

UNIVERSITE DE NANTES
FACULTE DES SCIENCES ET DES TECHNIQUES

ÉCOLE DOCTORALE BIOLOGIE ET SANTÉ

Année 2012

N° attribué par la bibliothèque

Analyse de la régulation lymphocytaire dans la sclérose en plaques

THÈSE DE DOCTORAT

Discipline : Sciences de la vie et de la santé

Spécialité : Immunologie

Présentée et soutenue publiquement par

Laure MICHEL

Le 18 octobre 2012, devant le jury ci-dessous

Président : Pr Dominique Baeten, Amsterdam

Rapporteurs : Pr Jérôme de Sèze, Strasbourg

Dr Christophe Jamin, Brest

Examineur : Pr Dominique Baeten, Amsterdam

Directeur de Thèse : Dr Sophie Brouard, Nantes

Co-Directeur : Dr David-Axel Laplaud, Nantes



Patients with relapsing-remitting multiple sclerosis have normal Treg function when cells expressing IL-7 receptor α -chain are excluded from the analysis

Laure Michel,^{1,2} Laureline Berthelot,¹ Ségolène Pettré,¹ Sandrine Wiertlewski,^{2,3} Fabienne Lefrère,³ Cécile Braudeau,¹ Sophie Brouard,¹ Jean-Paul Soullou,¹ and David-Axel Laplaud^{1,2,3}

¹INSERM U643, CHU Nantes, Institut de Transplantation et de Recherche en Transplantation (ITERT), and Faculté de Médecine, Université de Nantes, Nantes, France. ²Service de Neurologie and ³INSERM CIC004, CHU Nantes, Nantes, France.

Multiple sclerosis (MS) is a chronic inflammatory disease that results in demyelination in the central nervous system, and a defect in the regulatory function of CD4⁺CD25^{high} T cells has been implicated in the pathogenesis of the disease. Here, we reanalyzed the function of this T cell subset in patients with MS, but we depleted cells expressing IL-7 receptor α -chain (CD127), a marker recently described as present on activated T cells but not Tregs. Similar to other studies, we observed a marked defect in the suppressive function of unseparated CD4⁺CD25^{high} T cells isolated from MS patients. However, when CD127^{high} cells were removed from the CD4⁺CD25^{high} population, patient and control cells inhibited T cell proliferation and cytokine production equally. Likewise, when the CD25 gate used to sort the cells was stringent enough to eliminate CD127^{high} cells, CD4⁺CD25^{high} T cells from patients with MS and healthy individuals had similar regulatory function. Additional analysis indicated that the CD127^{high} cells within the CD4⁺CD25^{high} T cell population from patients with MS appeared more proliferative and secreted more IFN- γ and IL-2 than the same cells from healthy individuals. Taken together, we conclude that CD4⁺CD25^{high}CD127^{low} Tregs from MS patients and healthy individuals exhibit similar suppressive functions. The decreased inhibitory function of unfractionated CD4⁺CD25^{high} cells previously observed might be due to abnormal activation of CD127^{high} T cells in patients with MS.

Introduction

In the adaptive immune system, the balance between the efficient recognition of pathogens and the control of autoimmune diseases is assumed by deletion of autoreactive clones and mechanisms of peripheral tolerance in which Tregs have a key role (1, 2). Such a role for Tregs was first described by Sakaguchi and colleagues, opening the way for the description of different types of Tregs (3, 4). The same group identified the transcription factor FOXP3 as the hallmark of regulatory function (5–7). However, FOXP3 cannot be used to isolate living Tregs because of its intracellular expression. In addition, FOXP3 can also be expressed by activated cells (8–10). Natural Tregs also express IL-2 receptor α -chain (IL-2R α chain, also known as CD25), a cell surface marker commonly used to distinguish among regulatory (CD25^{high}), activated (CD25^{int}), and naive (CD25^{low}) T cells (11, 12) in humans. However, despite CD25 being a useful marker, the level of CD25 expression alone does not enable a precise estimation of the content of Tregs within a biological sample. Recently, Seddiki et al. (13) and Liu et al. (14) showed that, in humans, low expression of IL-7R α chain (CD127) combined with high expression of CD25 enables better isolation and purification of Treg populations among CD4⁺CD25⁺ T cells. In functional assays, CD4⁺CD25^{high}CD127^{low} T cells are highly suppressive. Furthermore, expression of CD127 negatively

correlates with FOXP3 content, since FOXP3 interacts with the CD127 promoter, contributing to the low expression of CD127 in CD4⁺CD25^{high} Tregs (14).

MS is a chronic inflammatory and demyelinating disease of the central nervous system. This disorder is thought to be initiated by autoreactive T cells recognizing peptides from myelin sheath proteins (15, 16). However, there is no compelling evidence that the frequency of autoreactive cells is increased in MS versus age-matched controls (17). In an initial study, the frequency of CD4⁺CD25^{high} T cells was found to be normal, but the authors did not assess functional suppression (18). Several studies have sought to prove the hypothesis of a reduced suppressive function of this T cell subset in MS (19–21). Viglietta et al. (21) reported a decrease in the regulatory function of CD4⁺CD25^{high} T cells from the peripheral blood of patients with relapsing-remitting MS (RR-MS) compared with healthy individuals (HIs). In addition, the levels of FOXP3 have also been reported as decreased, both at the single cell level and in the CD4⁺CD25⁺ population (22, 23). Hence, a defect in the control of the *in vitro* proliferative response of MS patient CD4⁺ T cells to myelin proteins has also been reported (19, 20). However, in all of these studies, a single-step CD25 enrichment protocol was used to isolate the T cell populations tested in a coculture system in which the regulatory potency assessment was based on the inhibition of CD4⁺CD25⁻ cell growth following polyclonal stimulation.

In this study, we took advantage of new CD4⁺CD25^{high} markers to revisit CD4 T cell regulatory function in MS patients. For this purpose, we used CD127-depleted cells to more precisely characterize the regulatory properties of CD4⁺CD25^{high} T cells from MS

Nonstandard abbreviations used: HI, healthy individual; RR-MS, relapsing-remitting MS.

Conflict of interest: The authors have declared that no conflict of interest exists.

Citation for this article: *J. Clin. Invest.* 118:3411–3419 (2008). doi:10.1172/JCI35365.

