfors, H., Wilhelm, C., Tolaini, M., Menzel, U., et al. (2011). Fate mapping of IL-17-producing T cells in inflammatory responses. *Nat. Immunol.* 12, 255–263.
- Hofstetter, H.H., Toyka, K.V., Tary-Lehmann, M., and Lehmann, P.V. (2007). Kinetics and organ distribution of IL-17-producing CD4 cells in proteolipid protein 139-151 peptide-induced experimental autoimmune encephalomyelitis of SJL mice. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 178, 1372–1378.
- Höftberger, R., Aboul-Enein, F., Brueck, W., Lucchinetti, C., Rodriguez, M., Schmidbauer, M., Jellinger, K., and Lassmann, H. (2004). Expression of major histocompatibility complex class I molecules on the different cell types in multiple sclerosis lesions. *Brain Pathol. Zurich Switz.* 14, 43–50.
- Holmøy, T., Kvale, E.Ø., and Vartdal, F. (2004). Cerebrospinal fluid CD4+ T cells from a multiple sclerosis patient cross-recognize Epstein-Barr virus and myelin basic protein. *J. Neurovirol.* 10, 278–283.
- Honma, K., Parker, K.C., Becker, K.G., McFarland, H.F., Coligan, J.E., and Biddison, W.E. (1997). Identification of an epitope derived from human proteolipid protein that can induce autoreactive CD8+ cytotoxic T lymphocytes restricted by HLA-A3: evidence for cross-reactivity with an environmental microorganism. *J. Neuroimmunol.* 73, 7–14.
- Horiuchi, M., Itoh, A., Pleasure, D., and Itoh, T. (2006). MEK-ERK signaling is involved in interferon-gamma-induced death of oligodendroglial progenitor cells. *J. Biol. Chem.* 281, 20095–20106.
- Huang, S., Gilfillan, S., Kim, S., Thompson, B., Wang, X., Sant, A.J., Fremont, D.H., Lantz, O., and Hansen, T.H. (2008). MR1 uses an endocytic pathway to activate mucosal-associated invariant T cells. *J. Exp. Med.* 205, 1201–1211.
- Huang, S., Martin, E., Kim, S., Yu, L., Soudais, C., Fremont, D.H., Lantz, O., and Hansen, T.H. (2009). MR1 antigen presentation to mucosal-associated invariant T cells was highly conserved in evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 8290–8295.
- Huber, M., Heink, S., Grothe, H., Guralnik, A., Reinhard, K., Elflein, K., Hünig, T., Mittrücker, H.-W., Brüstle, A., Kamradt, T., et al. (2009). A Th17-like developmental process leads to CD8(+) Tc17 cells with reduced cytotoxic activity. *Eur. J. Immunol.* 39, 1716–1725.

- Huber, M., Heink, S., Pagenstecher, A., Reinhard, K., Ritter, J., Visekruna, A., Guralnik, A., Bollig, N., Jeltsch, K., Heinemann, C., et al. (2013). IL-17A secretion by CD8⁺ T cells supports Th17-mediated autoimmune encephalomyelitis. *J. Clin. Invest.* *123*, 247–260.
- Ifergan, I., Kebir, H., Alvarez, J.I., Marceau, G., Bernard, M., Bourbonnière, L., Poirier, J., Duquette, P., Talbot, P.J., Arbour, N., et al. (2011). Central nervous system recruitment of effector memory CD8⁺ T lymphocytes during neuroinflammation is dependent on $\alpha 4$ integrin. *Brain J. Neurol.* *134*, 3560–3577.
- Illés, Z., Shimamura, M., Newcombe, J., Oka, N., and Yamamura, T. (2004). Accumulation of V α 7.2–J α 33 invariant T cells in human autoimmune inflammatory lesions in the nervous system. *Int. Immunol.* *16*, 223–230.
- International Multiple Sclerosis Genetics Consortium, Hafler, D.A., Compston, A., Sawcer, S., Lander, E.S., Daly, M.J., De Jager, P.L., de Bakker, P.I.W., Gabriel, S.B., Mirel, D.B., et al. (2007). Risk alleles for multiple sclerosis identified by a genomewide study. *N. Engl. J. Med.* *357*, 851–862.
- International Multiple Sclerosis Genetics Consortium, Wellcome Trust Case Control Consortium 2, Sawcer, S., Hellenthal, G., Pirinen, M., Spencer, C.C.A., Patsopoulos, N.A., Moutsianas, L., Dilthey, A., Su, Z., et al. (2011). Genetic risk and a primary role for cell-mediated immune mechanisms in multiple sclerosis. *Nature* *476*, 214–219.
- Iwata, Y., Matsushita, T., Horikawa, M., Dilillo, D.J., Yanaba, K., Venturi, G.M., Szabolcs, P.M., Bernstein, S.H., Magro, C.M., Williams, A.D., et al. (2011). Characterization of a rare IL-10-competent B-cell subset in humans that parallels mouse regulatory B10 cells. *Blood* *117*, 530–541.
- Jacobsen, M., Cepok, S., Quak, E., Happel, M., Gaber, R., Ziegler, A., Schock, S., Oertel, W.H., Sommer, N., and Hemmer, B. (2002). Oligoclonal expansion of memory CD8⁺ T cells in cerebrospinal fluid from multiple sclerosis patients. *Brain J. Neurol.* *125*, 538–550.
- Jadidi-Niaragh, F., and Mirshafiey, A. (2011). Th17 cell, the new player of neuroinflammatory process in multiple sclerosis. *Scand. J. Immunol.* *74*, 1–13.
- De Jager, P.L., Baecher-Allan, C., Maier, L.M., Arthur, A.T., Ottoboni, L., Barcellos, L., McCauley, J.L., Sawcer, S., Goris, A., Saarela, J., et al. (2009). The role of the CD58 locus in multiple sclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 5264–5269.
- Jamin, C., Morva, A., Lemoine, S., Daridon, C., de Mendoza, A.R., and Youinou, P. (2008). Regulatory B lymphocytes in humans: a potential role in autoimmunity. *Arthritis Rheum.* *58*, 1900–1906.
- Jander, S., and Stoll, G. (1998). Differential induction of interleukin-12, interleukin-18, and interleukin-1 β converting enzyme mRNA in experimental autoimmune encephalomyelitis of the Lewis rat. *J. Neuroimmunol.* *91*, 93–99.

- Jenkins, M.K., and Schwartz, R.H. (1987). Antigen presentation by chemically modified splenocytes induces antigen-specific T cell unresponsiveness in vitro and in vivo. *J. Exp. Med.* **165**, 302–319.
- Ji, Q., Perchellet, A., and Goverman, J.M. (2010). Viral infection triggers central nervous system autoimmunity via activation of CD8+ T cells expressing dual TCRs. *Nat. Immunol.* **11**, 628–634.
- Ji, Q., Castelli, L., and Goverman, J.M. (2013). MHC class I-restricted myelin epitopes are cross-presented by Tip-DCs that promote determinant spreading to CD8+ T cells. *Nat. Immunol.* **14**, 254–261.
- Jiang, J., Wang, X., An, H., Yang, B., Cao, Z., Liu, Y., Su, J., Zhai, F., Wang, R., Zhang, G., et al. (2014). MAIT Cell Function is Modulated by PD-1 Signaling in Patients with Active Tuberculosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*
- Jilek, S., Schluep, M., Rossetti, A.O., Guignard, L., Le Goff, G., Pantaleo, G., and Du Pasquier, R.A. (2007). CSF enrichment of highly differentiated CD8+ T cells in early multiple sclerosis. *Clin. Immunol. Orlando Fla* **123**, 105–113.
- Jingwu, Z., Medaer, R., Hashim, G.A., Chin, Y., van den Berg-Loonen, E., and Raus, J.C. (1992). Myelin basic protein-specific T lymphocytes in multiple sclerosis and controls: precursor frequency, fine specificity, and cytotoxicity. *Ann. Neurol.* **32**, 330–338.
- Jo, J., Tan, A.T., Ussher, J.E., Sandalova, E., Tang, X.-Z., Tan-Garcia, A., To, N., Hong, M., Chia, A., Gill, U.S., et al. (2014). Toll-like receptor 8 agonist and bacteria trigger potent activation of innate immune cells in human liver. *PLoS Pathog.* **10**, e1004210.
- Jordan, M.S., Boesteanu, A., Reed, A.J., Petrone, A.L., Holenbeck, A.E., Lerman, M.A., Naji, A., and Caton, A.J. (2001). Thymic selection of CD4+CD25+ regulatory T cells induced by an agonist self-peptide. *Nat. Immunol.* **2**, 301–306.
- Joscelyn, J., and Kasper, L.H. (2014). Digesting the emerging role for the gut microbiome in central nervous system demyelination. *Mult. Scler. Houndmills Basingstoke Engl.*
- Junker, A., Ivanidze, J., Malotka, J., Eiglmeier, I., Lassmann, H., Wekerle, H., Meinl, E., Hohlfeld, R., and Dornmair, K. (2007). Multiple sclerosis: T-cell receptor expression in distinct brain regions. *Brain* **130**, 2789–2799.
- Kawachi, I., Maldonado, J., Strader, C., and Gilfillan, S. (2006). MR1-restricted V alpha 19i mucosal-associated invariant T cells are innate T cells in the gut lamina propria that provide a rapid and diverse cytokine response. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **176**, 1618–1627.
- Kebir, H., Kreymborg, K., Ifergan, I., Dodelet-Devillers, A., Cayrol, R., Bernard, M., Giuliani, F., Arbour, N., Becher, B., and Prat, A. (2007). Human TH17 lymphocytes promote blood-brain barrier disruption and central nervous system inflammation. *Nat. Med.* **13**, 1173–1175.

- Kebir, H., Ifergan, I., Alvarez, J.I., Bernard, M., Poirier, J., Arbour, N., Duquette, P., and Prat, A. (2009). Preferential recruitment of interferon-gamma-expressing TH17 cells in multiple sclerosis. *Ann. Neurol.* 66, 390–402.
- Kekäläinen, E., Hänninen, A., Maksimow, M., and Arstila, T.P. (2010). T cells expressing two different T cell receptors form a heterogeneous population containing autoreactive clones. *Mol. Immunol.* 48, 211–218.
- Khan, N., Shariff, N., Cobbold, M., Bruton, R., Ainsworth, J.A., Sinclair, A.J., Nayak, L., and Moss, P.A.H. (2002). Cytomegalovirus seropositivity drives the CD8 T cell repertoire toward greater clonality in healthy elderly individuals. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 169, 1984–1992.
- Kim, G., Kohyama, K., Tanuma, N., and Matsumoto, Y. (1998). Diagnosis and assessment of preclinical and clinical autoimmune encephalomyelitis using peripheral blood lymphocyte TCR. *Eur. J. Immunol.* 28, 2751–2759.
- Kim, S.-M., Bhonsle, L., Besgen, P., Nickel, J., Backes, A., Held, K., Vollmer, S., Dornmair, K., and Prinz, J.C. (2012). Analysis of the paired TCR α - and β -chains of single human T cells. *PLoS One* 7, e37338.
- Kirkham, C.L., and Carlyle, J.R. (2014). Complexity and Diversity of the NKR-P1:Clr (Klrb1:Clec2) Recognition Systems. *Front. Immunol.* 5, 214.
- Kjer-Nielsen, L., Patel, O., Corbett, A.J., Le Nours, J., Meehan, B., Liu, L., Bhati, M., Chen, Z., Kostenko, L., Reantragoon, R., et al. (2012). MR1 presents microbial vitamin B metabolites to MAIT cells. *Nature* 491, 717–723.
- Klarenbeek, P.L., de Hair, M.J.H., Doorenspleet, M.E., van Schaik, B.D.C., Esveldt, R.E.E., van de Sande, M.G.H., Cantaert, T., Gerlag, D.M., Baeten, D., van Kampen, A.H.C., et al. (2012). Inflamed target tissue provides a specific niche for highly expanded T-cell clones in early human autoimmune disease. *Ann. Rheum. Dis.* 71, 1088–1093.
- Klehmets, J., Shive, C., Guardia-Wolff, R., Petersen, I., Spack, E.G., Boehm, B.O., Weissert, R., and Forsthuber, T.G. (2004). T cell epitope spreading to myelin oligodendrocyte glycoprotein in HLA-DR4 transgenic mice during experimental autoimmune encephalomyelitis. *Clin. Immunol. Orlando Fla* 111, 53–60.
- Klein, L., Hinterberger, M., Wirnsberger, G., and Kyewski, B. (2009). Antigen presentation in the thymus for positive selection and central tolerance induction. *Nat. Rev. Immunol.* 9, 833–844.
- Kleinewietfeld, M., Manzel, A., Titze, J., Kvakana, H., Yosef, N., Linker, R.A., Müller, D.N., and Hafler, D.A. (2013). Sodium chloride drives autoimmune disease by the induction of pathogenic TH17 cells. *Nature* 496, 518–522.
- Knippenberg, S., Peelen, E., Smolders, J., Thewissen, M., Menheere, P., Cohen Tervaert, J.W., Hupperts, R., and Damschroder, J. (2011). Reduction in IL-10 producing B cells (Breg) in multiple sclerosis is accompanied by a reduced naïve/memory Breg ratio during a relapse but not in remission. *J. Neuroimmunol.* 239, 80–86.

- Koble, C., and Kyewski, B. (2009). The thymic medulla: a unique microenvironment for intercellular self-antigen transfer. *J. Exp. Med.* 206, 1505–1513.
- Komiyama, Y., Nakae, S., Matsuki, T., Nambu, A., Ishigame, H., Kakuta, S., Sudo, K., and Iwakura, Y. (2006). IL-17 plays an important role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 177, 566–573.
- Kondo, T., Takata, H., Matsuki, F., and Takiguchi, M. (2009). Cutting edge: Phenotypic characterization and differentiation of human CD8⁺ T cells producing IL-17. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 182, 1794–1798.
- Korn, T., Reddy, J., Gao, W., Bettelli, E., Awasthi, A., Petersen, T.R., Bäckström, B.T., Sobel, R.A., Wucherpfennig, K.W., Strom, T.B., et al. (2007). Myelin-specific regulatory T cells accumulate in the CNS but fail to control autoimmune inflammation. *Nat. Med.* 13, 423–431.
- Kosiewicz, M.M., Zirnheld, A.L., and Alard, P. (2011). Gut microbiota, immunity, and disease: a complex relationship. *Front. Microbiol.* 2, 180.
- Kotzin, B.L., Karuturi, S., Chou, Y.K., Lafferty, J., Forrester, J.M., Better, M., Nedwin, G.E., Offner, H., and Vandenbark, A.A. (1991). Preferential T-cell receptor beta-chain variable gene use in myelin basic protein-reactive T-cell clones from patients with multiple sclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88, 9161–9165.
- Kroenke, M.A., and Segal, B.M. (2011). IL-23 modulated myelin-specific T cells induce EAE via an IFN γ driven, IL-17 independent pathway. *Brain. Behav. Immun.* 25, 932–937.
- Kuby, J., Kindt, T.J., Osborne, B.A., and Goldsby, R.A. (2008). *Immunologie: le cours de Janis Kuby : avec questions de révision* (Paris: Dunod).
- Kuklina, E.M. (2006). Revision of the antigen receptor of T-lymphocytes. *Biochem. Biokhimiia* 71, 827–837.
- Kurtzke, J.F. (1975). A reassessment of the distribution of multiple sclerosis. Part one. *Acta Neurol. Scand.* 51, 110–136.
- Kurtzke, J.F., and Hyllested, K. (1987). Multiple sclerosis in the Faroe Islands. III. An alternative assessment of the three epidemics. *Acta Neurol. Scand.* 76, 317–339.
- Langrish, C.L., Chen, Y., Blumenschein, W.M., Mattson, J., Basham, B., Sedgwick, J.D., McClanahan, T., Kastelein, R.A., and Cua, D.J. (2005). IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J. Exp. Med.* 201, 233–240.
- Lanier, L.L., Chang, C., and Phillips, J.H. (1994). Human NKR-P1A. A disulfide-linked homodimer of the C-type lectin superfamily expressed by a subset of NK and T lymphocytes. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 153, 2417–2428.
- Laplaud, D.-A., and Confavreux, C. (2006). [Etiology of multiple sclerosis]. *Rev. Prat.* 56, 1306–1312.