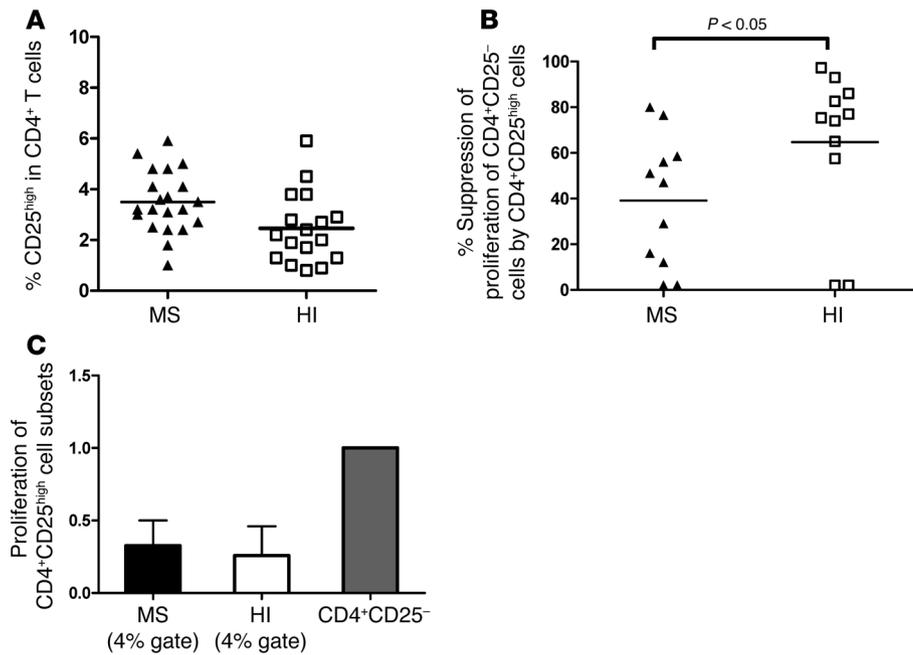


Figure 1

Frequency, proliferation, and suppressive activity of the top 4% of sorted CD4⁺CD25^{high} T cells from MS patients and HIs. **(A)** Comparison of the percentage of CD4⁺CD25^{high} T cells from MS patients and controls. The cut-off for high-staining CD25 was placed at 6×10^3 of mean fluorescence intensity. No statistical difference can be shown between the groups (patients, $n = 21$; HI, $n = 17$). **(B)** Regulatory properties of CD4⁺CD25^{high} cells were examined in 11 untreated patients with RR-MS and 11 healthy controls. Cocultures of CD4⁺CD25⁻ and CD4⁺CD25^{high} cells were performed at a 1:1 ratio and under anti-CD3 stimulation. Proliferation was measured by incorporation of ³H-thymidine after 5 days of incubation. The percentage of suppression of responding cell proliferation (CD4⁺CD25⁻) by CD4⁺CD25^{high} cells was determined as $1 - (\text{proliferation of coculture} / \text{proliferation of responder population alone}) \times 100$, where proliferation is expressed as cpm. CD4⁺CD25^{high} T cells from MS patients exhibited less suppressive activity when the gate for sorting was positioned as shown in Supplemental Figure 1 ($P < 0.05$, Mann-Whitney U test). Mean values in **A** and **B** are indicated by horizontal lines. **(C)** Comparison of the proliferation of CD4⁺CD25^{high} T cells in MS patients and HIs relative to the proliferation of the CD4⁺CD25⁻ T cell subset. Proliferation of CD4⁺CD25^{high} cells was not significantly different between patients ($n = 11$) and HIs ($n = 11$). When the top 4% of CD4⁺CD25^{high} T cells were sorted, the cells were not fully anergic, suggesting the presence of activated T cells. Data represent mean \pm SD.

patients compared with HIs. Based on a study of 34 patients and 25 healthy volunteers, we now report that the regulatory function of the CD4⁺CD25^{high}CD127^{low} T cells is similar in MS patients and HIs. We also show that the isolated CD4⁺CD25^{high}CD127^{high} T cell subset of MS patients may proliferate more and produce more mitogenic lymphokines in coculture assays, resulting in an apparent peripheral defect of CD4⁺CD25^{high} regulation in MS patients.

Results

Suppressive function of the top 4% of sorted CD4⁺CD25^{high} T cells from MS patients. We first studied the frequency of CD4⁺CD25^{high} T cells in MS patients and HIs using flow cytometry. Figure 1A shows that the mean frequency of CD4⁺CD25^{high} cells within the CD4⁺ T cell population was $2.5\% \pm 1.4\%$ for HIs and $3.5\% \pm 1.2\%$ for MS patients ($P = \text{NS}$), confirming that there is no difference in the frequency of CD4⁺CD25^{high} T cells between MS patients and HIs.

Next, in order to confirm the reported suppressive defect of the CD4⁺CD25^{high} T cell population, we sorted these cells from the peripheral blood of patients ($n = 11$) and HIs ($n = 11$) using a high-

speed FACS sorter and compared their inhibitory properties. The gate was set up to include 4% of the CD4⁺ T cells (based on a reference umbilical cord population) (Supplemental Figure 1; supplemental material available online with this article; doi:10.1172/JCI35365DS1). A regulatory function assay was then performed based on the capacity of the cells to inhibit polyclonal proliferation of autologous CD4⁺CD25⁻ cells. Figure 1B shows the results obtained under these conditions, when CD4⁺CD25^{high} T cells sorted from MS patients were added to the coculture system, indicating an apparent defective regulatory function as compared with HIs ($39.0\% \pm 28.4\%$ suppression in MS patients versus $64.7\% \pm 33\%$ in HIs; $P = 0.048$, Mann-Whitney U test). However, Figure 1C shows that under these sorting conditions, the isolated CD4⁺CD25^{high} cells of both MS patients and normal individuals were not fully anergic, with a proliferation of 32.7% in MS patients and 26.3% in HIs (the proliferation of CD4⁺CD25⁻ T cells from each group was used as the reference). The fact that the cells were not fully anergic under this gating condition led us to explore the possibility that contaminating cells were interfering with the proliferation assay. To do this, Tregs were sorted either by additionally taking into account their expression of CD127 or by using more stringent gating to select cells at the extreme end of CD25 positivity.

Similar suppressive activity of the top 2% of sorted CD4⁺CD25^{high} T cells in MS patients and HIs. Because contrasting expression of CD25 and CD127 markers has been

reported (13, 14), we sorted the CD4⁺CD25^{high} T cells using a more stringent threshold for CD25 expression (CD25^{high}; less than 2% of the CD4⁺ T cells) to compare their inhibitory properties in patients and controls. Figure 2A shows that the gating stringency was indeed associated with a disappearance of CD127^{high} T cells among the purified CD4⁺CD25^{high} T cells. Figure 2B shows that when sorting the top 2%, the suppression of CD4⁺CD25⁻ T cell proliferation was roughly similar between the 2 groups ($73.3\% \pm 17.8\%$ in MS patients, $n = 12$, and $76.5\% \pm 20.5\%$ in healthy controls, $n = 10$). Furthermore, in this sorting condition, the purified CD4⁺CD25^{high} T cells were fully anergic (Figure 2C). Finally, we analyzed the intracellular FOXP3 expression in this CD4⁺CD25^{high} subset. No significant difference was noted between MS patients ($n = 10$) and HIs ($n = 9$), with a mean expression of $83.2\% \pm 9.5\%$ in patients and $78.5\% \pm 6\%$ in HIs when gating only on the top 2% of CD4⁺CD25^{high} cells (Figure 2D).

Thus, these experiments further support the idea that in MS patients, the presence of contaminating CD127^{high} cells within the CD4⁺CD25^{high} T cell subset may explain an apparent alteration in their regulatory function.

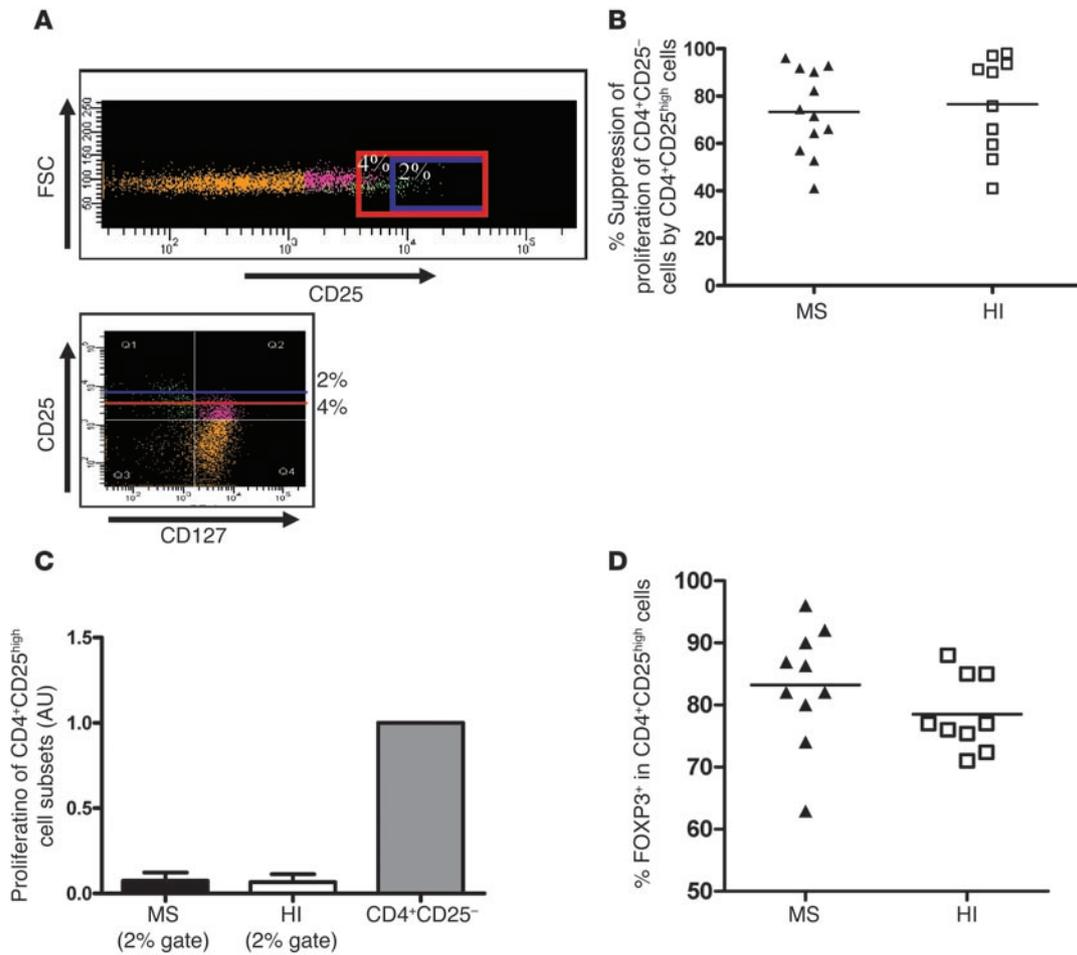


Figure 2

Suppressive activity and proliferation of the top 2% of sorted CD4+CD25^{high} cells from MS patients and healthy controls. **(A)** CD4⁺ lymphocytes obtained from the peripheral blood of MS patients and healthy controls were stained with Pe-Cy7-conjugated anti-CD3, FITC-conjugated anti-CD8, Alexa Fluor 647-conjugated anti-CD25, and PE-conjugated anti-CD127. Sorting was performed on the CD4⁺CD25^{high}CD127^{low} and CD4⁺CD25^{high}CD127^{high} populations. Sorting was also performed on the CD4⁺CD25^{high} population with 2 different gates. In the example provided for 1 MS patient, CD4⁺CD25⁺ T cells appear in orange, CD4⁺CD25⁺CD127^{low} T cells appear in green, and CD127^{high} cells appear in violet. The presence of CD127^{high} activated cells can be observed in the CD4⁺CD25^{high} sorted T cells when the gate is not stringent enough (4% gating stringency, area above the red line), while in the case of a 2% gating stringency (area above the blue line), only a few CD127^{high} cells remain within the CD4⁺CD25^{high} T cell subset. FSC, forward scatter. **(B)** CD4⁺CD25⁻ responder cells were stimulated with anti-CD3 antibody (0.1 μg/ml) in coculture with the top 2% of CD4⁺CD25^{high} sorted cells. Data are the mean of duplicate wells. Regulatory properties of CD4⁺CD25^{high} cells are comparable in both HIs (*n* = 10) and patients (*n* = 12). **(C)** Comparison of the proliferation of the top 2% of sorted CD4⁺CD25^{high} T cells in MS patients and HIs relative to the proliferation of the CD4⁺CD25⁻ T cell subset. The proliferation of CD4⁺CD25^{high} T cells was minimal and almost null in both patients and controls. Data are mean ± SD. **(D)** Intracellular FOXP3 staining was performed on the top 2% of sorted CD4⁺CD25^{high} T cells in 10 patients and 9 HIs. In **B** and **D**, the mean values for each group are indicated by horizontal lines.

Similar frequency and suppressive activity of CD4⁺CD25^{high}CD127^{low} cells in MS patients and HIs. Because CD25 is not a specific marker of Tregs (activated and memory T cells can also express CD25), we used expression of CD127 to discriminate activated and memory T cells (CD4⁺CD25^{high}CD127^{high} T cells) from regulatory cells (CD4⁺CD25^{high}CD127^{low} T cells) among the CD4⁺CD25^{high} subset (13). We compared the regulatory properties of CD127-depleted CD25^{high} T cells from MS patients and age-matched individuals. T cells were thus labeled with anti-CD127, and the CD4⁺CD25^{high}CD127^{low} cells were sorted (Figure 2A). Figure 3A shows that there was no difference in the percentage of CD25^{high}CD127^{low} cells within the CD4⁺ T cell populations of MS patients compared with HIs, with a mean frequency of 6.8% ± 1.8%

for MS patients and 6.2% ± 1.6% for HIs (*P* = NS, Mann-Whitney *U* test). The cells were then tested for their ability to suppress the proliferation of CD4⁺CD25⁻ cells in response to irradiated autologous PBMC and anti-CD3 activation over 5 days. Under these conditions, no significant difference in suppression of autologous CD4⁺CD25⁻ proliferation was observed between the CD4⁺CD25^{high}CD127^{low} cells of RR-MS patients (*n* = 25) and those of healthy controls (*n* = 23) (Figure 3B). Proliferation of CD4⁺CD25⁻ T cells was inhibited by a mean of 75.3% ± 20.9% in MS patients and 78.3% ± 15.0% in age-matched HIs. Thus, an improvement in the suppressive function of this cell subset was observed in both MS patients and HIs, as compared with the use of CD25 alone as a marker of Tregs. The proliferation of these cell subsets was then tested and compared with