- Laplaud, D.-A., Ruiz, C., Wiertlewski, S., Brouard, S., Berthelot, L., Guillet, M., Melchior, B., Degauque, N., Edan, G., Brachet, P., et al. (2004). Blood T-cell receptor beta chain transcriptome in multiple sclerosis. Characterization of the T cells with altered CDR3 length distribution. *Brain J. Neurol.* 127, 981–995.
- Laplaud, D.-A., Berthelot, L., Miqueu, P., Bourcier, K., Moynard, J., Oudinet, Y., Guillet, M., Ruiz, C., Oden, N., Brouard, S., et al. (2006). Serial blood T cell repertoire alterations in multiple sclerosis patients; correlation with clinical and MRI parameters. *J. Neuroimmunol.* 177, 151–160.
- Larochelle, C., Cayrol, R., Kebir, H., Alvarez, J.I., Lecuyer, M.-A., Ifergan, I., Viel, E., Bourbonniere, L., Beauseigle, D., Terouz, S., et al. (2012). Melanoma cell adhesion molecule identifies encephalitogenic T lymphocytes and promotes their recruitment to the central nervous system. *Brain* 135, 2906–2924.
- Lassmann, H. (2007). Experimental models of multiple sclerosis. *Rev. Neurol. (Paris)* 163, 651–655.
- Lassmann, H., Brück, W., and Lucchinetti, C. (2001). Heterogeneity of multiple sclerosis pathogenesis: implications for diagnosis and therapy. *Trends Mol. Med.* 7, 115–121.
- Lee, O.-J., Cho, Y.-N., Kee, S.-J., Kim, M.-J., Jin, H.-M., Lee, S.-J., Park, K.-J., Kim, T.-J., Lee, S.-S., Kwon, Y.-S., et al. (2014). Circulating mucosal-associated invariant T cell levels and their cytokine levels in healthy adults. *Exp. Gerontol.* 49, 47–54.
- Lee, Y.K., Turner, H., Maynard, C.L., Oliver, J.R., Chen, D., Elson, C.O., and Weaver, C.T. (2009). Late developmental plasticity in the T helper 17 lineage. *Immunity* 30, 92–107.
- Lee, Y.K., Menezes, J.S., Umesaki, Y., and Mazmanian, S.K. (2011). Proinflammatory T-cell responses to gut microbiota promote experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108 Suppl 1, 4615–4622.
- Leeansyah, E., Ganesh, A., Quigley, M.F., Sönnernborg, A., Andersson, J., Hunt, P.W., Somsouk, M., Deeks, S.G., Martin, J.N., Moll, M., et al. (2013). Activation, exhaustion, and persistent decline of the antimicrobial MR1-restricted MAIT-cell population in chronic HIV-1 infection. *Blood* 121, 1124–1135.
- Leeansyah, E., Loh, L., Nixon, D.F., and Sandberg, J.K. (2014). Acquisition of innate-like microbial reactivity in mucosal tissues during human fetal MAIT-cell development. *Nat. Commun.* 5, 3143.
- Lefranc, M.-P., Giudicelli, V., Ginestoux, C., Jabado-Michaloud, J., Folch, G., Bellahcene, F., Wu, Y., Gemrot, E., Brochet, X., Lane, J., et al. (2009). IMGT(R), the international ImMunoGeneTics information system(R). *Nucleic Acids Res.* 37, D1006–D1012.
- Lehmann, P.V., Forsthuber, T., Miller, A., and Sercarz, E.E. (1992). Spreading of T-cell autoimmunity to cryptic determinants of an autoantigen. *Nature* 358, 155–157.

- Lenardo, M.J. (1991). Interleukin-2 programs mouse alpha beta T lymphocytes for apoptosis. *Nature* 353, 858–861.
- Lepore, M., Kalinichenko, A., Colone, A., Paleja, B., Singhal, A., Tschumi, A., Lee, B., Poidinger, M., Zolezzi, F., Quagliata, L., et al. (2014). Parallel T-cell cloning and deep sequencing of human MAIT cells reveal stable oligoclonal TCR β repertoire. *Nat. Commun.* 5, 3866.
- Leung, D.T., Bhuiyan, T.R., Nishat, N.S., Hoq, M.R., Aktar, A., Rahman, M.A., Uddin, T., Khan, A.I., Chowdhury, F., Charles, R.C., et al. (2014). Circulating Mucosal Associated Invariant T Cells Are Activated in *Vibrio cholerae* O1 Infection and Associated with Lipopolysaccharide Antibody Responses. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 8, e3076.
- Li, Y., Chu, N., Hu, A., Gran, B., Rostami, A., and Zhang, G.-X. (2007). Increased IL-23p19 expression in multiple sclerosis lesions and its induction in microglia. *Brain J. Neurol.* 130, 490–501.
- Libbey, J.E., Cusick, M.F., and Fujinami, R.S. (2014). Role of Pathogens in Multiple Sclerosis. *Int. Rev. Immunol.* 33, 266–283.
- Lindsey, J.W., and Hatfield, L.M. (2010). Epstein-Barr virus and multiple sclerosis: cellular immune response and cross-reactivity. *J. Neuroimmunol.* 229, 238–242.
- Lion, J., Debuysscher, V., Wlodarczyk, A., Hodroge, A., Serriari, N.-E., Choteau, L., Ouled-Haddou, H., Plistat, M., Lassoued, K., Lantz, O., et al. (2013). MR1B, a natural spliced isoform of the MHC-related 1 protein, is expressed as homodimers at the cell surface and activates MAIT cells. *Eur. J. Immunol.* 43, 1363–1373.
- Liu, G.-Z., Fang, L.-B., Hjelmström, P., and Gao, X.-G. (2007). Increased CD8⁺ central memory T cells in patients with multiple sclerosis. *Mult. Scler. Houndmills Basingstoke Engl.* 13, 149–155.
- Lolli, F., Martini, H., Citro, A., Franceschini, D., Portaccio, E., Amato, M.P., Mechelli, R., Annibaldi, V., Sidney, J., Sette, A., et al. (2013). Increased CD8⁺ T cell responses to apoptotic T cell-associated antigens in multiple sclerosis. *J. Neuroinflammation* 10, 94.
- López-Sagaseta, J., Dulberger, C.L., McFedries, A., Cushman, M., Saghatelian, A., and Adams, E.J. (2013). MAIT recognition of a stimulatory bacterial antigen bound to MR1. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 191, 5268–5277.
- Lossius, A., Johansen, J.N., Vartdal, F., Robins, H., Benth, J.Š., Holmøy, T., and Olweus, J. (2014). High-throughput sequencing of TCR repertoires in multiple sclerosis reveals intrathecal enrichment of EBV-reactive CD8⁽⁺⁾ T cells. *Eur. J. Immunol.*
- Lovato, L., Willis, S.N., Rodig, S.J., Caron, T., Almendinger, S.E., Howell, O.W., Reynolds, R., O'Connor, K.C., and Hafler, D.A. (2011). Related B cell clones populate the meninges and parenchyma of patients with multiple sclerosis. *Brain J. Neurol.* 134, 534–541.
- Lovett-Racke, A.E., Yang, Y., and Racke, M.K. (2011). Th1 versus Th17: are T cell cytokines relevant in multiple sclerosis? *Biochim. Biophys. Acta* 1812, 246–251.

- Lowther, D.E., and Hafler, D.A. (2012). Regulatory T cells in the central nervous system. *Immunol. Rev.* 248, 156–169.
- Lozeron, P., Chabas, D., Duprey, B., Lyon-Caen, O., and Liblau, R. (1998). T cell receptor Vb5 and Vb17 clonal diversity in cerebrospinal fluid and peripheral blood lymphocytes of multiple sclerosis patients. *Mult. Scler.* 4, 154–161.
- Lu, L., Li, W., Fu, F., Chambers, F.G., Qian, S., Fung, J.J., and Thomson, A.W. (1997). Blockade of the CD40-CD40 ligand pathway potentiates the capacity of donor-derived dendritic cell progenitors to induce long-term cardiac allograft survival. *Transplantation* 64, 1808–1815.
- Lucchinetti, C., Brück, W., Parisi, J., Scheithauer, B., Rodriguez, M., and Lassmann, H. (2000). Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination. *Ann. Neurol.* 47, 707–717.
- Lünemann, J.D., Jelčić, I., Roberts, S., Lutterotti, A., Tackenberg, B., Martin, R., and Münz, C. (2008). EBNA1-specific T cells from patients with multiple sclerosis cross react with myelin antigens and co-produce IFN-gamma and IL-2. *J. Exp. Med.* 205, 1763–1773.
- Madsen, L.S., Andersson, E.C., Jansson, L., krogsgaard, M., Andersen, C.B., Engberg, J., Strominger, J.L., Svejgaard, A., Hjorth, J.P., Holmdahl, R., et al. (1999). A humanized model for multiple sclerosis using HLA-DR2 and a human T-cell receptor. *Nat. Genet.* 23, 343–347.
- Maggi, L., Santarasci, V., Capone, M., Peired, A., Frosali, F., Crome, S.Q., Querci, V., Fambrini, M., Liotta, F., Levings, M.K., et al. (2010). CD161 is a marker of all human IL-17-producing T-cell subsets and is induced by RORC. *Eur. J. Immunol.* 40, 2174–2181.
- Magliozzi, R., Howell, O., Vora, A., Serafini, B., Nicholas, R., Puopolo, M., Reynolds, R., and Aloisi, F. (2007). Meningeal B-cell follicles in secondary progressive multiple sclerosis associate with early onset of disease and severe cortical pathology. *Brain* 130, 1089–1104.
- Malmeström, C., Lycke, J., Haghighi, S., Andersen, O., Carlsson, L., Wadenvik, H., and Olsson, B. (2008). Relapses in multiple sclerosis are associated with increased CD8+ T-cell mediated cytotoxicity in CSF. *J. Neuroimmunol.* 196, 159–165.
- Mao, Y.-S., Lu, C.-Z., Wang, X., and Xiao, B.-G. (2007). Induction of experimental autoimmune encephalomyelitis in Lewis rats by a viral peptide with limited homology to myelin basic protein. *Exp. Neurol.* 206, 231–239.
- Markovic-Plese, S., Hemmer, B., Zhao, Y., Simon, R., Pinilla, C., and Martin, R. (2005). High level of cross-reactivity in influenza virus hemagglutinin-specific CD4+ T-cell response: implications for the initiation of autoimmune response in multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.* 169, 31–38.
- Martin, E., Treiner, E., Duban, L., Guerri, L., Laude, H., Toly, C., Premel, V., Devys, A., Moura, I.C., Tilloy, F., et al. (2009). Stepwise development of MAIT cells in mouse and human. *PLoS Biol.* 7, e54.

- Martin, R., Howell, M.D., Jaraquemada, D., Flerlage, M., Richert, J., Brostoff, S., Long, E.O., McFarlin, D.E., and McFarland, H.F. (1991). A myelin basic protein peptide is recognized by cytotoxic T cells in the context of four HLA-DR types associated with multiple sclerosis. *J. Exp. Med.* 173, 19–24.
- Martin, R., Utz, U., Coligan, J.E., Richert, J.R., Flerlage, M., Robinson, E., Stone, R., Biddison, W.E., McFarlin, D.E., and McFarland, H.F. (1992). Diversity in fine specificity and T cell receptor usage of the human CD4⁺ cytotoxic T cell response specific for the immunodominant myelin basic protein peptide 87-106. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 148, 1359–1366.
- Massilamany, C., Asojo, O.A., Gangaplara, A., Steffen, D., and Reddy, J. (2011). Identification of a second mimicry epitope from *Acanthamoeba castellanii* that induces CNS autoimmunity by generating cross-reactive T cells for MBP 89-101 in SJL mice. *Int. Immunol.* 23, 729–739.
- Matossian-Rogers, A., Dos Santos, A., and Festenstein, H. (1987). Human cytotoxic T-cells against measles virus-infected and myelin basic protein-coated targets are cross-reactive. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 84, 159–164.
- Matsui, M., Tahara, M., Tanaka, M., Tanaka, K., Matsui, M., and Konishi, T. (2010). CD8CD11a(high) cells decreased in multiple sclerosis but not in neuromyelitis Optica. *Eur. Neurol.* 63, 159–163.
- Matsumoto, Y., Yoon, W.K., Jee, Y., Fujihara, K., Misu, T., Sato, S., Nakashima, I., and Itoyama, Y. (2003). Complementarity-determining region 3 spectratyping analysis of the TCR repertoire in multiple sclerosis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 170, 4846–4853.
- Matsushita, T., Horikawa, M., Iwata, Y., and Tedder, T.F. (2010). Regulatory B cells (B10 cells) and regulatory T cells have independent roles in controlling experimental autoimmune encephalomyelitis initiation and late-phase immunopathogenesis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 185, 2240–2252.
- Matusevicius, D., Kivisäkk, P., He, B., Kostulas, N., Ozenci, V., Fredrikson, S., and Link, H. (1999). Interleukin-17 mRNA expression in blood and CSF mononuclear cells is augmented in multiple sclerosis. *Mult. Scler. Houndmills Basingstoke Engl.* 5, 101–104.
- Mauri, C., and Bosma, A. (2012). Immune regulatory function of B cells. *Annu. Rev. Immunol.* 30, 221–241.
- Mayo, L., Quintana, F.J., and Weiner, H.L. (2012). The innate immune system in demyelinating disease. *Immunol. Rev.* 248, 170–187.
- McGregor, S., Shah, A., Raca, G., Mirza, M.K., Smith, S.M., Anastasi, J., Vardiman, J.W., Hyjek, E., and Gurbuxani, S. (2014). PLZF staining identifies peripheral T-cell lymphomas derived from innate-like T-cells with TRAV1-2-TRAJ33 TCR- α rearrangement. *Blood* 123, 2742–2743.
- McRae, B.L., Vanderlugt, C.L., Dal Canto, M.C., and Miller, S.D. (1995). Functional evidence for epitope spreading in the relapsing pathology of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Exp. Med.* 182, 75–85.

- Medana, I., Martinic, M.A., Wekerle, H., and Neumann, H. (2001). Transection of major histocompatibility complex class I-induced neurites by cytotoxic T lymphocytes. *Am. J. Pathol.* 159, 809–815.
- Mehling, M., Lindberg, R., Raulf, F., Kuhle, J., Hess, C., Kappos, L., and Brinkmann, V. (2010). Th17 central memory T cells are reduced by FTY720 in patients with multiple sclerosis. *Neurology* 75, 403–410.
- Meier, U.-C., Giovannoni, G., Tzartos, J.S., and Khan, G. (2012). Translational Mini-Review Series on B cell subsets in disease. B cells in multiple sclerosis: drivers of disease pathogenesis and Trojan horse for Epstein-Barr virus entry to the central nervous system? *Clin. Exp. Immunol.* 167, 1–6.
- Meierovics, A., Yankelevich, W.-J.C., and Cowley, S.C. (2013). MAIT cells are critical for optimal mucosal immune responses during in vivo pulmonary bacterial infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*
- Meinl, E., Weber, F., Drexler, K., Morelle, C., Ott, M., Saruhan-Direskeneli, G., Goebels, N., Ertl, B., Jechart, G., and Giegerich, G. (1993). Myelin basic protein-specific T lymphocyte repertoire in multiple sclerosis. Complexity of the response and dominance of nested epitopes due to recruitment of multiple T cell clones. *J. Clin. Invest.* 92, 2633–2643.
- Melcon, M.O., Correale, J., and Melcon, C.M. (2014). Is it time for a new global classification of multiple sclerosis? *J. Neurol. Sci.*
- Merrill, J.E., Kono, D.H., Clayton, J., Ando, D.G., Hinton, D.R., and Hofman, F.M. (1992). Inflammatory leukocytes and cytokines in the peptide-induced disease of experimental allergic encephalomyelitis in SJL and B10.PL mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 574–578.
- Michel, L., Berthelot, L., Pettré, S., Wiertlewski, S., Lefrère, F., Braudeau, C., Brouard, S., Souillou, J.-P., and Laplaud, D.-A. (2008). Patients with relapsing-remitting multiple sclerosis have normal Treg function when cells expressing IL-7 receptor alpha-chain are excluded from the analysis. *J. Clin. Invest.* 118, 3411–3419.
- Miley, M.J., Truscott, S.M., Yu, Y.Y.L., Gilfillan, S., Fremont, D.H., Hansen, T.H., and Lybarger, L. (2003). Biochemical features of the MHC-related protein 1 consistent with an immunological function. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 170, 6090–6098.
- Miyazaki, Y., Miyake, S., Chiba, A., Lantz, O., and Yamamura, T. (2011). Mucosal-associated invariant T cells regulate Th1 response in multiple sclerosis. *Int. Immunol.* 23, 529–535.
- Mohammad, M.G., Tsai, V.W.W., Ruitenber, M.J., Hassanpour, M., Li, H., Hart, P.H., Breit, S.N., Sawchenko, P.E., and Brown, D.A. (2014). Immune cell trafficking from the brain maintains CNS immune tolerance. *J. Clin. Invest.* 124, 1228–1241.
- Molnarfi, N., Schulze-Topphoff, U., Weber, M.S., Patarroyo, J.C., Prod'homme, T., Varrin-Doyer, M., Shetty, A., Linington, C., Slavin, A.J., Hidalgo, J., et al. (2013). MHC class II-dependent B cell APC function is required for induction of CNS autoimmunity independent of myelin-specific antibodies. *J. Exp. Med.* 210, 2921–2937.

- Monteiro, J., Hingorani, R., Peroglizzi, R., Apatoff, B., and Gregersen, P.K. (1996). Oligoclonality of CD8+ T cells in multiple sclerosis. *Autoimmunity* 23, 127–138.
- Montes, M., Zhang, X., Berthelot, L., Laplaud, D.-A., Brouard, S., Jin, J., Rogan, S., Armao, D., Jewells, V., Souillou, J.-P., et al. (2009). Oligoclonal myelin-reactive T-cell infiltrates derived from multiple sclerosis lesions are enriched in Th17 cells. *Clin. Immunol.* 130, 133–144.
- Moran, A.E., and Hogquist, K.A. (2012). T-cell receptor affinity in thymic development. *Immunology* 135, 261–267.
- Morley, J.K., Batliwalla, F.M., Hingorani, R., and Gregersen, P.K. (1995). Oligoclonal CD8+ T cells are preferentially expanded in the CD57+ subset. *J. Immunol. Baltim. Md* 154, 6182–6190.
- Mueller, D.L. (2010). Mechanisms maintaining peripheral tolerance. *Nat. Immunol.* 11, 21–27.
- Mulvey, M.R., Doupe, M., Prout, M., Leong, C., Hizon, R., Grossberndt, A., Klowak, M., Gupta, A., Melanson, M., Gomori, A., et al. (2011). *Staphylococcus aureus* harbouring Enterotoxin A as a possible risk factor for multiple sclerosis exacerbations. *Mult. Scler. Houndmills Basingstoke Engl.* 17, 397–403.
- Munger, K.L., Bentzen, J., Laursen, B., Stenager, E., Koch-Henriksen, N., Sørensen, T.I.A., and Baker, J.L. (2013). Childhood body mass index and multiple sclerosis risk: a long-term cohort study. *Mult. Scler. Houndmills Basingstoke Engl.* 19, 1323–1329.
- Munthe, L.A., Blichfeldt, E., Sollien, A., Dembic, Z., and Bogen, B. (1996). T cells with two Tcrbeta chains and reactivity to both MHC/idiotypic peptide and superantigen. *Cell. Immunol.* 170, 283–290.
- Muraro, P.A., Bonanni, L., Mazzanti, B., Pantalone, A., Traggiai, E., Massacesi, L., Vergelli, M., and Gambi, D. (2002). Short-term dynamics of circulating T cell receptor V beta repertoire in relapsing–remitting MS. *J. Neuroimmunol.* 127, 149–159.
- Muraro, P.A., Cassiani-Ingoni, R., Chung, K., Packer, A.N., Sospedra, M., and Martin, R. (2006). Clonotypic analysis of cerebrospinal fluid T cells during disease exacerbation and remission in a patient with multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.* 171, 177–183.
- Muraro, P.A., Robins, H., Malhotra, S., Howell, M., Phippard, D., Desmarais, C., de Paula Alves Sousa, A., Griffith, L.M., Lim, N., Nash, R.A., et al. (2014). T cell repertoire following autologous stem cell transplantation for multiple sclerosis. *J. Clin. Invest.* 124, 1168–1172.
- Musette, P., Bequet, D., Delarbre, C., Gachelin, G., Kourilsky, P., and Dormont, D. (1996). Expansion of a recurrent V beta 5.3+ T-cell population in newly diagnosed and untreated HLA-DR2 multiple sclerosis patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 12461–12466.
- Musse, A.A., Boggs, J.M., and Harauz, G. (2006). Deimination of membrane-bound myelin basic protein in multiple sclerosis exposes an immunodominant epitope. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 4422–4427.

- Na, S.-Y., Hermann, A., Sanchez-Ruiz, M., Storch, A., Deckert, M., and Hünig, T. (2012). Oligodendrocytes enforce immune tolerance of the uninfected brain by purging the peripheral repertoire of autoreactive CD8(+) T cells. *Immunity* 37, 134–146.
- Nagamine, K., Peterson, P., Scott, H.S., Kudoh, J., Minoshima, S., Heino, M., Krohn, K.J., Lalot, M.D., Mullis, P.E., Antonarakis, S.E., et al. (1997). Positional cloning of the APECED gene. *Nat. Genet.* 17, 393–398.
- Nerrant, E., Salsac, C., Charif, M., Ayrignac, X., Carra-Dalliere, C., Castelnovo, G., Goulabchand, R., Tisseyre, J., Raoul, C., Eliaou, J.-F., et al. (2014). Lack of confirmation of anti-inward rectifying potassium channel 4.1 antibodies as reliable markers of multiple sclerosis. *Mult. Scler. Houndmills Basingstoke Engl.*
- Neumann, H., Medana, I.M., Bauer, J., and Lassmann, H. (2002). Cytotoxic T lymphocytes in autoimmune and degenerative CNS diseases. *Trends Neurosci.* 25, 313–319.
- Ni, P.P., Solomon, B., Hsieh, C.-S., Allen, P.M., and Morris, G.P. (2014). The Ability To Rearrange Dual TCRs Enhances Positive Selection, Leading to Increased Allo- and Autoreactive T Cell Repertoires. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 193, 1778–1786.
- Nikolich-Zugich, J., Slifka, M.K., and Messaoudi, I. (2004). The many important facets of T-cell repertoire diversity. *Nat. Rev. Immunol.* 4, 123–132.
- Noack, M., and Miossec, P. (2014). Th17 and regulatory T cell balance in autoimmune and inflammatory diseases. *Autoimmun. Rev.* 13, 668–677.
- Noseworthy, J.H., Lucchinetti, C., Rodriguez, M., and Weinshenker, B.G. (2000). Multiple sclerosis. *N. Engl. J. Med.* 343, 938–952.
- Novak, J., Dobrovolny, J., Novakova, L., and Kozak, T. (2014). The decrease in number and change in phenotype of mucosal-associated invariant T cells in the elderly and differences in males and females of reproductive age. *Scand. J. Immunol.*
- Ben-Nun, A., Wekerle, H., and Cohen, I.R. (1981). Vaccination against autoimmune encephalomyelitis with T-lymphocyte line cells reactive against myelin basic protein. *Nature* 292, 60–61.
- Ben-Nun, A., Liblau, R.S., Cohen, L., Lehmann, D., Tournier-Lasserre, E., Rosenzweig, A., Zhang, J.W., Raus, J.C., and Bach, M.A. (1991). Restricted T-cell receptor V beta gene usage by myelin basic protein-specific T-cell clones in multiple sclerosis: predominant genes vary in individuals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88, 2466–2470.
- Nylander, A., and Hafler, D.A. (2012). Multiple sclerosis. *J. Clin. Invest.* 122, 1180–1188.
- Ochoa-Repáraz, J., Mielcarz, D.W., Ditrio, L.E., Burroughs, A.R., Foureau, D.M., Haque-Begum, S., and Kasper, L.H. (2009). Role of gut commensal microflora in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 183, 6041–6050.

- Ochoa-Repáraz, J., Mielcarz, D.W., Haque-Begum, S., and Kasper, L.H. (2010a). Induction of a regulatory B cell population in experimental allergic encephalomyelitis by alteration of the gut commensal microflora. *Gut Microbes* 1, 103–108.
- Ochoa-Repáraz, J., Mielcarz, D.W., Ditrio, L.E., Burroughs, A.R., Begum-Haque, S., Dasgupta, S., Kasper, D.L., and Kasper, L.H. (2010b). Central Nervous System Demyelinating Disease Protection by the Human Commensal *Bacteroides fragilis* Depends on Polysaccharide A Expression. *J. Immunol.* 185, 4101–4108.
- Ochoa-Repáraz, J., Mielcarz, D.W., Wang, Y., Begum-Haque, S., Dasgupta, S., Kasper, D.L., and Kasper, L.H. (2010c). A polysaccharide from the human commensal *Bacteroides fragilis* protects against CNS demyelinating disease. *Mucosal Immunol.* 3, 487–495.
- O'Connor, R.A., Prendergast, C.T., Sabatos, C.A., Lau, C.W.Z., Leech, M.D., Wraith, D.C., and Anderton, S.M. (2008). Cutting edge: Th1 cells facilitate the entry of Th17 cells to the central nervous system during experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 181, 3750–3754.
- O'Gorman, C., and Broadley, S.A. (2014). Smoking and multiple sclerosis: evidence for latitudinal and temporal variation. *J. Neurol.*
- Okamoto, N., Kanie, O., Huang, Y.-Y., Fujii, R., Watanabe, H., and Shimamura, M. (2005). Synthetic alpha-mannosyl ceramide as a potent stimulant for an NKT cell repertoire bearing the invariant Valpha19-Jalpha26 TCR alpha chain. *Chem. Biol.* 12, 677–683.
- Oksenberg, J.R., and Baranzini, S.E. (2010). Multiple sclerosis genetics--is the glass half full, or half empty? *Nat. Rev. Neurol.* 6, 429–437.
- Oksenberg, J.R., Stuart, S., Begovich, A.B., Bell, R.B., Erlich, H.A., Steinman, L., and Bernard, C.C. (1990). Limited heterogeneity of rearranged T-cell receptor V alpha transcripts in brains of multiple sclerosis patients. *Nature* 345, 344–346.
- Oksenberg, J.R., Panzara, M.A., Begovich, A.B., Mitchell, D., Erlich, H.A., Murray, R.S., Shimonkevitz, R., Sherritt, M., Rothbard, J., and Bernard, C.C. (1993). Selection for T-cell receptor V beta-D beta-J beta gene rearrangements with specificity for a myelin basic protein peptide in brain lesions of multiple sclerosis. *Nature* 362, 68–70.
- Olerup, O., and Hillert, J. (1991). HLA class II-associated genetic susceptibility in multiple sclerosis: a critical evaluation. *Tissue Antigens* 38, 1–15.
- Olson, J.K., Croxford, J.L., Calenoff, M.A., Dal Canto, M.C., and Miller, S.D. (2001). A virus-induced molecular mimicry model of multiple sclerosis. *J. Clin. Invest.* 108, 311–318.
- Olson, J.K., Eagar, T.N., and Miller, S.D. (2002). Functional activation of myelin-specific T cells by virus-induced molecular mimicry. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 169, 2719–2726.
- Olsson, T., Sun, J., Hillert, J., Höjeberg, B., Ekre, H.P., Andersson, G., Olerup, O., and Link, H. (1992). Increased numbers of T cells recognizing multiple myelin basic protein epitopes in multiple sclerosis. *Eur. J. Immunol.* 22, 1083–1087.

- Van Oosten, B.W., Lai, M., Hodgkinson, S., Barkhof, F., Miller, D.H., Moseley, I.F., Thompson, A.J., Rudge, P., McDougall, A., McLeod, J.G., et al. (1997). Treatment of multiple sclerosis with the monoclonal anti-CD4 antibody cM-T412: results of a randomized, double-blind, placebo-controlled, MR-monitored phase II trial. *Neurology* 49, 351–357.
- Owens, G.P., and Bennett, J.L. (2012). Trigger, pathogen, or bystander: the complex nexus linking Epstein- Barr virus and multiple sclerosis. *Mult. Scler. Houndmills Basingstoke Engl.* 18, 1204–1208.
- Padovan, E., Casorati, G., Dellabona, P., Meyer, S., Brockhaus, M., and Lanzavecchia, A. (1993). Expression of two T cell receptor alpha chains: dual receptor T cells. *Science* 262, 422–424.
- Padovan, E., Giachino, C., Cella, M., Valitutti, S., Acuto, O., and Lanzavecchia, A. (1995). Normal T lymphocytes can express two different T cell receptor beta chains: implications for the mechanism of allelic exclusion. *J. Exp. Med.* 181, 1587–1591.
- Panitch, H.S., Hirsch, R.L., Haley, A.S., and Johnson, K.P. (1987). Exacerbations of multiple sclerosis in patients treated with gamma interferon. *Lancet* 1, 893–895.
- Pannetier, C., Even, J., and Kourilsky, P. (1995). T-cell repertoire diversity and clonal expansions in normal and clinical samples. *Immunol. Today* 16, 176–181.
- Parra-Cuadrado, J.F., Navarro, P., Mirones, I., Setién, F., Oteo, M., and Martínez-Naves, E. (2000). A study on the polymorphism of human MHC class I-related MR1 gene and identification of an MR1-like pseudogene. *Tissue Antigens* 56, 170–172.
- Parra-Cuadrado, J.F., Gómez del Moral, M., García-Pavía, P., Setién, F., and Martínez-Naves, E. (2001). Characterization of the MHC class I-related MR1 locus in nonhuman primates. *Immunogenetics* 53, 643–648.
- Patel, O., Kjer-Nielsen, L., Le Nours, J., Eckle, S.B.G., Birkinshaw, R., Beddoe, T., Corbett, A.J., Liu, L., Miles, J.J., Meehan, B., et al. (2013). Recognition of vitamin B metabolites by mucosal-associated invariant T cells. *Nat. Commun.* 4, 2142.
- Patsopoulos, N.A., Bayer Pharma MS Genetics Working Group, Steering Committees of Studies Evaluating IFN β -1b and a CCR1-Antagonist, ANZgene Consortium, GeneMSA, International Multiple Sclerosis Genetics Consortium, Esposito, F., Reischl, J., Lehr, S., Bauer, D., et al. (2011). Genome-wide meta-analysis identifies novel multiple sclerosis susceptibility loci. *Ann. Neurol.* 70, 897–912.
- Pender, M.P. (2012). CD8+ T-Cell Deficiency, Epstein-Barr Virus Infection, Vitamin D Deficiency, and Steps to Autoimmunity: A Unifying Hypothesis. *Autoimmune Dis.* 2012, 189096.
- Pender, M.P., Csurhes, P.A., Greer, J.M., Mowat, P.D., Henderson, R.D., Cameron, K.D., Purdie, D.M., McCombe, P.A., and Good, M.F. (2000). Surges of increased T cell reactivity to an encephalitogenic region of myelin proteolipid protein occur more often in patients with multiple sclerosis than in healthy subjects. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 165, 5322–5331.

- Pender, M.P., Csurhes, P.A., Pfluger, C.M., and Burrows, S.R. (2014a). Deficiency of CD8+ effector memory T cells is an early and persistent feature of multiple sclerosis. *Mult. Scler. Houndmills Basingstoke Engl.*
- Pender, M.P., Csurhes, P.A., Smith, C., Beagley, L., Hooper, K.D., Raj, M., Coulthard, A., Burrows, S.R., and Khanna, R. (2014b). Epstein-Barr virus-specific adoptive immunotherapy for progressive multiple sclerosis. *Mult. Scler. Houndmills Basingstoke Engl.*
- Peterfalvi, A., Gomori, E., Magyarlaki, T., Pal, J., Banati, M., Javorhazy, A., Szekeres-Bartho, J., Szereday, L., and Illes, Z. (2008). Invariant Valpha7.2-Jalpha33 TCR is expressed in human kidney and brain tumors indicating infiltration by mucosal-associated invariant T (MAIT) cells. *Int. Immunol.* *20*, 1517–1525.
- Petermann, F., and Korn, T. (2011). Cytokines and effector T cell subsets causing autoimmune CNS disease. *FEBS Lett.* *585*, 3747–3757.
- Petrie, H.T., Livak, F., Schatz, D.G., Strasser, A., Crispe, I.N., and Shortman, K. (1993). Multiple rearrangements in T cell receptor alpha chain genes maximize the production of useful thymocytes. *J. Exp. Med.* *178*, 615–622.
- Pierrot-Deseilligny, C., and Souberbielle, J.-C. (2010). Is hypovitaminosis D one of the environmental risk factors for multiple sclerosis? *Brain J. Neurol.* *133*, 1869–1888.
- Pierson, E.R., Stromnes, I.M., and Goverman, J.M. (2014). B cells promote induction of experimental autoimmune encephalomyelitis by facilitating reactivation of T cells in the central nervous system. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *192*, 929–939.
- Porcelli, S., Yockey, C.E., Brenner, M.B., and Balk, S.P. (1993). Analysis of T cell antigen receptor (TCR) expression by human peripheral blood CD4-8- alpha/beta T cells demonstrates preferential use of several V beta genes and an invariant TCR alpha chain. *J. Exp. Med.* *178*, 1–16.
- Posnett, D.N., Sinha, R., Kabak, S., and Russo, C. (1994). Clonal populations of T cells in normal elderly humans: the T cell equivalent to “benign monoclonal gammopathy.” *J. Exp. Med.* *179*, 609–618.
- Racke, M.K., Quigley, L., Cannella, B., Raine, C.S., McFarlin, D.E., and Scott, D.E. (1994). Superantigen modulation of experimental allergic encephalomyelitis: activation of anergy determines outcome. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *152*, 2051–2059.
- Raïch-Regué, D., Grau-López, L., Naranjo-Gómez, M., Ramo-Tello, C., Pujol-Borrell, R., Martínez-Cáceres, E., and Borràs, F.E. (2012). Stable antigen-specific T-cell hyporesponsiveness induced by tolerogenic dendritic cells from multiple sclerosis patients. *Eur. J. Immunol.* *42*, 771–782.
- Reantragoon, R., Kjer-Nielsen, L., Patel, O., Chen, Z., Illing, P.T., Bhati, M., Kostenko, L., Bharadwaj, M., Meehan, B., Hansen, T.H., et al. (2012). Structural insight into MR1-mediated recognition of the mucosal associated invariant T cell receptor. *J. Exp. Med.* *209*, 761–774.

- Reantragoon, R., Corbett, A.J., Sakala, I.G., Gherardin, N.A., Furness, J.B., Chen, Z., Eckle, S.B.G., Uldrich, A.P., Birkinshaw, R.W., Patel, O., et al. (2013). Antigen-loaded MR1 tetramers define T cell receptor heterogeneity in mucosal-associated invariant T cells. *J. Exp. Med.* *210*, 2305–2320.
- Reboldi, A., Coisne, C., Baumjohann, D., Benvenuto, F., Bottinelli, D., Lira, S., Uccelli, A., Lanzavecchia, A., Engelhardt, B., and Sallusto, F. (2009). C-C chemokine receptor 6-regulated entry of TH-17 cells into the CNS through the choroid plexus is required for the initiation of EAE. *Nat. Immunol.* *10*, 514–523.
- Richert, J.R., Robinson, E.D., Reuben-Burnside, C.A., Johnson, A.H., McFarland, H.F., McFarlin, D.E., and Hartzman, R.J. (1988a). Measles virus-specific human T cell clones: studies of alloreactivity and antigenic cross-reactivity. *J. Neuroimmunol.* *19*, 59–68.
- Richert, J.R., Reuben-Burnside, C.A., Deibler, G.E., and Kies, M.W. (1988b). Peptide specificities of myelin basic protein-reactive human T-cell clones. *Neurology* *38*, 739–742.
- Riegiert, P., Wanner, V., and Bahram, S. (1998). Genomics, isoforms, expression, and phylogeny of the MHC class I-related MR1 gene. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *161*, 4066–4077.
- Rivers, T.M., Sprunt, D.H., and Berry, G.P. (1933). OBSERVATIONS ON ATTEMPTS TO PRODUCE ACUTE DISSEMINATED ENCEPHALOMYELITIS IN MONKEYS. *J. Exp. Med.* *58*, 39–53.
- Rosen, D.B., Bettadapura, J., Alsharif, M., Mathew, P.A., Warren, H.S., and Lanier, L.L. (2005). Cutting edge: lectin-like transcript-1 is a ligand for the inhibitory human NKR-P1A receptor. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *175*, 7796–7799.
- Rosen, D.B., Cao, W., Avery, D.T., Tangye, S.G., Liu, Y.-J., Houchins, J.P., and Lanier, L.L. (2008). Functional consequences of interactions between human NKR-P1A and its ligand LLT1 expressed on activated dendritic cells and B cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *180*, 6508–6517.
- Ryan, J.C., Turck, J., Niemi, E.C., Yokoyama, W.M., and Seaman, W.E. (1992). Molecular cloning of the NK1.1 antigen, a member of the NKR-P1 family of natural killer cell activation molecules. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *149*, 1631–1635.
- Salerno-Goncalves, R., Rezwan, T., and Szein, M.B. (2014). B cells modulate mucosal associated invariant T cell immune responses. *Front. Immunol.* *4*, 511.
- Salio, M., Silk, J.D., Jones, E.Y., and Cerundolo, V. (2014). Biology of CD1- and MR1-restricted T cells. *Annu. Rev. Immunol.* *32*, 323–366.
- Salou, M., Elong Ngono, A., Garcia, A., Michel, L., and Laplaud, D.-A. (2013). [Adaptive immunity and pathophysiology of multiple sclerosis]. *Rev. Médecine Interne Fondée Par Société Natl. Française Médecine Interne* *34*, 479–486.
- Salvetti, M., Giovannoni, G., and Aloisi, F. (2009). Epstein-Barr virus and multiple sclerosis. *Curr. Opin. Neurol.* *22*, 201–206.