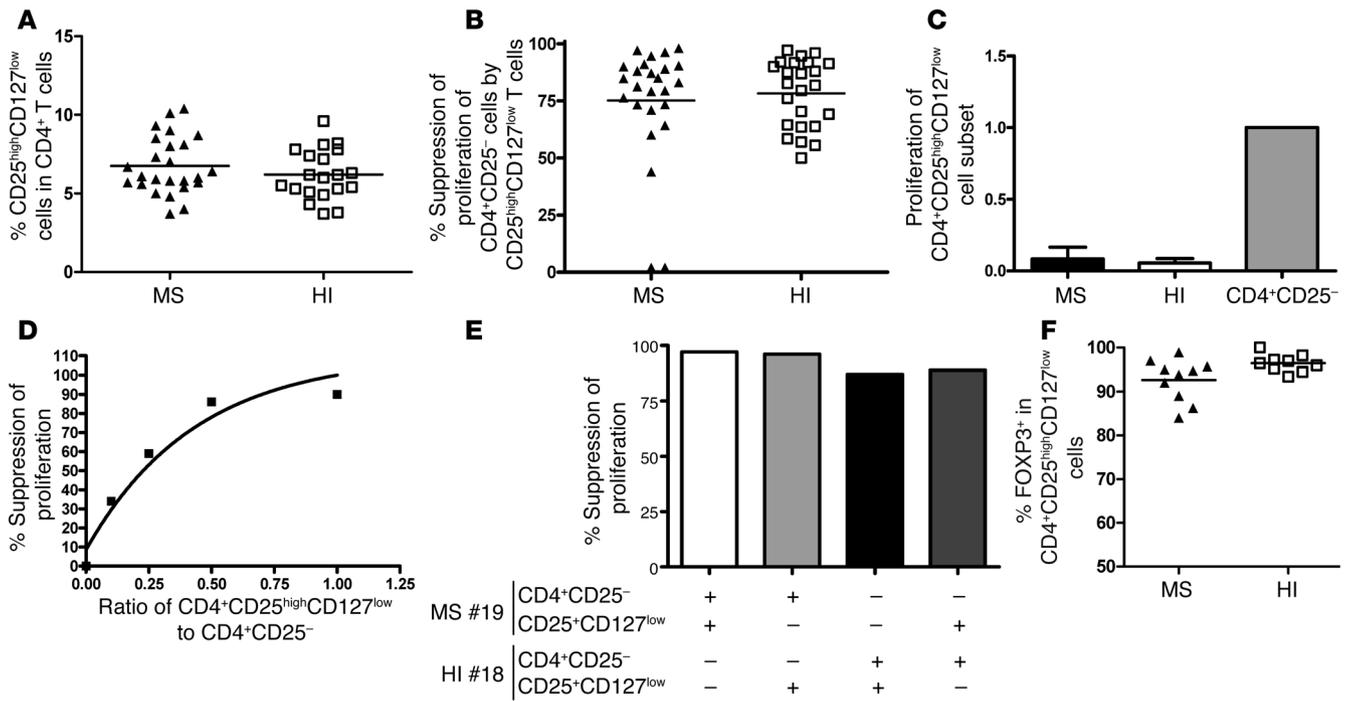


Figure 3

Frequency, proliferation, and suppressive activity of CD4⁺CD25^{high}CD127^{low} cells from MS patients and healthy controls. (A) Percentages of CD25^{high}CD127^{low} cells within the total CD4⁺ T cell population were determined by flow cytometry analysis of PBMCs. No statistical difference was found between the groups (25 patients and 20 HIs). (B) Regulatory properties of CD4⁺CD25^{high}CD127^{low} cells were comparable in both HIs (*n* = 24) and patients (*n* = 25). (C) Comparison of the proliferation of CD4⁺CD25^{high}CD127^{low} T cells in MS patients and HIs normalized against the proliferation of the CD4⁺CD25⁻ T cell subset. The proliferation of CD4⁺CD25^{high}CD127^{low} T cells was minimal and approaching 0 in both patients and controls. (D) Example in 1 patient of variations of the suppression of proliferation by CD4⁺CD25^{high}CD127^{low} cells in the cocultures at varying ratios of CD4⁺CD25^{high}CD127^{low} to CD4⁺CD25⁻. Decreasing the number of CD4⁺CD25^{high}CD127^{low} T cells resulted in less suppressor activity. (E) CD4⁺CD25^{high}CD127^{low} T cells from 1 patient with MS inhibited proliferation of responder T cells isolated from either the autologous individual or the healthy control. Conversely, Tregs from 1 HI were cocultured with responder T cells from the same subject or those from the MS patient. MS#19, MS patient 19; HI#18, HI subject 18. (F) Intracellular FOXP3 staining was performed on CD4⁺CD25^{high}CD127^{low} T cells in 10 patients and 9 HIs. In A, B, and F, mean values are indicated by horizontal lines.

their CD4⁺CD25⁻ counterparts. Figure 3C shows that in these new conditions, the basal proliferation of the CD4⁺CD25^{high}CD127^{low} T cells was very low or absent (a representative example is shown in Supplemental Figure 2) and clearly differed from that of the top 4% of sorted CD4⁺CD25^{high} cells. In addition, this lack of proliferation was totally reversed by the addition of IL-2 (data not shown), suggesting a state of anergy. The suppressive activity was dose dependent in that dilution of the CD4⁺CD25^{high}CD127^{low} T cells (over a range of 1:1 to 1:10) decreased their suppressive function (Figure 3D). Finally, CD4⁺CD25^{high}CD127^{low} Tregs from MS patients were able to suppress effector CD4⁺CD25⁻ cells from HIs to the same extent as the CD4⁺CD25^{high}CD127^{low} cells from HIs on CD4⁺CD25⁻ T cells from MS patients (Figure 3E).