- Sarukhan, A., Garcia, C., Lanoue, A., and von Boehmer, H. (1998). Allelic inclusion of T cell receptor alpha genes poses an autoimmune hazard due to low-level expression of autospecific receptors. *Immunity* 8, 563–570.
- Sauer, B.M., Schmalstieg, W.F., and Howe, C.L. (2013). Axons are injured by antigen-specific CD8(+) T cells through a MHC class I- and granzyme B-dependent mechanism. *Neurobiol. Dis.* 59, 194–205.
- Savage, A.K., Constantinides, M.G., Han, J., Picard, D., Martin, E., Li, B., Lantz, O., and Bendelac, A. (2008). The transcription factor PLZF directs the effector program of the NKT cell lineage. *Immunity* 29, 391–403.
- Sawcer, S., Franklin, R.J.M., and Ban, M. (2014). Multiple sclerosis genetics. *Lancet Neurol.* 13, 700–709.
- Saxena, A., Martin-Blondel, G., Mars, L.T., and Liblau, R.S. (2011). Role of CD8 T cell subsets in the pathogenesis of multiple sclerosis. *FEBS Lett.* 585, 3758–3763.
- Schachtele, S.J., Hu, S., Sheng, W.S., Mutnal, M.B., and Lokensgard, J.R. (2014). Glial cells suppress postencephalitic CD8(+) T lymphocytes through PD-L1. *Glia*.
- Schiffenbauer, J., Johnson, H.M., Butfiloski, E.J., Wegrzyn, L., and Soos, J.M. (1993). Staphylococcal enterotoxins can reactivate experimental allergic encephalomyelitis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 8543–8546.
- Schildknecht, A., Probst, H.C., McCoy, K.D., Miescher, I., Brenner, C., Leone, D.P., Suter, U., Ohashi, P.S., and van den Broek, M. (2009). Antigens expressed by myelinating glia cells induce peripheral cross-tolerance of endogenous CD8+ T cells. *Eur. J. Immunol.* 39, 1505–1515.
- Schubert, D.A., Gordo, S., Sabatino, J.J., Vardhana, S., Gagnon, E., Sethi, D.K., Seth, N.P., Choudhuri, K., Reijonen, H., Nepom, G.T., et al. (2012). Self-reactive human CD4 T cell clones form unusual immunological synapses. *J. Exp. Med.* 209, 335–352.
- Schwab, R., Szabo, P., Manavalan, J.S., Weksler, M.E., Posnett, D.N., Pannetier, C., Kourilsky, P., and Even, J. (1997). Expanded CD4+ and CD8+ T cell clones in elderly humans. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 158, 4493–4499.
- Seach, N., Guerri, L., Le Bourhis, L., Mburu, Y., Cui, Y., Bessoles, S., Soudais, C., and Lantz, O. (2013). Double-positive thymocytes select mucosal-associated invariant T cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 191, 6002–6009.
- Segal, B.M., and Shevach, E.M. (1996). IL-12 unmasks latent autoimmune disease in resistant mice. *J. Exp. Med.* 184, 771–775.
- Segal, B.M., Constantinescu, C.S., Raychaudhuri, A., Kim, L., Fidelus-Gort, R., Kasper, L.H., and Ustekinumab MS Investigators (2008). Repeated subcutaneous injections of IL12/23 p40 neutralising antibody, ustekinumab, in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis: a

phase II, double-blind, placebo-controlled, randomised, dose-ranging study. *Lancet Neurol.* 7, 796–804.

Seitz, S., Schneider, C.K., Malotka, J., Nong, X., Engel, A.G., Wekerle, H., Hohlfeld, R., and Dornmair, K. (2006). Reconstitution of paired T cell receptor alpha- and beta-chains from microdissected single cells of human inflammatory tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 12057–12062.

Serafini, B., Rosicarelli, B., Franciotta, D., Magliozzi, R., Reynolds, R., Cinque, P., Andreoni, L., Trivedi, P., Salvetti, M., Faggioni, A., et al. (2007). Dysregulated Epstein-Barr virus infection in the multiple sclerosis brain. *J. Exp. Med.* 204, 2899–2912.

Serriari, N.-E., Eoche, M., Lamotte, L., Lion, J., Fumery, M., Marcelo, P., Chatelain, D., Barre, A., Nguyen-Khac, E., Lantz, O., et al. (2014). Innate mucosal-associated invariant T (MAIT) cells are activated in inflammatory bowel diseases. *Clin. Exp. Immunol.* 176, 266–274.

Sewell, A.K. (2012). Why must T cells be cross-reactive? *Nat. Rev. Immunol.* 12, 669–677.

Shimamura, M., and Huang, Y.-Y. (2002). Presence of a novel subset of NKT cells bearing an invariant V(alpha)19.1-J(alpha)26 TCR alpha chain. *FEBS Lett.* 516, 97–100.

Shimamura, M., Huang, Y.-Y., Okamoto, N., Suzuki, N., Yasuoka, J., Morita, K., Nishiyama, A., Amano, Y., and Mishina, T. (2007a). Modulation of Valpha19 NKT cell immune responses by alpha-mannosyl ceramide derivatives consisting of a series of modified sphingosines. *Eur. J. Immunol.* 37, 1836–1844.

Shimamura, M., Huang, Y.-Y., Okamoto, N., Watanabe, Y., Murakami, Y., Kinoshita, T., Hirabayashi, Y., Murakata, C., Ito, Y., and Ogawa, T. (2007b). Glycolipids with nonreducing end alpha-mannosyl residues that have the potential to activate invariant Valpha19 NKT cells. *FEBS J.* 274, 2921–2932.

Sie, C., Korn, T., and Mitsdoerffer, M. (2014). Th17 cells in central nervous system autoimmunity. *Exp. Neurol.*

Siewert, K., Malotka, J., Kawakami, N., Wekerle, H., Hohlfeld, R., and Dornmair, K. (2012). Unbiased identification of target antigens of CD8+ T cells with combinatorial libraries coding for short peptides. *Nat. Med.* 18, 824–828.

Singer, A., Adoro, S., and Park, J.-H. (2008). Lineage fate and intense debate: myths, models and mechanisms of CD4- versus CD8-lineage choice. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 788–801.

Skulina, C., Schmidt, S., Dornmair, K., Babbe, H., Roers, A., Rajewsky, K., Wekerle, H., Hohlfeld, R., and Goebels, N. (2004). Multiple sclerosis: brain-infiltrating CD8+ T cells persist as clonal expansions in the cerebrospinal fluid and blood. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 2428–2433.

Soilu-Hänninen, M., Laaksonen, M., Laitinen, I., Erälinna, J.-P., Lilius, E.-M., and Mononen, I. (2008). A longitudinal study of serum 25-hydroxyvitamin D and intact parathyroid hormone

levels indicate the importance of vitamin D and calcium homeostasis regulation in multiple sclerosis. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 79, 152–157.

Somma, P., Ristori, G., Battistini, L., Cannoni, S., Borsellino, G., Diamantini, A., Salvetti, M., Sorrentino, R., and Fiorillo, M.T. (2007). Characterization of CD8+ T cell repertoire in identical twins discordant and concordant for multiple sclerosis. *J. Leukoc. Biol.* 81, 696–710.

Soos, J.M., Mujtaba, M.G., Schiffenbauer, J., Torres, B.A., and Johnson, H.M. (2002). Intramolecular epitope spreading induced by staphylococcal enterotoxin superantigen reactivation of experimental allergic encephalomyelitis. *J. Neuroimmunol.* 123, 30–34.

Sospedra, M., and Martin, R. (2005). IMMUNOLOGY OF MULTIPLE SCLEROSIS*. *Annu. Rev. Immunol.* 23, 683–747.

Soulillou, J.-P. (2013). Missing links in multiple sclerosis etiology. A working connecting hypothesis. *Med. Hypotheses* 80, 509–516.

Srivastava, R., Aslam, M., Kalluri, S.R., Schirmer, L., Buck, D., Tackenberg, B., Rothhammer, V., Chan, A., Gold, R., Berthele, A., et al. (2012). Potassium channel KIR4.1 as an immune target in multiple sclerosis. *N. Engl. J. Med.* 367, 115–123.

Stangel, M., Fredrikson, S., Meinl, E., Petzold, A., Stüve, O., and Tumani, H. (2013). The utility of cerebrospinal fluid analysis in patients with multiple sclerosis. *Nat. Rev. Neurol.*

Starr, T.K., Jameson, S.C., and Hogquist, K.A. (2003). Positive and negative selection of T cells. *Annu. Rev. Immunol.* 21, 139–176.

Sun, D. (1993). Staphylococcal enterotoxin enhances the activation of rat encephalitogenic T cells by myelin basic protein. *J. Neuroimmunol.* 46, 5–10.

Sun, D., Whitaker, J.N., Huang, Z., Liu, D., Coleclough, C., Wekerle, H., and Raine, C.S. (2001). Myelin antigen-specific CD8+ T cells are encephalitogenic and produce severe disease in C57BL/6 mice. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 166, 7579–7587.

Suzuki, A., Yamaguchi, M.T., Ohteki, T., Sasaki, T., Kaisho, T., Kimura, Y., Yoshida, R., Wakeham, A., Higuchi, T., Fukumoto, M., et al. (2001). T cell-specific loss of Pten leads to defects in central and peripheral tolerance. *Immunity* 14, 523–534.

Szczepanik, M. (2011). Mechanisms of immunological tolerance to the antigens of the central nervous system. Skin-induced tolerance as a new therapeutic concept. *J. Physiol. Pharmacol. Off. J. Pol. Physiol. Soc.* 62, 159–165.

Takahama, Y. (2006). Journey through the thymus: stromal guides for T-cell development and selection. *Nat. Rev. Immunol.* 6, 127–135.

Takahashi, T., Dejbakhsh-Jones, S., and Strober, S. (2006). Expression of CD161 (NKR-P1A) defines subsets of human CD4 and CD8 T cells with different functional activities. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 176, 211–216.

- Talbot, P.J., Paquette, J.S., Ciurli, C., Antel, J.P., and Ouellet, F. (1996). Myelin basic protein and human coronavirus 229E cross-reactive T cells in multiple sclerosis. *Ann. Neurol.* **39**, 233–240.
- Tang, X.-Z., Jo, J., Tan, A.T., Sandalova, E., Chia, A., Tan, K.C., Lee, K.H., Gehring, A.J., De Libero, G., and Bertoletti, A. (2013). IL-7 Licenses Activation of Human Liver Intrasinusoidal Mucosal-Associated Invariant T Cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950*.
- Teh, H.S., Kisielow, P., Scott, B., Kishi, H., Uematsu, Y., Blüthmann, H., and von Boehmer, H. (1988). Thymic major histocompatibility complex antigens and the alpha beta T-cell receptor determine the CD4/CD8 phenotype of T cells. *Nature* **335**, 229–233.
- Tejada-Simon, M.V., Zang, Y.C.Q., Hong, J., Rivera, V.M., and Zhang, J.Z. (2003). Cross-reactivity with myelin basic protein and human herpesvirus-6 in multiple sclerosis. *Ann. Neurol.* **53**, 189–197.
- Telesford, K., Ochoa-Repáraz, J., and Kasper, L.H. (2014). Gut commensalism, cytokines, and central nervous system demyelination. *J. Interferon Cytokine Res. Off. J. Int. Soc. Interferon Cytokine Res.* **34**, 605–614.
- Teunissen, M.B.M., Yeremenko, N.G., Baeten, D.L.P., Chielie, S., Spuls, P.I., de Rie, M.A., Lantz, O., and Res, P.C.M. (2014). The IL-17A–Producing CD8+ T Cell Population in Psoriatic Lesional Skin Comprises Mucosa-Associated Invariant T cells and Conventional T Cells. *J. Invest. Dermatol.*
- Tilloy, F., Treiner, E., Park, S.H., Garcia, C., Lemonnier, F., de la Salle, H., Bendelac, A., Bonneville, M., and Lantz, O. (1999). An invariant T cell receptor alpha chain defines a novel TAP-independent major histocompatibility complex class Ib-restricted alpha/beta T cell subpopulation in mammals. *J. Exp. Med.* **189**, 1907–1921.
- Timmermans, S., Bogie, J.F.J., Vanmierlo, T., Lütjohann, D., Stinissen, P., Hellings, N., and Hendriks, J.J.A. (2014). High fat diet exacerbates neuroinflammation in an animal model of multiple sclerosis by activation of the Renin Angiotensin system. *J. Neuroimmune Pharmacol. Off. J. Soc. NeuroImmune Pharmacol.* **9**, 209–217.
- Treiner, E., and Lantz, O. (2006). CD1d- and MR1-restricted invariant T cells: of mice and men. *Curr. Opin. Immunol.* **18**, 519–526.
- Treiner, E., Duban, L., Bahram, S., Radosavljevic, M., Wanner, V., Tilloy, F., Affaticati, P., Gilfillan, S., and Lantz, O. (2003). Selection of evolutionarily conserved mucosal-associated invariant T cells by MR1. *Nature* **422**, 164–169.
- Tremlett, H., van der Mei, I.A.F., Pittas, F., Blizzard, L., Paley, G., Mesaros, D., Woodbaker, R., Nunez, M., Dwyer, T., Taylor, B.V., et al. (2008). Monthly ambient sunlight, infections and relapse rates in multiple sclerosis. *Neuroepidemiology* **31**, 271–279.
- Tsai, S., and Santamaria, P. (2013). MHC Class II Polymorphisms, Autoreactive T-Cells, and Autoimmunity. *Front. Immunol.* **4**, 321.

- Tsukamoto, K., Deakin, J.E., Graves, J.A.M., and Hashimoto, K. (2013). Exceptionally high conservation of the MHC class I-related gene, MR1, among mammals. *Immunogenetics* 65, 115–124.
- Turtle, C.J., Swanson, H.M., Fujii, N., Estey, E.H., and Riddell, S.R. (2009). A distinct subset of self-renewing human memory CD8⁺ T cells survives cytotoxic chemotherapy. *Immunity* 31, 834–844.
- Turtle, C.J., Delrow, J., Joslyn, R.C., Swanson, H.M., Basom, R., Tabellini, L., Delaney, C., Heimfeld, S., Hansen, J.A., and Riddell, S.R. (2011). Innate signals overcome acquired TCR signaling pathway regulation and govern the fate of human CD161(hi) CD8 α^+ semi-invariant T cells. *Blood* 118, 2752–2762.
- Tzartos, J.S., Friese, M.A., Craner, M.J., Palace, J., Newcombe, J., Esiri, M.M., and Fugger, L. (2008). Interleukin-17 production in central nervous system-infiltrating T cells and glial cells is associated with active disease in multiple sclerosis. *Am. J. Pathol.* 172, 146–155.
- Tzartos, J.S., Khan, G., Vossenkamper, A., Cruz-Sadaba, M., Lonardi, S., Sefia, E., Meager, A., Elia, A., Middeldorp, J.M., Clemens, M., et al. (2012). Association of innate immune activation with latent Epstein-Barr virus in active MS lesions. *Neurology* 78, 15–23.
- Ueno, T., Saito, F., Gray, D.H.D., Kuse, S., Hieshima, K., Nakano, H., Kakiuchi, T., Lipp, M., Boyd, R.L., and Takahama, Y. (2004). CCR7 signals are essential for cortex-medulla migration of developing thymocytes. *J. Exp. Med.* 200, 493–505.
- Urban, J.L., Kumar, V., Kono, D.H., Gomez, C., Horvath, S.J., Clayton, J., Ando, D.G., Sercarz, E.E., and Hood, L. (1988). Restricted use of T cell receptor V genes in murine autoimmune encephalomyelitis raises possibilities for antibody therapy. *Cell* 54, 577–592.
- Ussher, J.E., Bilton, M., Attwod, E., Shadwell, J., Richardson, R., de Lara, C., Mettke, E., Kurioka, A., Hansen, T.H., Klenerman, P., et al. (2014). CD161⁺⁺ CD8⁺ T cells, including the MAIT cell subset, are specifically activated by IL-12+IL-18 in a TCR-independent manner. *Eur. J. Immunol.* 44, 195–203.
- Vartanian, T., Li, Y., Zhao, M., and Stefansson, K. (1995). Interferon-gamma-induced oligodendrocyte cell death: implications for the pathogenesis of multiple sclerosis. *Mol. Med. Camb. Mass* 1, 732–743.
- Venken, K., Hellings, N., Liblau, R., and Stinissen, P. (2010). Disturbed regulatory T cell homeostasis in multiple sclerosis. *Trends Mol. Med.* 16, 58–68.
- Viglietta, V., Baecher-Allan, C., Weiner, H.L., and Hafler, D.A. (2004). Loss of functional suppression by CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. *J. Exp. Med.* 199, 971–979.
- Vollmer, T.L., Wynn, D.R., Alam, M.S., and Valdes, J. (2011). A phase 2, 24-week, randomized, placebo-controlled, double-blind study examining the efficacy and safety of an anti-interleukin-12 and -23 monoclonal antibody in patients with relapsing-remitting or

secondary progressive multiple sclerosis. *Mult. Scler.* Houndmills Basingstoke Engl. 17, 181–191.

Walker, L.S.K., and Abbas, A.K. (2002). The enemy within: keeping self-reactive T cells at bay in the periphery. *Nat. Rev. Immunol.* 2, 11–19.

Walker, L.J., Kang, Y.-H., Smith, M.O., Tharmalingham, H., Ramamurthy, N., Fleming, V.M., Sahgal, N., Leslie, A., Oo, Y., Geremia, A., et al. (2012). Human MAIT and CD8 $\alpha\alpha$ cells develop from a pool of type-17 precommitted CD8 $^{+}$ T cells. *Blood* 119, 422–433.

Wallström, E., Khademi, M., Andersson, M., Weissert, R., Linington, C., and Olsson, T. (1998). Increased reactivity to myelin oligodendrocyte glycoprotein peptides and epitope mapping in HLA DR2(15) $^{+}$ multiple sclerosis. *Eur. J. Immunol.* 28, 3329–3335.

Walter, L., and Günther, E. (1998). Isolation and molecular characterization of the rat MR1 homologue, a non-MHC-linked class I-related gene. *Immunogenetics* 47, 477–482.

Wang, Y., and Kasper, L.H. (2014). The role of microbiome in central nervous system disorders. *Brain. Behav. Immun.* 38, 1–12.

Wang, H.H., Dai, Y.Q., Qiu, W., Lu, Z.Q., Peng, F.H., Wang, Y.G., Bao, J., Li, Y., and Hu, X.Q. (2011). Interleukin-17-secreting T cells in neuromyelitis optica and multiple sclerosis during relapse. *J. Clin. Neurosci. Off. J. Neurosurg. Soc. Australas.* 18, 1313–1317.

Wang, Y., Telesford, K.M., Ochoa-Repáraz, J., Haque-Begum, S., Christy, M., Kasper, E.J., Wang, L., Wu, Y., Robson, S.C., Kasper, D.L., et al. (2014). An intestinal commensal symbiosis factor controls neuroinflammation via TLR2-mediated CD39 signalling. *Nat. Commun.* 5, 4432.

Warnke, C., Mausberg, A.K., Stettner, M., Dehmel, T., Nekrich, L., Meyer Zu Horste, G., Hartung, H.-P., Fogdell-Hahn, A., Adams, O., and Kieseier, B.C. (2013). Natalizumab affects the T-cell receptor repertoire in patients with multiple sclerosis. *Neurology* 81, 1400–1408.

Watanabe-Fukunaga, R., Brannan, C.I., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., and Nagata, S. (1992). Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis. *Nature* 356, 314–317.

Wildbaum, G., Youssef, S., Grabie, N., and Karin, N. (1998). Neutralizing antibodies to IFN- γ -inducing factor prevent experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 161, 6368–6374.

Wildin, R.S., Smyk-Pearson, S., and Filipovich, A.H. (2002). Clinical and molecular features of the immunodysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X linked (IPEX) syndrome. *J. Med. Genet.* 39, 537–545.

Willing, A., Leach, O.A., Ufer, F., Attfield, K.E., Steinbach, K., Kursawe, N., Piedavent, M., and Friese, M.A. (2014). CD8 $^{+}$ MAIT cells infiltrate into the CNS and alterations in their blood frequencies correlate with IL-18 serum levels in multiple sclerosis. *Eur. J. Immunol.*

- Windhagen, A., Newcombe, J., Dangond, F., Strand, C., Woodroffe, M.N., Cuzner, M.L., and Hafler, D.A. (1995). Expression of costimulatory molecules B7-1 (CD80), B7-2 (CD86), and interleukin 12 cytokine in multiple sclerosis lesions. *J. Exp. Med.* **182**, 1985–1996.
- Wing, K., and Sakaguchi, S. (2010). Regulatory T cells exert checks and balances on self tolerance and autoimmunity. *Nat. Immunol.* **11**, 7–13.
- Wolf, S.D., Dittel, B.N., Hardardottir, F., and Janeway, C.A., Jr (1996). Experimental autoimmune encephalomyelitis induction in genetically B cell-deficient mice. *J. Exp. Med.* **184**, 2271–2278.
- Wong, E.B., Akilimali, N.A., Govender, P., Sullivan, Z.A., Cosgrove, C., Pillay, M., Lewinsohn, D.M., Bishai, W.R., Walker, B.D., Ndung'u, T., et al. (2013). Low levels of peripheral CD161⁺⁺CD8⁺ mucosal associated invariant T (MAIT) cells are found in HIV and HIV/TB co-infection. *PloS One* **8**, e83474.
- Woodsworth, D.J., Castellarin, M., and Holt, R.A. (2013). Sequence analysis of T-cell repertoires in health and disease. *Genome Med.* **5**, 98.
- Wu, C., Yosef, N., Thalhamer, T., Zhu, C., Xiao, S., Kishi, Y., Regev, A., and Kuchroo, V.K. (2013). Induction of pathogenic TH17 cells by inducible salt-sensing kinase SGK1. *Nature* **496**, 513–517.
- Wucherpfennig, K.W., and Sethi, D. (2011). T cell receptor recognition of self and foreign antigens in the induction of autoimmunity. *Semin. Immunol.* **23**, 84–91.
- Wucherpfennig, K.W., and Strominger, J.L. (1995). Molecular mimicry in T cell-mediated autoimmunity: viral peptides activate human T cell clones specific for myelin basic protein. *Cell* **80**, 695–705.
- Wucherpfennig, K.W., Ota, K., Endo, N., Seidman, J.G., Rosenzweig, A., Weiner, H.L., and Hafler, D.A. (1990). Shared human T cell receptor V beta usage to immunodominant regions of myelin basic protein. *Science* **248**, 1016–1019.
- Wucherpfennig, K.W., Newcombe, J., Li, H., Keddy, C., Cuzner, M.L., and Hafler, D.A. (1992). T cell receptor V alpha-V beta repertoire and cytokine gene expression in active multiple sclerosis lesions. *J. Exp. Med.* **175**, 993–1002.
- Wucherpfennig, K.W., Allen, P.M., Celada, F., Cohen, I.R., De Boer, R., Garcia, K.C., Goldstein, B., Greenspan, R., Hafler, D., Hodgkin, P., et al. (2007). Polyspecificity of T cell and B cell receptor recognition. *Semin. Immunol.* **19**, 216–224.
- Yamaguchi, H., and Hashimoto, K. (2002). Association of MR1 protein, an MHC class I-related molecule, with beta(2)-microglobulin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **290**, 722–729.
- Yamaguchi, H., Hirai, M., Kurosawa, Y., and Hashimoto, K. (1997). A highly conserved major histocompatibility complex class I-related gene in mammals. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **238**, 697–702.

- Yamaguchi, H., Tsukamoto, K., and Hashimoto, K. (2014). Cell surface expression of MR1B, a splice variant of the MHC class I-related molecule MR1, revealed with antibodies. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *443*, 422–427.
- Yates, A.J. (2014). Theories and quantification of thymic selection. *Front. Immunol.* *5*, 13.
- Yin, Y., Li, Y., and Mariuzza, R.A. (2012). Structural basis for self-recognition by autoimmune T-cell receptors. *Immunol. Rev.* *250*, 32–48.
- Yokote, H., Miyake, S., Croxford, J.L., Oki, S., Mizusawa, H., and Yamamura, T. (2008). NKT Cell-Dependent Amelioration of a Mouse Model of Multiple Sclerosis by Altering Gut Flora. *Am. J. Pathol.* *173*, 1714–1723.
- Young, M.H., U'ren, L., Huang, S., Mallevaey, T., Scott-Browne, J., Crawford, F., Lantz, O., Hansen, T.H., Kappler, J., Marrack, P., et al. (2013). MAIT Cell Recognition of MR1 on Bacterially Infected and Uninfected Cells. *PloS One* *8*, e53789.
- Yu, M., Johnson, J.M., and Tuohy, V.K. (1996). A predictable sequential determinant spreading cascade invariably accompanies progression of experimental autoimmune encephalomyelitis: a basis for peptide-specific therapy after onset of clinical disease. *J. Exp. Med.* *183*, 1777–1788.
- Zal, T., Weiss, S., Mellor, A., and Stockinger, B. (1996). Expression of a second receptor rescues self-specific T cells from thymic deletion and allows activation of autoreactive effector function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *93*, 9102–9107.
- Zang, Y.C.Q., Li, S., Rivera, V.M., Hong, J., Robinson, R.R., Breitbach, W.T., Killian, J., and Zhang, J.Z. (2004). Increased CD8+ cytotoxic T cell responses to myelin basic protein in multiple sclerosis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *172*, 5120–5127.
- Zhang, J., Vandevyver, C., Stinissen, P., Mertens, N., van den Berg-Loonen, E., and Raus, J. (1995). Activation and clonal expansion of human myelin basic protein-reactive T cells by bacterial superantigens. *J. Autoimmun.* *8*, 615–632.
- Zhang, X., Koldzic, D.N., Izikson, L., Reddy, J., Nazareno, R.F., Sakaguchi, S., Kuchroo, V.K., and Weiner, H.L. (2004). IL-10 is involved in the suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by CD25+CD4+ regulatory T cells. *Int. Immunol.* *16*, 249–256.
- Zhang, X., Tang, Y., Sujkowska, D., Wang, J., Ramgolam, V., Sospedra, M., Adams, J., Martin, R., Pinilla, C., and Markovic-Plese, S. (2008). Degenerate TCR recognition and dual DR2 restriction of autoreactive T cells: implications for the initiation of the autoimmune response in multiple sclerosis. *Eur. J. Immunol.* *38*, 1297–1309.
- Zhou, D., Srivastava, R., Nessler, S., Grummel, V., Sommer, N., Brück, W., Hartung, H.-P., Stadelmann, C., and Hemmer, B. (2006). Identification of a pathogenic antibody response to native myelin oligodendrocyte glycoprotein in multiple sclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 19057–19062.



Disponible en ligne sur

SciVerse ScienceDirect

www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France

EM|consulte

www.em-consulte.com



Mise au point

Immunité adaptative et physiopathologie de la sclérose en plaques

*Adaptive immunity and pathophysiology of multiple sclerosis*M. Salou^a, A. Elong Ngono^a, A. Garcia^a, L. Michel^{a,b,1}, D.-A. Laplaud^{a,b,*,1}^a Inserm UMR1064, 44093 Nantes cedex, France^b Service de neurologie, CHU de Nantes, 44093 Nantes, France

I N F O A R T I C L E

Historique de l'article :
Disponible sur Internet le 24 avril 2013

Mots clés :
Sclérose en plaques
Lymphocytes T
Lymphocytes B
Lymphocytes régulateurs

Keywords:
Multiple sclerosis
T lymphocytes
B lymphocytes
Regulatory lymphocytes

R É S U M É

La sclérose en plaques (SEP) est une maladie inflammatoire et démyélinisante du système nerveux central (SNC). L'apparition de plaques démyélinisées dans le SNC est associée à un infiltrat inflammatoire principalement composé de macrophages et de lymphocytes T (LT). Dans cette revue, nous nous intéressons aux arguments anatomopathologiques, génétiques et immunologiques impliquant les différentes sous-populations de la réponse immunitaire adaptative dans le développement de la maladie, chez l'homme comme dans le modèle animal de la maladie. Ainsi, nous détaillons plus précisément l'implication des lymphocytes effecteurs que sont les LT CD4⁺ et CD8⁺ et les lymphocytes B (LB), mais aussi celle des lymphocytes régulateurs dans le cadre de la physiopathologie de la SEP. Les grandes hypothèses mécanistiques proposant une explication à la physiopathologie de la maladie sont aussi présentées.

© 2013 Publié par Elsevier Masson SAS pour la Société nationale française de médecine interne (SNFMI).

A B S T R A C T

Multiple sclerosis (MS) is an inflammatory demyelinating disease of the central nervous system (CNS). The appearance of demyelinating patches in the CNS of patients with MS is associated with an inflammatory infiltrate mainly composed of macrophages and T lymphocytes. In this review, we focus on the evidence linking the development of the disease and the cell populations of the adaptive immune system. This evidence arises from anatomopathological, genetical and immunological studies, both on human and the animal model of the disease. Hence, we detail the implication of the effector lymphocytes, i.e. CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes, but also B lymphocytes, in the disease. The implication of the regulatory T and B lymphocytes is also approached. Finally, the main hypotheses proposing an explanation to the development of MS are presented.

© 2013 Published by Elsevier Masson SAS on behalf of the Société nationale française de médecine interne (SNFMI).

1. Introduction

Bien que la sclérose en plaques (SEP) ait été décrite pour la première fois au XIX^e siècle, la physiopathologie de cette maladie reste encore obscure. Il s'agit d'une maladie chronique inflammatoire démyélinisante du système nerveux central (SNC) entraînant un handicap parfois sévère. Elle touche une personne sur 1000 en France, et affecte principalement les femmes entre 20 et 40 ans avec un sex-ratio de 2,6/1 en France [1]. Les symptômes de la maladie

sont très variables, et se traduisent généralement par des atteintes motrices, sensorielles, visuelles ou même cognitives [2].

Il existe plusieurs formes évolutives de la maladie. Ainsi, 85 % des patients présentent tout d'abord une forme rémittente, caractérisée par des poussées correspondant à l'apparition d'un handicap d'intensité et de durée variable, suivies de périodes de rémissions. Après en moyenne 15 années, cette forme rémittente évolue en une forme secondairement progressive, au cours de laquelle le handicap s'accumule progressivement et les poussées s'espacent. Pour environ 15 % des patients, la maladie est primitivement progressive, avec un handicap présent dès le début de la maladie et qui s'accumule ensuite progressivement en l'absence de phénomènes inflammatoires surajoutés [2,3].

Sur le plan physiopathologique, la maladie se caractérise par l'apparition de plaques de démyélinisation au sein de la substance

* Auteur correspondant. Inserm U1064, 30, boulevard J.-Monnet, 44093 Nantes cedex, France.

Adresse e-mail : david.laplaud@univ-nantes.fr (D.-A. Laplaud).

¹ Ces auteurs ont contribué de façon équivalente à la rédaction du manuscrit.

blanche, responsables d'une altération de la conduction nerveuse. Une dégénérescence axonale peut aussi survenir de manière secondaire. Ces plaques sont caractérisées par la présence d'un infiltrat de cellules immunitaires essentiellement composé de macrophages et dans une moindre mesure de lymphocytes T (LT) [2,4,5].

À ce jour, l'étiologie de la maladie reste indéterminée, mais la SEP est considérée comme une maladie multifactorielle, résultant de la conjonction de facteurs génétiques et environnementaux. En effet, la distribution de la maladie est très hétérogène dans le monde, mais aussi au sein d'un même pays [1,2]. Le rôle de l'environnement a été proposé suite à des études de migration des populations et à l'apparition d'épidémies de SEP dans certaines régions du monde. Différents facteurs ont été impliqués, dont les agents infectieux (notamment le virus d'Epstein-Barr [EBV]), la faible exposition au soleil et la carence en vitamine D, ou encore la consommation de tabac [6–8]. Une susceptibilité génétique à cette maladie a été démontrée suite à des études épidémiologiques sur des familles dont plusieurs membres étaient atteints. Ainsi, le risque de développer la maladie lorsque le jumeau monozygote l'a déjà contractée est d'environ 30%, mais diminue à 7% pour des jumeaux dizygotes, et à moins de 5% pour des frères et sœurs [2]. Depuis, de nombreuses études d'associations pangénomiques ont permis de mettre en évidence différents gènes de susceptibilité, la plupart étant des gènes associés à la réponse immunitaire, le plus significatif étant le *CMH-II* [9].

Sur un plan mécanistique, la SEP est considérée comme une maladie auto-immune. Les premiers arguments impliquant le système immunitaire dans le développement de la SEP proviennent des modèles animaux d'encéphalite auto-immune expérimentale (EAE). En effet, l'injection d'extraits de cerveaux de lapin chez le singe est suivie, chez certains sujets, par une infiltration de cellules immunitaires et par une démyélinisation périvasculaire dans le SNC ressemblant à ce qui est observé dans la maladie humaine [5,10]. L'EAE a ensuite été étudiée de façon systématique chez les rongeurs mais aussi chez d'autres animaux, et peut être induite activement, par injection d'épitopes de la myéline ou passivement, par injection de LT réactifs contre ces mêmes épitopes [11]. Ces modèles animaux, quoique imparfaits, nous ont permis d'avancer dans la compréhension de la physiopathologie de cette maladie. D'autres arguments forts étayant le rôle de l'auto-immunité dans le développement de la SEP proviennent des études neuropathologiques, génétiques et immunologiques, mais aussi de l'utilisation de molécules immunomodulatrices comme traitement de la maladie, et seront détaillés plus tard dans cette revue. Nous nous intéresserons ici exclusivement au rôle de l'immunité adaptative dans la maladie.

2. Lymphocytes T, des acteurs majeurs de la maladie

L'implication des LT dans la SEP est depuis longtemps suggérée par les données scientifiques obtenues aussi bien chez l'homme que dans le modèle animal de la maladie. En effet, ces cellules sont présentes au sein des lésions de SEP avec une répartition oligoclonale évoquant une sélection antigène-dépendante [12–14].

Un autre argument est la présence de LT réactifs contre des épitopes de la myéline dans le sang de patients. Néanmoins, cette autoréactivité périphérique est aussi décrite chez des témoins sains et n'induit pas de pathologie particulière. La question de la fréquence de ces LT autoréactifs circulants a été soulevée mais reste l'objet de débats à ce jour. Ainsi, certaines études ont montré une augmentation de la fréquence des LT autoréactifs contre des antigènes dérivés de la myéline dans le sang de patients par rapport à celui des témoins sains, mais d'autres n'ont pas mis en évidence de différence [15]. Certains auteurs proposent que les différences entre les patients et les témoins soient qualitatives plutôt que quantitatives [15].