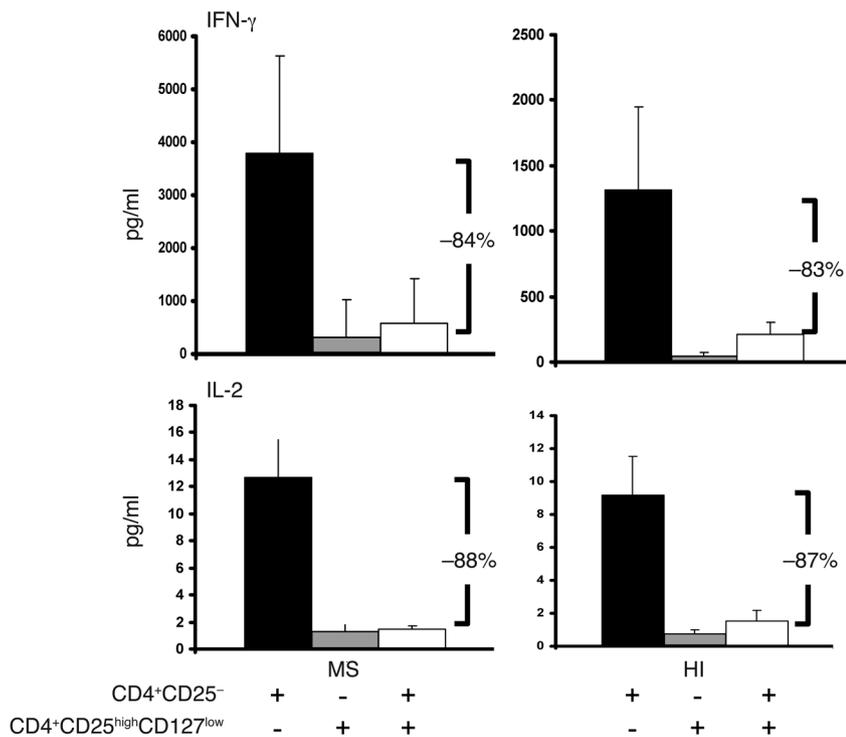
Finally, we analyzed intracellular FOXP3 expression in the CD4⁺CD25^{high}CD127^{low} cells. No significant difference was noted between patients (*n* = 10) and HIs (*n* = 9), with a mean expression of 92.6% ± 4.8% in MS patients and 96.4% ± 2% in HIs (Figure 3F).

Further, when considering the production of IFN-γ or IL-2 by CD4⁺CD25⁻ responder cells after 3 days of polyclonal stimulation in the presence of irradiated autologous PBMCs, the same suppressive capacity of CD4⁺CD25^{high}CD127^{low} T cells was observed in patients and controls (*n* = 4; Figure 4). An 84% and an 83% reduction in IFN-γ production was observed in MS patients and

HIs, respectively. Similarly, the reduction in IL-2 production was 88% and 87% in MS patients and HIs, respectively.

Taken together, these data indicate that CD4⁺CD25^{high}CD127^{low} Tregs from MS patients do not display a defect in their suppressive properties and that activated CD127^{high} cells within the CD4⁺CD25^{high} T cell population interfere with the proliferation assay.

Significantly higher proliferation of activated CD4⁺CD25^{high}CD127^{high} T cells in MS patients versus HIs. In order to know whether the apparently impaired suppressive function of the CD4⁺CD25^{high} cell subset (not depleted of CD127^{high} cells) from MS patients (Figure 1B) could be due to the presence of activated CD127^{high} cells, we first compared the frequency of CD4⁺CD25^{high}CD127^{high} cells between MS patients and HIs. No difference was observed between the 2 groups (9.2% ± 4.8% in MS patients and 8.2% ± 4.6% in controls) (Figure 5A). Next, the proliferation of the CD4⁺CD25^{high}CD127^{high} T cells of both MS patients (*n* = 20) and HIs (*n* = 20) was compared with that of CD4⁺CD25^{high}CD127^{low} T cells. The data were normalized against the proliferation of CD4⁺CD25⁻ T cells in order to compare individuals, as the absolute values of proliferation under CD3 stimulation can be variable. This type of presentation has been reported before (14). The raw data expressed in cpm are provided in Supplemental Figures 3–5. Figure 5B shows no difference in proliferation of the CD4⁺CD25^{high}CD127^{low} subset between MS patients and HIs, with a

**Figure 4**

Suppression of cytokine production by CD4⁺CD25^{high}CD127^{low} T cells in patients and controls. Cytokines (IL-2 and IFN- γ) were measured in supernatants taken from each well 3 days after the initiation of coculture (CD4⁺CD25⁻ T cells/CD4⁺CD25^{high}CD127^{low} T cells at a 1:1 ratio) using a multiplex fluorescent bead immunoassay. Three days after initiation of the coculture, the same percentage suppression of IFN- γ (top panels) and IL-2 (bottom panels) production by CD4⁺CD25^{high}CD127^{low} was observed in the cocultures from 4 patients and 4 HIs. Data are mean \pm SD.

very low proliferation in both groups. On the contrary, the proliferation of CD4⁺CD25^{high}CD127^{high} T cells in MS patients was 1.9-fold higher (4.2 ± 3.9 relative to the proliferation of CD4⁺CD25⁻ T cells) than in controls (2.2 ± 2.8 ; $P = 0.017$, Mann-Whitney U test; Figure 5B). This observation further supports the possibility that the CD127^{high} T cells within the CD4⁺CD25^{high} subset might interfere in the apparent defective regulation of CD4⁺CD25^{high} T cells in MS patients. This CD127^{high} contamination can be prevented using a selective sorting of CD127^{low} cells or more stringent gating sorting conditions of CD4⁺CD25^{high} cells (Figure 2A). The contribution of these activated cells to the apparent alteration in regulatory properties of the CD4⁺CD25^{high} cells was also demonstrated by the significant inverse correlation observed between the suppressive function of CD4⁺CD25^{high} cells and the presence of CD127^{high} T cells within this cell subset (Pearson correlation coefficient of $r = -0.51$; $P = 0.006$, linear regression test; Figure 5C). Finally, we analyzed intracellular FOXP3 expression in the CD4⁺CD25^{high}CD127^{high} cells. No significant difference was noted between MS patients ($n = 10$) and HIs ($n = 9$), with a mean expression of $17.7\% \pm 10.8\%$ in patients and $16.8\% \pm 8.6\%$ in controls (Figure 5D).

Cytokine secretion by the CD4⁺CD25^{high}CD127^{high}, CD4⁺CD25⁻, and CD4⁺CD25^{high}CD127^{low} populations in MS patients and HIs. The cytokines TNF- α , IFN- γ , and IL-2 were also measured in the supernatants of the proliferation assays from the CD4⁺CD25^{high}CD127^{high}, CD4⁺CD25^{high}CD127^{low}, and CD4⁺CD25⁻ cell populations and their

cocultures after 24 hours of proliferation. No significant difference was observed between patients ($n = 10$) and HIs ($n = 10$) for the 3 cell subsets (data not shown) after 24 hours. However, CD4⁺CD25^{high}CD127^{high} cells from MS patients secreted significantly higher levels of cytokines than CD4⁺CD25^{high}CD127^{low} and CD4⁺CD25⁻ T cells (Figure 6A; $P = 0.011$, $P = 0.0001$, and $P = 0.0005$ when compared with CD4⁺CD25⁻ for IFN- γ , TNF- α , and IL-2, respectively; and $P = 0.0031$, $P = 0.0039$, and $P < 0.0001$ when compared with CD4⁺CD25^{high}CD127^{low} for IFN- γ , TNF- α , and IL-2, respectively; Mann-Whitney U test), suggesting that these cells had a proinflammatory potential. In addition, CD4⁺CD25^{high}CD127^{low} T cells did not produce IL-2 or IFN- γ when stimulated by anti-CD3, as would be expected from their regulatory phenotype.

Hence, to study their production of cytokines, CD4⁺CD25^{high}CD127^{high} cells from MS patients ($n = 4$) and HIs ($n = 4$) were cultured under CD3 polyclonal stimulation in the presence of irradiated PBMCs for 3 days. IFN- γ and TNF- α were subsequently measured using a multiplex fluorescent bead assay. As shown in Figure 6B, $6,580 \pm 2,093$ pg/ml of IFN- γ was detected in the cultures of MS patient cells as compared with $2,567 \pm 1,092$ pg/ml for HIs. Concerning TNF- α production, the cells from MS patients produced $3,107 \pm 346$ pg/ml compared with $1,571 \pm 629$ pg/ml for HIs. IL-2 production was also increased in MS patients as compared with HIs (14 ± 3 versus 6 ± 2 pg/ml, respectively). The CD4⁺CD25^{high}CD127^{high}

cells from MS patients produced nearly 2-fold more proinflammatory cytokines compared with the same cells from HIs. While statistical significance was not achieved, a trend toward significance was observed (IFN- γ , $P = 0.06$, Mann-Whitney U test; TNF- α , $P = 0.09$; IL-2, $P = 0.1$) despite the very low number of patients and controls studied ($n = 4$).

FOXP3 content of CD4⁺CD25^{high} and CD4⁺CD25^{high}CD127^{low} populations in MS patients and HIs. We compared intracellular FOXP3 expression between CD4⁺CD25^{high} and CD4⁺CD25^{high}CD127^{low} cell subsets in patients ($n = 10$) and controls ($n = 9$). The use of anti-CD127 antibody provided a purified CD4⁺CD25^{high}CD127^{low} population expressing more FOXP3 in MS patients and HIs ($92.6\% \pm 4.8\%$ and $96.4\% \pm 2\%$, respectively), as compared with $83.2\% \pm 9.5\%$ in patients and $78.5\% \pm 6\%$ in HIs when gating only on the top 2% of the CD4⁺CD25^{high} population ($P < 0.0001$, Mann-Whitney U test; Figure 7).

Discussion

CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ regulatory T lymphocytes have been shown to play a key role in controlling potentially harmful responses to self-determinants in mice (24) and humans (1). Recently, a possible defect in the function of CD4⁺CD25^{high} cells has been reported in patients with RR-MS (1, 19–21). In this paper, we revisited this observation by analyzing the properties of subpopulations of CD4⁺CD25^{high} T cells, taking into consideration the recent findings that activated/memory cells expressing CD127 are also present

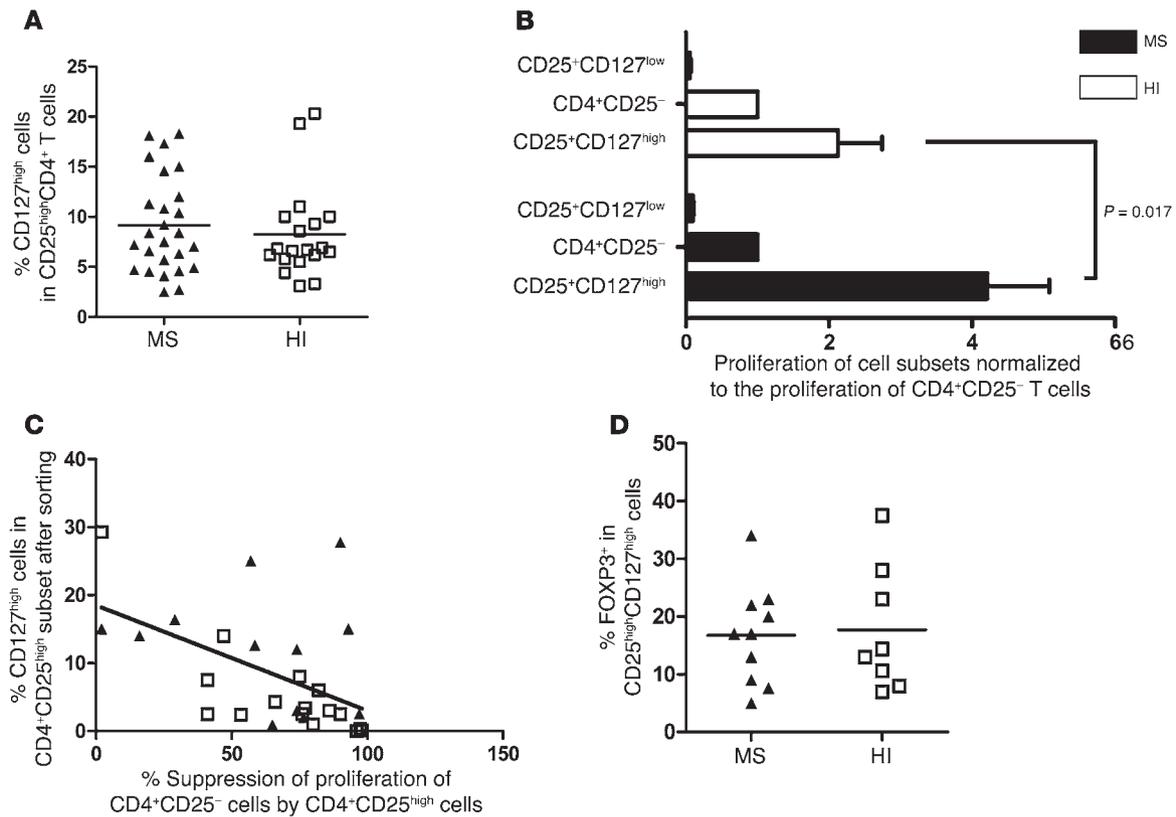
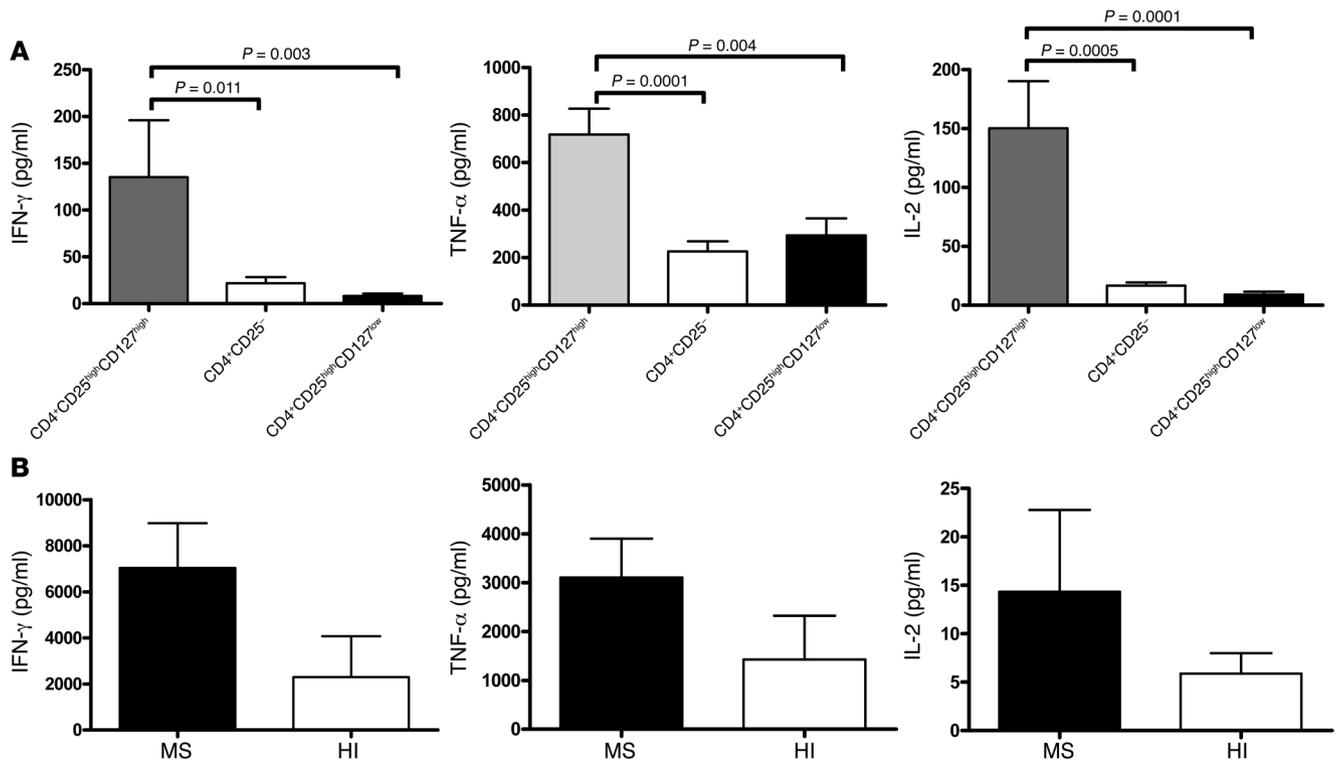