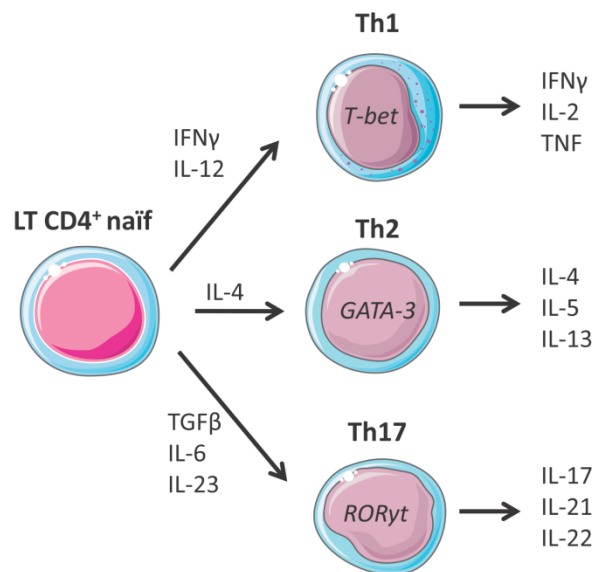


Fig. 1. Différenciation des LT CD4⁺ naïfs en lymphocytes T (LT) helper. Les LT CD4⁺ naïfs se différencient en différentes sous-populations helper sous l'action de cytokines et de facteurs de transcription particuliers. Ils sécrètent ensuite des cytokines effectrices propres à chaque sous-population. Dans la sclérose en plaques, les LT CD4⁺ Th1 et Th17 sont les acteurs les plus décrits. Les facteurs de transcription sont en italique.

2.1. Implication des LT CD4⁺ helper Th1 et Th17

La SEP est classiquement considérée comme une maladie médiée principalement par les LT CD4⁺, notamment grâce aux études sur l'EAE [5]. La découverte de gènes de susceptibilité pour la SEP a aussi conforté le rôle de ces cellules. En effet, certains variants du CMH-II ont été fortement associés à la maladie, en particulier HLA-DRB1*1501 [5,9]. Cela a part la suite pu être confirmé dans des modèles in vivo d'EAE, car des souris humanisées exprimant ce variant ainsi qu'un *T-cell receptor* (TCR) spécifique d'un épitope de la *myelin basic protein* (MBP) développent spontanément une EAE [5].

Une sous-population particulière de LT CD4⁺, les Th1, a été la première impliquée dans la physiopathologie de la maladie. La Fig. 1 présente les caractéristiques de différenciation de ces cellules. Dans l'EAE, l'immunisation active par des épitopes de la myéline entraîne la mise en place d'une réponse immune médiée par les LT CD4⁺ Th1, comme en témoigne notamment la présence d'interféron-γ (IFNγ) dans les lésions [16]. De plus, le transfert adoptif de LT CD4⁺ Th1 spécifiques de la myéline induit une EAE chez des animaux non immunisés [5,11,16] alors que les souris déficientes en facteur de transcription Tbet sont résistantes [17].

Chez l'homme, il a été montré que l'augmentation de l'activité de la maladie était corrélée à une augmentation d'expression d'IFNγ et d'interleukine 12 (IL-12) dans le SNC et le liquide céphalorachidien (LCR) de patients [16–19]. De plus, l'administration d'IFNγ exacerbe la maladie [17,18,20]. Cette cytokine est probablement directement impliquée dans la pathologie en induisant l'apoptose des oligodendrocytes humains [19].

Dans les années 1990, certaines observations ont suggéré que les LT Th1 n'étaient peut-être pas la seule sous-population de LT CD4⁺ impliquée dans la maladie. En effet, les souris déficientes en IFNγ [16,17,19], traitées avec un anticorps anti-IFNγ [19] ou déficientes en sous-unité p35 de l'IL-12 [16,17,19] n'étaient pas résistantes mais plutôt hypersusceptibles à l'induction de l'EAE. En revanche, les souris déficientes en sous-unité p40, appartenant à la fois à

l'IL-12 et à l'IL-23, étaient effectivement résistantes au développement de la maladie, de même que les souris déficientes en IL-23 ou traitées avec un anti-IL-23 [21–23]. Ces données suggèrent l'implication d'une autre sous-population de LT, les Th17 (caractéristiques de différenciation sur la Fig. 1) [24]. Ainsi en 2005, une étude a montré que des LT Th17 spécifiques de la PLP induisaient l'EAE [16,18,25]. De plus, les Th17 sont présents dans le SNC d'EAE en phase aiguë [26].

Chez l'homme, le nombre de cellules exprimant l'ARN messager de l'IL-17 est augmenté dans le sang des patients par rapport aux témoins. Il existe aussi une corrélation positive entre le nombre de ces cellules et l'activité clinique de la maladie [19,26,27]. La fréquence des Th17 dans le LCR des patients est plus importante en poussée qu'en rémission [19,26]. Au niveau anatomopathologique, la quantité de LT producteurs d'IL-17 est augmentée dans le cerveau des patients par rapport aux témoins, et plus particulièrement dans les lésions actives ou en bordure des lésions chroniques actives (80 % des LT produisent de IL-17, contre 20 % dans les lésions inactives) [28,29]. On retrouve aussi de l'IL-23 au niveau des lésions actives et chroniques actives [30].

Un autre argument pour l'implication des Th17 vient des traitements utilisés couramment dans la SEP. Ainsi, le fingolimod entraînerait une baisse des Th17 circulants et l'IFN β augmenterait l'apoptose des Th17 [23]. Cependant, un essai clinique ciblant notamment les Th17 par l'utilisation d'un anticorps anti-sous-unité p40 de l'IL-12/23 n'a pas donné de résultats probants [19,23]. Des essais ciblant plus précisément la voie Th17 sont actuellement en cours dans la SEP.

À l'heure actuelle, il est encore difficile d'attribuer un rôle précis à chacune des sous-populations Th1 et Th17 [16,18]. On sait ainsi que les Th17 ne semblent pas nécessaires pour déclencher la maladie. En effet, une EAE modérée se développe chez des souris déficientes en IL-17 [16,18,23]. De plus, le transfert de Th17 induit l'EAE seulement en présence de cellules productrices d'IFN γ [31]. Malgré ces données contradictoires, il est tout de même généralement accepté que les Th17 jouent un rôle important dans la maladie. Il ne faut cependant pas oublier que ces cellules ne sont pas définies par la sécrétion d'une seule cytokine, et parmi les cytokines produites par les Th17, l'IL-23 notamment semble avoir un rôle central [17,23,26].

Il faut aussi noter l'existence de LT sécrétant à la fois de l'IL-17 et de l'IFN γ . Ces cellules représentent-elles une vraie sous-population ou une population transitoire entre les Th1 et les Th17 [16,26] ? Certains proposent que les Th17 peuvent acquérir un phénotype mixte en fonction du microenvironnement cytokinique et inflammatoire, comme c'est le cas pour l'EAE [17,19,23]. Une équipe a montré récemment que des LT spécifiques de la myéline dérivés in vitro grâce à de l'IL-23 produisaient à la fois de l'IL-17 et de l'IFN γ et que leur transfert pouvait induire l'EAE, mais selon un mécanisme dépendant seulement de l'IFN γ [32].

La complexité des interactions entre LT Th1 et Th17, ainsi que leur implication respective dans la physiopathologie de la maladie reste encore peu claire et nécessite de poursuivre les investigations. Néanmoins, les traitements déplétant les LT CD4 $^{+}$ n'ont pas amélioré la maladie, suggérant l'implication d'autres populations cellulaires dans le développement de la SEP [33].

2.2. Implication des LT CD8 $^{+}$

Les LT CD8 $^{+}$, par leurs effets cytotoxiques, semblent mieux armés que les LT CD4 $^{+}$ pour induire directement des lésions au sein du SNC [5]. Plusieurs arguments plaident en faveur de l'implication de ces cellules dans la physiopathologie de la maladie. Ainsi, ces dix dernières années, des modèles EAE par transfert de CD8 $^{+}$ spécifiques de la MBP ou de la *myelin oligodendrocyte glycoprotein* (MOG) ont été développés. La majorité des modèles CD8 $^{+}$ restent

cependant des modèles de transferts de LT portant des TCR spécifiques d'épitopes exprimés de façon transgénique sur les oligodendrocytes [11].

Chez l'homme, les LT CD8 $^{+}$ sont retrouvés au sein des lésions de SEP en plus grande proportion que les CD4 $^{+}$ [12,16,33]. Ces LT CD8 $^{+}$ infiltrants ont une répartition oligoclonale, et les mêmes clones peuvent être retrouvés dans différents endroits du cerveau [12–14]. Il est intéressant de noter que certains de ces clones portent des mutations silencieuses [13]. Toutes ces informations évoquent une sélection dépendante de l'antigène (Ag) et suggèrent fortement que ces clones CD8 $^{+}$ sont impliqués dans la maladie. Des CD8 $^{+}$ oligoclonaux sont aussi retrouvés dans le LCR de patients SEP [5,34]. Au tout début de la maladie, le LCR est enrichi en cellules hautement différenciées qui sont CD8 $^{+}$ et non CD4 $^{+}$, suggérant là aussi un rôle dans le développement de la maladie [35]. Enfin, il semble que l'activité cytotoxique des LT CD8 $^{+}$ contre la MBP soit augmentée chez les patients SEP [5].

Les dernières études pangénomiques ont permis de montrer que certains variants du CMH-I conféraient un effet protecteur indépendant [9]. Au sein du SNC, les astrocytes et les oligodendrocytes expriment le CMH-I, ainsi que les neurones, au moins en conditions d'inflammation, ce qui en fait des cibles potentielles pour la lyse par les LT CD8 $^{+}$ [5,36]. Il a ainsi été montré in vitro que la transection axonale pouvait être réalisée par les CD8 $^{+}$ cytotoxiques [37,38]. De plus, certains auteurs ont trouvé une corrélation entre le nombre de CD8 $^{+}$ présents dans les lésions et les atteintes axonales [33,36].

De la même façon que pour les CD4 $^{+}$, des CD8 $^{+}$ produisant de l'IL-17 ont été décrites. Il faut ainsi préciser que les cellules produisant de l'IL-17 au sein du SNC sont autant CD4 $^{+}$ que CD8 $^{+}$, et qu'on en retrouve dans les lésions actives mais pas dans les lésions inactives [16,28,33]. Une équipe a observé que le sang des patients atteints de SEP présentait un enrichissement en CD8 $^{+}$ CD161 hi , et que toutes les CD8 $^{+}$ productrices d'IL-17 étaient comprises dans cette population [39]. De plus, ces cellules expriment CCR6, qui est impliqué dans le passage de la barrière hématoencéphalique (BHE) par les Th17 [39,40]. Des données récentes ont montré que 80 % de ces cellules CD8 $^{+}$ CD161 hi étaient en fait des cellules *mucosal-associated invariant T* (MAIT), LT particuliers portant un TCR semi-invariant reconnaissant des métabolites bactériens [41] et récemment décrits dans la SEP.

3. Lymphocytes B et anticorps : des acteurs émergents

Bien que longtemps sous-estimé, le rôle des lymphocytes B (LB) et des anticorps dans la physiopathologie de la SEP est de plus en plus reconnu. L'un des premiers arguments est la présence de bandes oligoclonales d'immunoglobulines (Ig) dans le LCR de plus de 95 % des patients [5,42,43]. De plus, les LB et les anticorps sont présents dans les lésions actives et aux marges des chroniques actives, mais très peu dans les inactives [44]. Certains auteurs ont aussi montré la présence de follicules ectopiques B dans les méninges de 41 % des patients atteints de SEP de forme secondairement progressive [42,45]. La présence de ces follicules semble être corrélée avec des dommages tissulaires plus sévères du SNC [43,45]. De plus, certains clones lymphocytaires B sont retrouvés dans le SNC, le LCR et les follicules, suggérant leur importance dans la maladie [42,44,46]. Une étude a montré que ces follicules étaient, tout comme les lésions actives, des sites de réactivation du virus de l'EBV, suggérant donc leur implication dans la physiopathologie de la maladie [47]. Ces résultats n'ont cependant pas pu être répliqués, sauf dans une étude récente qui a retrouvé des marqueurs d'EBV latent dans les lésions actives de SEP [48]. Enfin, le traitement par rituximab (anticorps monoclonal anti-CD20), qui déplete les LB, permet de réduire les lésions inflammatoires décelées par l'IRM ainsi que les poussées chez les patients atteints de SEP de

forme rémittente [42,49]. Il faut aussi noter que bien que le transfert d'anticorps reconnaissant des épitopes de la myéline n'induit pas l'EAE [5], il pourrait aggraver la démyélinisation [42,50] suggérant ainsi que les lésions observées ne peuvent être dues au seul potentiel pathogénique de ces anticorps.

En dehors de la production d'anticorps via leur différenciation en plasmocytes, les LB remplissent en effet des fonctions qui entrent certainement en jeu dans la physiopathologie de la SEP. Ils peuvent par exemple présenter des antigènes aux LT. Ainsi, une étude récente a montré que les LB mémoires de patients pouvaient entraîner une prolifération et une production d'IFN γ par les LT CD4⁺ en réponse à une stimulation par des antigènes de la myéline [51]. Ils peuvent aussi produire cytokines et chémokines, modulant ainsi la réponse et le recrutement des LT [5,42,52]. L'effet thérapeutique du rituximab passe certainement par un effet sur ces fonctions des LB. En effet, les taux d'anticorps sont inchangés sous ce traitement [49] alors qu'une baisse de l'activité pro-inflammatoire des LT Th1 et Th17 est observée [42].

4. Lymphocytes régulateurs

La présence de LT autoréactifs chez les témoins sains suggère l'existence de mécanismes contrôlant leur possible action délétère. Ainsi, l'action de cellules suppressives, telles que les LT ou LB régulateurs, peut être centrale dans le développement ou non de la maladie.

4.1. Lymphocytes T régulateurs naturels

Les lymphocytes T régulateurs (Treg) naturels (nTregs) sont des LT CD4⁺ issus du thymus, et caractérisés par l'expression du marqueur extracellulaire CD25 et du facteur de transcription FoxP3 [18]. D'autres sous-populations de LT régulateurs existent, mais nous ne parlerons ici que des nTregs.

Dans le modèle EAE, les études de transfert adoptif et de déplétion des nTregs ont montré que ces cellules pouvaient contrôler le développement et la sévérité de l'EAE [53–55]. De plus, il a été montré *in vivo* et *in vitro* que l'action suppressive des Tregs était en partie médiée par l'IL-10 [53].

Il est beaucoup plus difficile d'étudier les nTregs chez l'homme, en particulier à cause du manque de marqueurs permettant d'isoler facilement ces cellules. En effet, de nombreuses études se sont intéressées aux LT CD4⁺CD25^{hi}, mais ces cellules comprennent différentes sous-populations. De plus, FoxP3 étant un facteur de transcription, il est impossible d'isoler les cellules FoxP3⁺ vivantes. Les études sur les CD4⁺CD25^{hi} dans le sang ont montré qu'il n'y avait pas de différence de fréquence entre le sang des patients et celui des témoins [55,56]. Plusieurs études ont en revanche proposé un défaut fonctionnel des nTregs chez les patients atteints de SEP [55–57]. Cependant, notre équipe a montré que lorsque l'on utilisait aussi le marqueur CD127, qui permet de supprimer les T effecteurs encore présents dans la population CD4⁺CD25^{hi}, le défaut de suppression n'était plus visible [58]. Le défaut fonctionnel des nTregs dans la SEP reste donc aujourd'hui controversé, principalement à cause des différentes sous-populations considérées et des différents protocoles de stimulation utilisés [56].

Les nTregs sont retrouvés dans le LCR de patients atteints de SEP [18,56,59]. En revanche, dans les lésions, on n'en retrouve que très peu, voire pas du tout [28,59]. La raison de cette absence de nTregs au sein du tissu inflammatoire reste mal comprise à ce jour. Certains auteurs ont pu montrer que les nTregs présentaient, dans le LCR, un phénotype les rendant très susceptibles à l'apoptose et proposent donc qu'ils seraient éliminés dans le SNC [59].

4.2. Lymphocytes B régulateurs

Les LB régulateurs (Bregs) constituent une population décrite récemment et dont l'action est médiée par la production d'IL-10. Depuis la découverte que les souris EAE déficientes en LB n'entraient pas en rémission [60], différentes études ont impliqué les Bregs dans l'EAE par des mécanismes dépendants de l'IL-10 [61,62]. En effet, les souris déficientes pour l'IL-10 seulement dans le compartiment des LB ont une maladie aggravée. Le transfert adoptif de LB IL-10^{+/+} restaure la rémission, ce qui n'est pas le cas après transfert de LB IL-10^{-/-} [62–64]. D'autres études ont depuis confirmé ces résultats. Il semble de plus que le rôle des LB dans l'EAE dépend du moment de la maladie. Ainsi, lorsque l'on déplète les LB sept jours avant l'induction, l'EAE est plus sévère, alors qu'elle est diminuée si la déplétion intervient au cours de l'EAE [54].

Très peu d'études se sont intéressées à l'implication des Bregs dans la SEP. Cette sous-population cellulaire reste à ce jour encore mal caractérisée sur le plan phénotypique. Les résultats concernant la fréquence des LB producteurs d'IL-10 chez les patients sont contradictoires, nécessitant la réalisation d'autres études [65–67].

5. Mais des zones d'ombre persistent. . .

Bien que la littérature soit abondante concernant l'implication de l'immunité adaptative dans la SEP, quelques grandes questions restent encore en suspens (Fig. 2). Répondre à ces questions permettra de faire de grandes avancées dans la compréhension de la physiopathologie de la maladie.

5.1. Quels sont les autoantigènes impliqués ?

De nombreux antigènes candidats reconnus par les LT autoréactifs ont été proposés. Ce sont principalement des épitopes de protéines de la myéline, mais aussi d'autres antigènes non myéliniques, comme l' α - β cristalline ou une transaldolase exprimée notamment par les oligodendrocytes [5,3]. Les auteurs semblent s'accorder sur le fait qu'il n'y aurait pas un seul mais plusieurs antigènes impliqués dans la maladie, et qui pourraient varier d'un individu à l'autre et au cours du temps. Même si le déclenchement initial se fait grâce à un épitope particulier, les phénomènes de glissement d'épitope (reconnaissance d'autres antigènes de la même protéine ou d'une protéine différente suite à un relargage anormal dans un contexte d'inflammation) et d'activation *bystander* (activation non spécifique dans un contexte d'inflammation) peuvent expliquer que l'on retrouve des LT autoréactifs contre plusieurs protéines différentes [6,3].

La spécificité des anticorps retrouvés dans les lésions et le LCR de patients atteints de SEP reste elle aussi incertaine [42,43]. Certains anticorps ont été décrits comme reconnaissant des protéines de la myéline, d'autres des protéines astrocytaires ou neuronales [42]. Récemment, une étude a montré que KIR4.1, un canal potassique exprimé sur les cellules gliales, était la cible d'autoanticorps sériques trouvés chez la moitié des patients étudiés [68].

5.2. Comment et pourquoi les lymphocytes T autoréactifs en périphérie s'activent-ils et deviennent-ils pathogènes ?

Différentes hypothèses ont été proposées au cours des dernières années (Fig. 3). L'une d'elles est celle du mimétisme moléculaire, à savoir l'existence de « cross-réactivité » entre l'antigène d'un agent infectieux et un peptide de la myéline. Ainsi, les LT reconnaissant ces deux antigènes pourraient être activés en périphérie lors d'une infection, ce qui les rendrait capables de traverser la BHE et d'entraîner une inflammation au sein du SNC [69]. L'agent infectieux le plus cité dans le cadre de la SEP est l'EBV. En effet, de

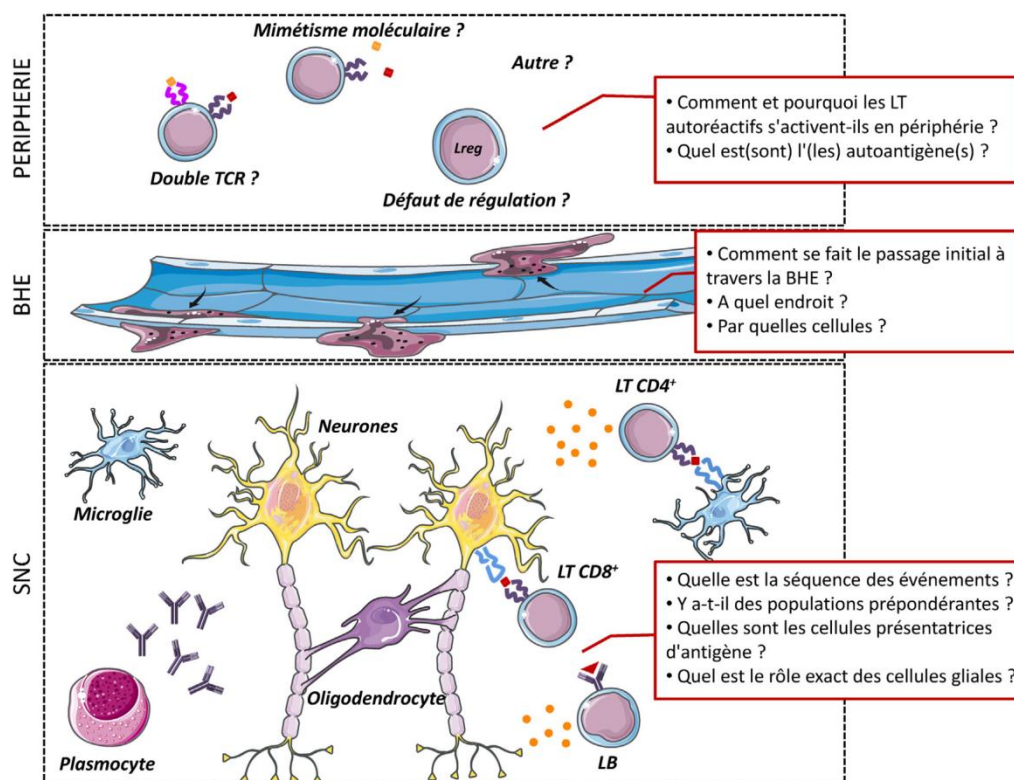


Fig. 2. Physiopathologie de la maladie et zones d'ombre. Au sein du système nerveux central, les acteurs de l'immunité entraînent une démyélinisation ainsi qu'une dégénérescence axonale lorsque la maladie se chronicise. Bien que les mécanismes ne soient pas encore complètement décrits, les études mettent en jeu différentes sous-populations cellulaires telles que les lymphocytes T (LT), les lymphocytes B (LB) et la microglie. Ces cellules exerceraient leur pouvoir pathogénique via la production de cytokines ou de molécules cytotoxiques. Elles créent ainsi un environnement inflammatoire entretenant la réponse immunitaire et la démyélinisation au sein du système nerveux central (SNC). Le SNC étant un endroit immunoprivilégié, la question de savoir comment et pourquoi les premières cellules traversent la barrière hématoencéphalique (BHE) est cruciale pour la compréhension de la maladie. De même, la question de l'activation périphérique de cellules potentiellement autoréactives reste actuellement en suspens.

nombreux arguments, venant d'études épidémiologiques et immunologiques, relient l'infection à l'EBV au déclenchement ou au développement de la maladie [70].

Une autre hypothèse pour l'activation des LT autoréactifs en périphérie est celle des doubles TCR. En effet, il a été montré récemment, dans une étude sur l'EAE, qu'une infection virale pouvait activer des LT portant deux TCR, l'un reconnaissant un épitope viral, et l'autre spécifique de la MBP, déclenchant ainsi l'auto-immunité [71]. Cependant, ces deux mécanismes peuvent intervenir chez les patients comme chez les témoins, et à l'heure actuelle, on ne sait pas pourquoi ces LT sont pathogènes seulement chez les patients. Une hypothèse explicative serait alors un défaut de régulation périphérique.

5.3. Comment les cellules immunitaires migrent-elles à travers la barrière hématoencéphalique ? Quelles sont les cellules qui migrent en premier ?

La question de la migration des cellules à travers la BHE est cruciale dans la compréhension de la maladie. En effet, le SNC est un endroit immunoprivilégié, et bien qu'au cours de la maladie la barrière soit perméabilisée, ce n'est pas le cas au tout début. Il est donc important de comprendre les mécanismes initiaux de migration à travers la BHE. Les lymphocytes doivent être activés pour pouvoir traverser la BHE. Différents mécanismes d'activation ont été proposés ci-dessus. Il a été proposé que les Th1 ont d'abord accès au SNC non inflammatoire et induisent le recrutement des

Th17 [16,18,31]. Mais cela ne fait pas consensus. Dans un modèle de BHE in vitro, il a été montré que les Th17 humaines migraient mieux que les Th1 [72]. De plus, la BHE semble plus perméable à la migration de LT CD4⁺ en réponse à IL-17 et à l'IL-22, notamment par une déstabilisation des jonctions serrées entre les cellules endothéliales [19,23,72]. Il faut aussi noter que les souris déficientes en CCR6, marqueur de homing des Th17, sont résistantes à l'EAE, malgré une restauration de la susceptibilité après transfert adoptif de cellules WT [18,40]. L'IL-17 entraîne aussi une augmentation de l'expression de CCL20, ligand de CCR6, sur les astrocytes, permettant ainsi le passage des Th17 CCR6⁺ à travers la BHE [17]. Enfin, les Th17 permettent le recrutement de neutrophiles qui sécrètent des molécules impliquées dans la perméabilisation de la BHE [17].

6. Hypothèses mécanistiques

Les nombreuses données concernant l'implication des différents acteurs de l'immunité dans la physiopathologie de la SEP ont permis de mettre en place différentes hypothèses mécanistiques pour expliquer le déclenchement de la maladie. Ces différentes hypothèses ont l'avantage d'essayer de relier les données neuropathologiques, génétiques, épidémiologiques et immunologiques collectées chez l'homme et chez l'animal. La Fig. 4 représente ces quatre hypothèses majeures.

La théorie qui a dominé la connaissance sur la SEP durant les dernières décennies est celle impliquant des LT Th1 autoréactifs [5]. Les

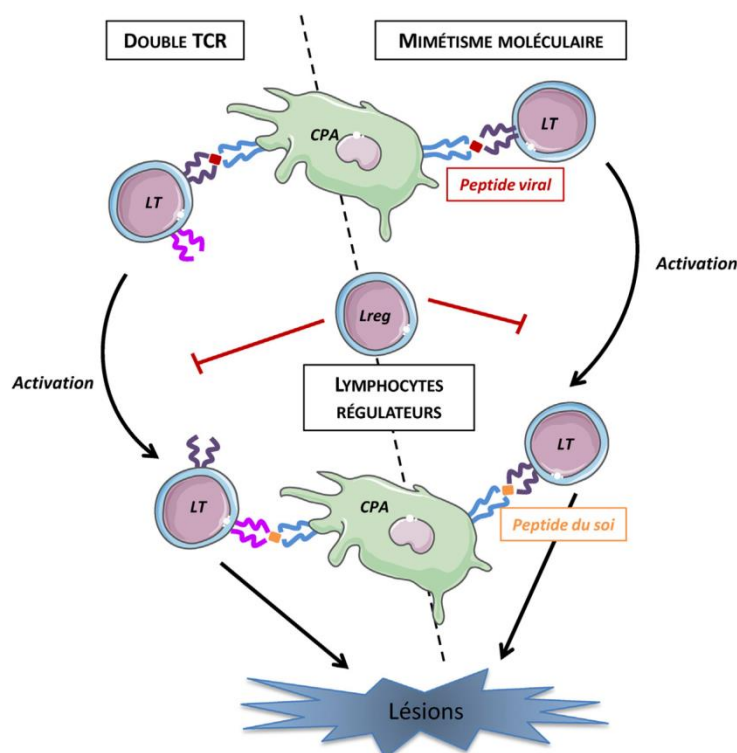


Fig. 3. Mécanismes possibles d'activation périphérique de cellules potentiellement autoréactives. Différents mécanismes ont été proposés pour l'activation de lymphocytes T (LT) autoréactifs en périphérie. La première est celle du double T-cell receptor (TCR), c'est-à-dire que certains LT pourraient porter deux TCR, l'un reconnaissant un peptide viral, et l'autre un épitope de la myéline. La deuxième est celle du mimétisme moléculaire, à savoir que le TCR porté par la cellule pourrait reconnaître deux épitopes proches. Enfin, il a aussi été proposé un défaut de régulation des cellules potentiellement autoréactives.

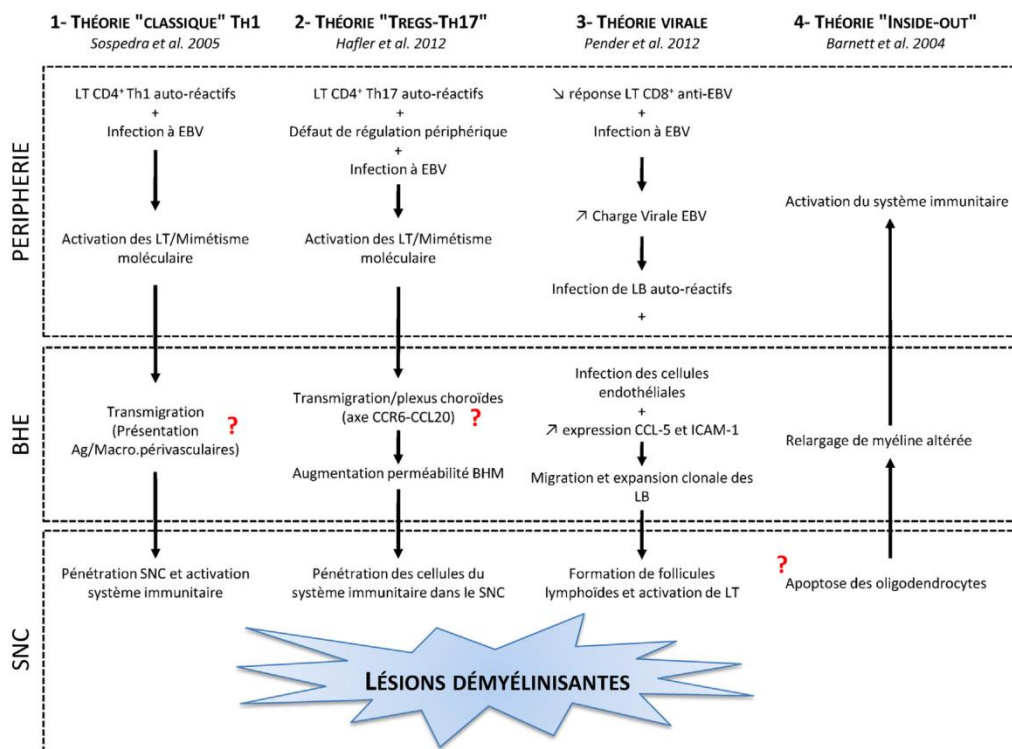


Fig. 4. Hypothèses mécanistiques majeures du développement de la sclérose en plaques.

LT Th1 autoréactifs seraient activés en périphérie par mimétisme moléculaire suite à la présentation d'épitopes de l'EBV proches de ceux de la myéline. Cette activation leur permettrait ensuite de migrer à travers la BHE, par des mécanismes de migration spécifique encore mal décrits, et de rejoindre le SNC au sein duquel ils exerceraient une action délétère notamment par création d'un environnement inflammatoire et recrutement d'autres cellules du système immunitaire.

La deuxième hypothèse se base sur un défaut de régulation existant chez les patients SEP. Ainsi, certains auteurs proposent que l'activation en périphérie des LT par mimétisme moléculaire avec l'EBV n'est pas contenue par la régulation [3]. Une première vague de migration dans le SNC mettrait alors en jeu des LT Th17 qui entreraient par les plexus choroïdes de façon dépendante de CCR6, et qui, après activation des cellules endothéliales, permettraient l'entrée d'autres LT Th17 et Th1 au sein du SNC [23,40].

La troisième hypothèse proposée récemment implique les LT CD8⁺, et a l'avantage de lier la génétique, l'environnement, et le système immunitaire. Dans cette hypothèse, l'infection à EBV serait mal contrôlée par les LT CD8⁺ des patients à cause d'un déficit fonctionnel d'origine génétique. Le virus pourrait alors infecter les cellules endothéliales de la BHE, entraînant une perméabilisation de la barrière [73]. Des LB autoréactifs et infectés par l'EBV pourraient alors gagner le parenchyme cérébral et y survivre. Ils seraient alors responsables de la survie de LT autoréactifs en apportant des signaux de costimulation et présenteraient des autoantigènes à ces LT autoréactifs médiant ainsi les dommages et entretenant la réaction inflammatoire locale. Cela entraînerait aussi la génération de follicules lymphoïdes ectopiques au sein du SNC [74].

La dernière hypothèse ne fait intervenir le système immunitaire qu'en second, la physiopathologie de la maladie s'expliquant alors par une dégénérescence primaire des oligodendrocytes par des mécanismes inconnus, menant à un relargage de peptides de la myéline en périphérie puis à une activation du système immunitaire entretenant ensuite les dommages [75].

7. Conclusion

En conclusion, malgré une quantité très importante de données générées par l'étude de la maladie, aucun mécanisme clair ne se dégage pour expliquer son développement. Les études sont de plus rendues difficiles du fait qu'il s'agit d'une maladie touchant le SNC, auquel l'accès reste très restreint. Les études neuropathologiques n'apportant pas d'analyses dynamiques de la situation, elles restent d'interprétation délicate. Les études doivent donc se focaliser sur des compartiments accessibles tels que le sang ou le LCR, dont l'environnement inflammatoire est certainement très différent de celui du SNC.

Cependant, l'implication de l'immunité est claire, et met en jeu un enchevêtrement de différents sous-types cellulaires ayant eux-mêmes des effets multiples.

Déclaration d'intérêts

D.-A. Laplaud déclare avoir reçu des honoraires de la part de Biogen-Idex, Novartis et Genzyme au cours de l'année écoulée. Par ailleurs, Biogen-Idex et Novartis ont versé des fonds à destination de recherche à DAL. Les autres auteurs ne déclarent aucun conflit d'intérêt concernant cet article.

Remerciements

Les auteurs souhaitent remercier la fondation ARSEP (Fondation pour la recherche sur la sclérose en plaques) pour son soutien récurrent dans leurs travaux de recherche, ainsi que la Région Pays de Loire et l'association Antares (Association nantaise pour la recherche sur la SEP) pour leur aide financière et à la structuration de la recherche sur la SEP à Nantes.

Les illustrations présentées ici ont été réalisées grâce à Servier Medical Art (<http://www.servier.fr/servier-medical-art>).