Figure 5
 Comparison of the proliferation of CD4⁺CD25^{high}CD127^{low} T cells and CD4⁺CD25^{high}CD127^{high} T cells. **(A)** CD4⁺ lymphocytes obtained from the peripheral blood of MS patients and healthy controls were stained with Pe-Cy7–conjugated anti-CD3, FITC-conjugated anti-CD8, Alexa Fluor 647–conjugated anti-CD25, and PE-conjugated anti-CD127. No statistically significant difference was observed in the frequency of CD4⁺CD25^{high}CD127^{high} T cells between MS patients (*n* = 25) and healthy controls (*n* = 19). Mean value is indicated for each group. **(B)** CD4⁺CD25^{high}CD127^{low} T cells or CD4⁺CD25^{high}CD127^{high} T cells were cocultured with irradiated autologous PBMCs and stimulated with anti-CD3 antibody. CD25^{high}CD127^{low} cells were isolated from 25 patients and 23 HIs. CD25^{high}CD127^{high} cells were isolated from 20 patients and 20 HIs. A significant difference was observed in the proliferation of CD25^{high}CD127^{high} T cells between MS patients and HIs (*P* = 0.017, Mann-Whitney *U* test). Bar graphs indicate the mean ± SD. **(C)** Suppression of proliferation of CD4⁺CD25[−] cells by CD4⁺CD25^{high} cells was calculated in 13 patients and 15 HIs. The percentage of CD127^{high} cells present in the sorted CD4⁺CD25^{high} T cells was estimated in the same manner. A correlation was found between this percentage and the regulatory properties of CD4⁺CD25^{high} cells with a Pearson coefficient of *r* = −0.50 (*P* = 0.006, linear regression test). Black triangles represent data obtained from MS patients, and white squares represent data from HIs. **(D)** Intracellular FOXP3 staining was performed on CD4⁺CD25^{high}CD127^{high} T cells in 10 patients and 9 HIs. In **B** and **D**, horizontal lines indicate the mean.

within the CD4⁺CD25⁺ T cell population and can potentially interfere in the classical functional assays for measuring CD4⁺CD25^{high} Treg suppressive properties (13, 14, 25). To our knowledge, this is the first study using CD127 to discriminate Tregs in MS patients and showing that this CD4⁺CD25^{high}CD127^{low} T cell subset actually has the same regulatory potency in patients and in age-matched control subjects. The frequency of the CD4⁺CD25^{high} T cells also appeared to be similar between MS patients and HIs, as reported previously (18). However, several studies have reported a defective suppressive function in CD4⁺CD25^{high} T cells from MS patients under polyclonal (21) or antigen-based stimulation (19, 20), suggesting that this defect might be involved in the pathophysiology of MS (26, 27). At the time of these studies, CD127^{low} staining was not available for the CD4⁺CD25^{high} Tregs. Our investigations suggest that CD4⁺CD25^{high} Treg function may not be altered in MS, since CD4⁺CD25^{high}CD127^{low} T cells display a normal suppressive function. Rather, a discrete population of CD4⁺CD25^{high}CD127^{high} cells in patients is likely to interfere with the coculture assay by a trend

for hyperproliferation and for producing more proinflammatory cytokines able to enhance CD25[−] T cell proliferation. Our data shed new light on the heterogeneity of the CD4⁺CD25^{high} T cell population and suggest a possible role for CD4⁺CD25^{high}CD127^{high} cells in MS. These findings are indirectly supported by recent genomic studies in MS suggesting alterations in *IL2RA* and *IL7RA* genes (28–30). As expected, we first confirmed a defective suppressive function of the CD4⁺CD25^{high} T cells in MS patients (39% in MS patients versus 69% in age-matched HIs, *P* < 0.05). However, because CD25 is not specific for Tregs but is also expressed by activated T cells (1, 31–33), it was important to take into consideration other markers that distinguish activated/memory cells not endowed with regulatory function. Another difficulty in assessing Treg function by studying CD4⁺CD25⁺ cells comes from the fact that the CD4⁺CD25^{high} population is difficult to distinguish from the CD4⁺CD25^{int} population (thought to contain activated T cells) because there is no clear and stereotyped cut-off between high and intermediate CD25 expression in humans (1, 2). In fact, our data show that changing the gat-

**Figure 6**

Cytokines secreted by the CD4⁺CD25^{high}CD127^{high}, CD4⁺CD25⁻, and CD4⁺CD25^{high}CD127^{low} populations in MS patients and HIs. (A) The supernatants from each well of the proliferation assays were removed 24 hours after the beginning of the incubation. The cytokines TNF- α , IFN- γ , and IL-2 were measured from 10 MS patients in the following 3 cell subsets: CD4⁺CD25^{high}CD127^{high}, CD4⁺CD25⁻, and CD4⁺CD25^{high}CD127^{low}. Mann-Whitney *U* tests were performed to compare the 3 cell subsets. (B) Comparison of cytokine production by CD4⁺CD25^{high}CD127^{high} T cells under CD3 polyclonal stimulation between MS patients (*n* = 4) and HIs (*n* = 4). Supernatants were removed 3 days after the beginning of the incubation. The results are the mean \pm SD from 4 patients and 4 healthy controls.

ing stringency when sorting these cells dramatically affects the suppressive capacity of the CD4⁺CD25^{high} T cells in the proliferation assay, probably by introducing activated T cells in the coculture assay. Using too low a stringency sorting threshold may thus result in an apparent defect in regulatory function in the CD4⁺CD25^{high} T cell subset in MS patients as in HIs, but not in the same proportion (see Figure 1C and Figure 2B for the difference obtained in percentage of suppression when using a 2% or a 4% gating stringency both in patients or controls). Indeed, the same cells obtained from MS patients using a more stringent sorting threshold did not present abnormal regulatory function. It is thus difficult to compare the results obtained in different studies when Tregs are purified based solely on their expression of CD4 and CD25.