Références

- [1] Fromont A, Binquet C, Sauleau EA, Fournel I, Bellisario A, Adnet J, et al. Geographic variations of multiple sclerosis in France. *Brain* 2010;133(Pt 7):1889–99.
- [2] Compston A, Coles A. Multiple sclerosis. *Lancet* 2008;372:1502–17.
- [3] Nylander A, Hafler DA. Multiple sclerosis. *J Clin Invest* 2012;122:1180–8.
- [4] Noseworthy JH, Lucchinetti C, Rodriguez M, Weinshenker BG. Multiple sclerosis. *N Engl J Med* 2000;343:938–52.
- [5] Sospedra M, Martin R. Immunology of multiple sclerosis. *Annu Rev Immunol* 2005;23:683–747.
- [6] Laplaud D-A, Confavreux C. [Etiology of multiple sclerosis]. *Rev Prat* 2006;56:1306–12.
- [7] Pierrot-Deseilligny C, Souberbielle JC. Is hypovitaminosis D one of the environmental risk factors for multiple sclerosis? *Brain* 2010;133(Pt 7):1869–88.
- [8] Schoindre Y, Terrier B, Kahn JE, Saadoun D, Souberbielle JC, Benveniste O, et al. Vitamine D et auto-immunité. Deuxième partie : aspects cliniques. *Rev Med Interne* 2012;33:87–93.
- [9] Gourraud PA, Harbo HF, Hauser SL, Baranzini SE. The genetics of multiple sclerosis: an up-to-date review. *Immunol Rev* 2012;248:87–103.
- [10] Rivers TM, Sprunt DH, Berry GP. Observation on attempts to produce acute disseminated encephalomyelitis in monkeys. *J Exp Med* 1933;58:39–53.
- [11] Lassmann H. Experimental models of multiple sclerosis. *Rev Neurol (Paris)* 2007;163:651–5.
- [12] Babbe H, Roers A, Waisman A, Lassmann H, Goebels N, Hohlfeld R, et al. Clonal expansions of CD8(+) T cells dominate the T cell infiltrate in active multiple sclerosis lesions as shown by micromanipulation and single cell polymerase chain reaction. *J Exp Med* 2000;192:393–404.
- [13] Junker A, Ivanidze J, Malotka J, Eiglmeier I, Lassmann H, Wekerle H, et al. Multiple sclerosis: T-cell receptor expression in distinct brain regions. *Brain* 2007;130(Pt 11):2789–99.
- [14] Montes M, Zhang X, Berthelot L, Laplaud DA, Brouard S, Jin J, et al. Oligoclonal myelin-reactive T-cell infiltrates derived from multiple sclerosis lesions are enriched in Th17 cells. *Clin Immunol* 2009;130:133–44.
- [15] Elong Ngono A, Pettré S, Salou M, Bahbouhi B, Soullou JP, Brouard S, et al. Frequency of circulating autoreactive T cells committed to myelin determinants in relapsing-remitting multiple sclerosis patients. *Clin Immunol* 2012;144:117–26.
- [16] Goverman J. Autoimmune T cell responses in the central nervous system. *Nat Rev Immunol* 2009;9:393–407.
- [17] Petermann F, Korn T. Cytokines and effector T cell subsets causing autoimmune CNS disease. *FEBS Letters* 2011;585:3747–57.
- [18] Fletcher JM, Lalor SJ, Sweeney CM, Tubridy N, Mills KHG. T cells in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *Clin Exp Immunol* 2010;162:1–11.
- [19] Lovett-Racke AE, Yang Y, Racke MK. Th1 versus Th17: are T cell cytokines relevant in multiple sclerosis? *Biochim Biophys Acta* 2011;1812:246–51.
- [20] Panitch HS, Hirsch RL, Haley AS, Johnson KP. Exacerbations of multiple sclerosis in patients treated with gamma interferon. *Lancet* 1987;1:893–5.
- [21] Cua DJ, Sherlock J, Chen Y, Murphy CA, Joyce B, Seymour B, et al. Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature* 2003;421:744–8.
- [22] Steinman L. A brief history of T(H)17, the first major revision in the T(H)1/T(H)2 hypothesis of T cell-mediated tissue damage. *Nat Med* 2007;13:139–45.
- [23] Becher B, Segal BM. T(H)17 cytokines in autoimmune neuro-inflammation. *Curr Opin Immunol* 2011;23:707–12.
- [24] Samson M, Lakomy D, Audia S, Bonnotte B. Les lymphocytes TH17 : différenciation, phénotype, fonctions, et implications en pathologie et thérapeutique humaine. *Rev Med Interne* 2011;32:292–301.
- [25] Langrish CL, Chen Y, Blumenschein WM, Mattson J, Basham B, Sedgwick JD, et al. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J Exp Med* 2005;201:233–40.
- [26] Jadidi-Niaragh F, Mirshafiey A. Th17 cell, the new player of neuroinflammatory process in multiple sclerosis. *Scand J Immunol* 2011;74:1–13.
- [27] Matusevicius D, Kivisäkk P, He B, Kostulas N, Ozenci V, Fredrikson S, et al. Interleukin-17 mRNA expression in blood and CSF mononuclear cells is augmented in multiple sclerosis. *Mult Scler* 1999;5:101–4.
- [28] Tzartos JS, Friese MA, Craner MJ, Palace J, Newcombe J, Esiri MM, et al. Interleukin-17 production in central nervous system-infiltrating T cells and glial cells is associated with active disease in multiple sclerosis. *Am J Pathol* 2008;172:146–55.

- [29] Kasper LH, Shoemaker J. Multiple sclerosis immunology: the healthy immune system vs the MS immune system. *Neurology* 2010;74(Suppl. 1):S2–8.
- [30] McFarland HF, Martin R. Multiple sclerosis: a complicated picture of autoimmunity. *Nat Immunol* 2007;8:913–9.
- [31] O'Connor RA, Prendergast CT, Sabatos CA, Lau CWZ, Leech MD, Wraith DC, et al. Cutting edge: Th1 cells facilitate the entry of Th17 cells to the central nervous system during experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 2008;181:3750–4.
- [32] Kroenke MA, Segal BM. IL-23 modulated myelin-specific T cells induce EAE via an IFN γ driven IL-17 independent pathway. *Brain Behav Immun* 2011;25:932–7.
- [33] Friese MA, Fugger L. Pathogenic CD8(+) T cells in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2009;66:132–41.
- [34] Jacobsen M, Cepok S, Quak E, Happel M, Gaber R, Ziegler A, et al. Oligoclonal expansion of memory CD8+ T cells in cerebrospinal fluid from multiple sclerosis patients. *Brain* 2002;125(Pt 3):538–50.
- [35] Jilek S, Schluep M, Rossetti AO, Guignard L, Le Goff G, Pantaleo G, et al. CSF enrichment of highly differentiated CD8+ T cells in early multiple sclerosis. *Clin Immunol* 2007;123:105–13.
- [36] Saxena A, Martin-Blondel G, Mars LT, Liblau RS. Role of CD8 T cell subsets in the pathogenesis of multiple sclerosis. *FEBS Letters* 2011;585:3758–63.
- [37] Medana I, Martinic MA, Wekerle H, Neumann H. Transection of major histocompatibility complex class I-induced neurites by cytotoxic T lymphocytes. *Am J Pathol* 2001;159:809–15.
- [38] Neumann H, Medana IM, Bauer J, Lassmann H. Cytotoxic T lymphocytes in autoimmune and degenerative CNS diseases. *Trends Neurosci* 2002;25:313–9.
- [39] Annibaldi V, Ristori G, Angelini DF, Serafini B, Mechelli R, Cannoni S, et al. CD161(high)CD8+ T cells bear pathogenetic potential in multiple sclerosis. *Brain* 2011;134(Pt 2):542–54.
- [40] Reboldi A, Coisne C, Baumjohann D, Benvenuto F, Bottinelli D, Lira S, et al. C-C chemokine receptor 6-regulated entry of TH-17 cells into the CNS through the choroid plexus is required for the initiation of EAE. *Nat Immunol* 2009;10:514–23.
- [41] Le Bourhis L, Martin E, Péguillet I, Guihot A, Froux N, Coré M, et al. Antimicrobial activity of mucosal-associated invariant T cells. *Nat Immunol* 2010;11:701–8.
- [42] von Büdingen HC, Bar-Or A, Zamvil SS. B cells in multiple sclerosis: connecting the dots. *Curr Opin Immunol* 2011;23:713–20.
- [43] Disanto G, Morahan JM, Barnett MH, Giovannoni G, Ramagopalan SV. The evidence for a role of B cells in multiple sclerosis. *Neurology* 2012;78:823–32.
- [44] Meier UC, Giovannoni G, Tzartos JS, Khan G. Translational mini-review series on B cell subsets in disease. B cells in multiple sclerosis: drivers of disease pathogenesis and Trojan horse for Epstein-Barr virus entry to the central nervous system? *Clin Exp Immunol* 2012;167:1–6.
- [45] Magliozzi R, Howell O, Vora A, Serafini B, Nicholas R, Puopolo M, et al. Meningeal B-cell follicles in secondary progressive multiple sclerosis associate with early onset of disease and severe cortical pathology. *Brain* 2007;130(Pt 4):1089–104.
- [46] Lovato L, Willis SN, Rodig SJ, Caron T, Almendinger SE, Howell OW, et al. Related B cell clones populate the meninges and parenchyma of patients with multiple sclerosis. *Brain* 2011;134(Pt 2):534–41.
- [47] Serafini B, Rosicarelli B, Franciotta D, Magliozzi R, Reynolds R, Cinque P, et al. Dysregulated Epstein-Barr virus infection in the multiple sclerosis brain. *J Exp Med* 2007;204:2899–912.
- [48] Tzartos JS, Khan G, Vossenkamper A, Cruz-Sadaba M, Lonardi S, Sefia E, et al. Association of innate immune activation with latent Epstein-Barr virus in active MS lesions. *Neurology* 2012;78:15–23.
- [49] Hauser SL, Waubant E, Arnold DL, Vollmer T, Antel J, Fox RJ, et al. B-cell depletion with rituximab in relapsing-remitting multiple sclerosis. *N Engl J Med* 2008;358:676–88.
- [50] Zhou D, Srivastava R, Nessler S, Grummel V, Sommer N, Brück W, et al. Identification of a pathogenic antibody response to native myelin oligodendrocyte glycoprotein in multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:19057–62.
- [51] Harp CT, Ireland S, Davis LS, Remington G, Cassidy B, Cravens PD, et al. Cells from a subset of treatment-naïve relapsing-remitting multiple sclerosis patients elicit CD4(+) T-cell proliferation and IFN- γ production in response to myelin basic protein and myelin oligodendrocyte glycoprotein. *Eur J Immunol* 2010;40:2942–56.
- [52] Duddy ME, Alter A, Bar-Or A. Distinct profiles of human B cell effector cytokines: a role in immune regulation? *J Immunol* 2004;172:3422–7.
- [53] Zhang X, Koldzic DN, Izikson L, Reddy J, Nazareno RF, Sakaguchi S, et al. IL-10 is involved in the suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by CD25+ CD4+ regulatory T cells. *Int Immunol* 2004;16:249–56.
- [54] Matsushita T, Horikawa M, Iwata Y, Tedder TF. Regulatory B cells (B10 cells) and regulatory T cells have independent roles in controlling experimental autoimmune encephalomyelitis initiation and late-phase immunopathogenesis. *J Immunol* 2010;185:2240–52.
- [55] Venken K, Hellings N, Liblau R, Stinissen P. Disturbed regulatory T cell homeostasis in multiple sclerosis. *Trends Mol Med* 2010;16:58–68.
- [56] Lowther DE, Hafler DA. Regulatory T cells in the central nervous system. *Immunol Rev* 2012;248:156–69.
- [57] Vigiñetta V, Baecher-Allan C, Weiner HL, Hafler DA. Loss of functional suppression by CD4+ CD25+ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. *J Exp Med* 2004;199:971–9.
- [58] Michel L, Berthelot L, Pettré S, Wiertlewski S, Lefrère F, Braudeau C, et al. Patients with relapsing-remitting multiple sclerosis have normal Treg function when cells expressing IL-7 receptor α -chain are excluded from the analysis. *J Clin Invest* 2008;118:3411–9.
- [59] Fritzsche B, Haas J, König F, Kunz P, Fritzsche E, Pöschl J, et al. Intracerebral human regulatory T cells: analysis of CD4+ CD25+ FOXP3+ T cells in brain lesions and cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients. *PLoS One* 2011;6:e17988.
- [60] Wolf SD, Dittel BN, Hardardottir F, Janeway Jr CA. Experimental autoimmune encephalomyelitis induction in genetically B cell-deficient mice. *J Exp Med* 1996;184:2271–8.
- [61] Jamin C, Morva A, Lemoine S, Daridon C, de Mendoza AR, Youinou P, et al. Lymphocytes in humans: a potential role in autoimmunity. *Arthritis Rheum* 2008;58:1900–6.
- [62] Mauri C, Bosma A. Immune regulatory function of B cells. *Annu Rev Immunol* 2012;30:221–41.
- [63] Fillatreau S, Sweeney CH, McGeachy MJ, Gray D, Anderton SM. B cells regulate autoimmunity by provision of IL-10. *Nat Immunol* 2002;3:944–50.
- [64] DiLillo DJ, Matsushita T, Tedder TF. B10 cells and regulatory B cells balance immune responses during inflammation, autoimmunity, and cancer. *Ann NY Acad Sci* 2010;1183:38–57.
- [65] Duddy M, Niino M, Adatia F, Hebert S, Freedman M, Atkins H, et al. Distinct effector cytokine profiles of memory and naive human B cell subsets and implication in multiple sclerosis. *J Immunol* 2007;178:6092–9.
- [66] Iwata Y, Matsushita T, Horikawa M, Dilillo DJ, Yanaba K, Venturi GM, et al. Characterization of a rare IL-10-competent B-cell subset in humans that parallels mouse regulatory B10 cells. *Blood* 2011;117:530–41.
- [67] Knippenberg S, Peelen E, Smolders J, Thewissen M, Menheere P, Cohen Tervaert JW, et al. Reduction in IL-10 producing B cells (Breg) in multiple sclerosis is accompanied by a reduced naive/memory Breg ratio during a relapse but not in remission. *J Neuroimmunol* 2011;239:80–6.
- [68] Srivastava R, Aslam M, Kalluri SR, Schirmer L, Buck D, Tackenberg B, et al. Potassium channel KIR4.1 as an immune target in multiple sclerosis. *N Engl J Med* 2012;367:115–23.
- [69] Sewell AK. Why must T cells be cross-reactive? *Nat Rev Immunol* 2012;12:669–77.
- [70] Lucas RM, Hughes AM, Lay M-LJ, Ponsonby A-L, Dwyer DE, Taylor BV, et al. Epstein-Barr virus and multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatr* 2011;82:1142–8.
- [71] Ji Q, Perchellet A, Gorman JM. Viral infection triggers central nervous system autoimmunity via activation of CD8+ T cells expressing dual TCRs. *Nat Immunol* 2010;11:628–34.
- [72] Kebir H, Kreymborg K, Ifergan I, Dodelet-Devillers A, Cayrol R, Bernard M, et al. Human TH17 lymphocytes promote blood-brain barrier disruption and central nervous system inflammation. *Nat Med* 2007;13:1173–5.
- [73] Casiraghi C, Dorovini-Zis K, Horwitz MS. Epstein-Barr virus infection of human brain microvessel endothelial cells: a novel role in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2011;230:173–7.
- [74] Pender MP. CD8+ T-cell deficiency, Epstein-Barr virus infection, vitamin D deficiency, and steps to autoimmunity: a unifying hypothesis. *Autoimmune Dis* 2012;2012:189096.
- [75] Barnett MH, Prineas JW. Relapsing and remitting multiple sclerosis: pathology of the newly forming lesion. *Ann Neurol* 2004;55:458–68.

Implication des lymphocytes T CD8⁺ à répertoire restreint dans la sclérose en plaques

La Sclérose En Plaques (SEP) est une maladie autoimmune démyélinisante du Système Nerveux Central (SNC), dans laquelle les lymphocytes T (LT) CD4⁺ semblent jouer un rôle majeur. L'implication des LT CD8⁺ a été mise en évidence plus récemment, grâce à de nombreux arguments génétiques, neuropathologiques et immunologiques. Dans des lésions du SNC de patients, les LT CD8⁺ sont prédominants et ont une répartition oligoclonale, suggérant une infiltration ou une prolifération *in situ* dépendante d'un antigène. Pour savoir si ces cellules sont accessibles depuis le sang et/ou le liquide céphalorachidien (LCR), nous avons étudié le répertoire lymphocytaire T dans ces différents compartiments. Notre travail montre que le LCR et le sang peuvent être utilisés comme source de LT CD8⁺ oligoclonaux du SNC. De plus, dans le sang et le SNC, ces cellules présentent des caractéristiques suggérant leur implication dans la maladie. En parallèle, nous avons étudié une nouvelle sous-population de LT innés présentant un récepteur T semi-invariant, les cellules MAIT (*Mucosal Associated Invariant T*). Ces cellules, qui expriment les marqueurs de cellules productrices d'IL-17, sont importantes dans l'immunité antimicrobienne. Bien que dérégulées en périphérie chez les patients, elles ne semblent pas s'activer différemment des cellules des témoins. Elles sont présentes en faible quantité dans le SNC, en accord avec leur faible capacité de transmigration, et sont susceptibles d'y exercer un rôle non spécifique. En conclusion, ce travail a permis de mieux comprendre l'implication de sous-population de LT CD8⁺ dans la physiopathologie de la SEP.

Mots clés : Sclérose en plaques – Système nerveux central - Lymphocytes T – Répertoire T – Cellules "mucosal associated invariant T"

Implication of CD8⁺ T lymphocytes with a restricted repertoire in multiple sclerosis

Multiple Sclerosis (MS) is an autoimmune disease of the Central Nervous System (CNS) in which CD4⁺ T lymphocytes are thought to play pivotal roles. More recently, numerous studies assessing neuropathological, genetic, and immunological parameters have highlighted the importance of CD8⁺ T cells in the physiopathology of the disease. These cells outnumber CD4⁺ T cells and have an oligoclonal repartition in the CNS lesions of MS patients, suggesting an antigen-driven infiltration or an *in situ* proliferation. To decipher whether these cells could be isolated from the blood or the cerebrospinal fluid (CSF), we compared the T cell repertoire in these three compartments. Our work shows that CSF and blood samples could be used as a source of clonally expanded CD8⁺ T cells found at the lesion sites. In the blood and in the CNS, these cells display characteristics suggesting their involvement in the disease. In parallel, we studied MAIT (Mucosal Associated Invariant T) cells, a subset of innate T lymphocytes with a semi-invariant T cell receptor. These cells express makers of IL-17 producing T cells and have been demonstrated to be important in the antimicrobial immunity. Despite their deregulated phenotype in the blood of MS patients, they display similar activation potential as MAIT cells from controls. They are present at a low frequency in the CNS, consistent with their low transmigration abilities. However, they are likely to exert a bystander role *in situ*. In conclusion, this work gives new insights into the implication of subsets of CD8⁺ T cells in the physiopathology of MS.

Key Words: Multiple sclerosis – Central nervous system – T lymphocytes – T repertoire – Mucosal associated invariant T cells