Recently, CD127 has been shown to be negatively correlated with FOXP3 expression in CD4⁺CD25^{high} T cells, enabling improved sorting of viable Tregs (13, 14). Thus, we used anti-CD127 to discriminate the properties of CD127^{high}-depleted cells among the CD4⁺CD25^{high} T cell subset in MS patients and HIs and found that the suppressive function of the CD4⁺CD25^{high}CD127^{low} cells was similar between the 2 groups. Furthermore, 94% of the CD4⁺CD25^{high}CD127^{low} T cells expressed FOXP3 protein compared with 82% in CD4⁺CD25^{high} cells (*P* < 0.0001, Mann-Whitney *U* test; Figure 7), indicating that the cells sorted using the CD127 marker are a purer population than those obtained using only CD25. The comparable high FOXP3⁺ score in the CD127-depleted CD25^{high} cells and the comparable regulatory function observed

in MS patients and HIs also suggests that MS patients have no defect in their Tregs. Hence, when comparing the production of IFN- γ by CD4⁺CD25⁻ cells under polyclonal stimulation in the presence or absence of CD4⁺CD25^{high}CD127^{low} cells, a similar suppressive property was found for this Treg subset, confirming the data observed with the proliferation assays. This observation of a similar regulatory function between MS patients and HIs suggests that contaminating CD127^{high} T cells interfere in the suppression assays. The presence of activated CD127^{high} T cells within the CD4⁺CD25^{high} T cells of patients with MS could explain the discrepancy observed between the 2 groups despite a similar frequency of CD4⁺CD25^{high}CD127^{high} cells in MS patients and HIs. An enhanced proliferation of this T cell subset was observed compared with the proliferation of CD25⁻ cells, suggesting that this subpopulation may exhibit an abnormal activation state in MS patients. This would at least partly explain the defect in suppressive function observed with the CD4⁺CD25^{high} T cells. In addition, in our experiments the CD4⁺CD25^{high}CD127^{high} T cells exhibited a proinflammatory profile as measured by the levels of IL-2, IFN- γ , and TNF- α produced in the supernatants of the proliferation assays as compared with the responder CD4⁺CD25⁻ cell subset. Hence, when compared with HIs, this subset of cells from MS patients seemed to produce more proinflammatory cytokines (IFN- γ , TNF- α , and IL-2). The extent to which this increased production of T cell mitogenic cytokines (such as IL-2 and IFN- γ ; ref. 34) may play a role in the proliferation of the CD25⁻ T cell subset within the coculture system

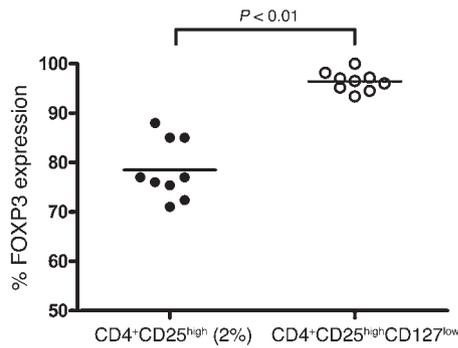


Figure 7

Comparison of FOXP3 expression in CD4⁺CD25^{high} T cells and CD4⁺CD25^{high}CD127^{low} cells. Intracellular FOXP3 staining was performed in 9 HIs. A significant difference was observed between the top 2% of sorted CD4⁺CD25^{high} and CD4⁺CD25^{high}CD127^{low} T cells ($P < 0.0001$, Mann-Whitney U test). The horizontal lines indicate the mean values for each group.

requires further investigation. Recently, CD4⁺CD25^{high}CD127^{high} cells have also been suggested to play a role in allograft rejection in humans. Grafts infiltrated by CD4⁺CD25^{high}CD127^{high} T cells contained allospecific CD4⁺ T cells and also secreted effector cytokines such as TNF- α and IFN- γ (35). Altogether, it is possible that this CD4⁺CD25^{high}CD127^{high} T cell subset plays a role in MS or other inflammatory processes. Our observations also indirectly corroborate the results of 3 recent studies on risk alleles associated with MS, which revealed an alteration of 2 genes, *IL2RA* and *IL7RA* (28–30). Recently, Venken and colleagues also used CD127 to discriminate memory and naive Tregs in MS patients (36). They still found a defective suppressive function of the Tregs in MS patients, even after a sorting strategy based on CD127^{low} cells. However, they also used the counterpart CD4⁺CD25^{high}CD127^{high} cells as responders. Our data suggest that these cells are different between MS patients and HIs, since we show here that CD4⁺CD25^{high}CD127^{high} cells may be hyperproliferative and produce more proinflammatory cytokines, also resulting in an apparent defect in regulation.

To conclude, using 2 different parameters (suppression of proliferation and cytokine production), our work suggests that the inhibitory function of the regulatory CD4⁺CD25^{high} T cell subset may not actually be altered in MS when contaminating CD127^{high} cells are removed. In addition, the counterpart CD4⁺CD25^{high}CD127^{high} T cell subpopulation in MS patients may proliferate more or produce more mitogenic cytokines, at least partly explaining the previous observation of a decreased suppressive property of CD4⁺CD25^{high} cells in MS patients. This CD4⁺CD25^{high}CD127^{high} T cell subset will be the subject of future investigations, since it might play a role in the inflammatory process observed in MS.

Methods

Patients. Thirty-four patients with definite MS according to the McDonald criteria (37) were enrolled in the study. All patients presented RR-MS and did not receive disease-modifying therapy (including corticosteroid boluses) for at least 3 months prior to testing. The patients were between the ages of 19 and 60 (mean, 35.9 \pm 9.5 years), and their Kurtzke Expanded Disability Status Scale (EDSS) scores (38) were between 0 and 6.5 (mean, 1.75 \pm 1.6). The disease duration ranged from 6 months to 17 years (mean, 4.5 \pm 4.9 years). MS patients 1–25 were used for suppression and proliferation experiments concerning the different T cell subsets studied, while MS patients 25–34 were used for experiments concerning cytokine production. The characteristics of all patients are available in Supplemental Table 1.

Twenty-five HIs, matched for age with MS patients, between the ages of 21 and 60 (mean, 34.5 \pm 8.7 years) and with no history of autoimmune diseases or recent infection episodes, were also enrolled in this study. All patients and HIs gave written informed consent prior to the study.

Isolation of CD4⁺CD25[−], CD4⁺CD25^{high}, CD4⁺CD25^{high}CD127^{low}, and CD4⁺CD25^{high}CD127^{high} T cell populations. PBMCs were isolated from 100 ml of EDTA whole blood by density centrifugation over Ficoll-Paque (Eurobio). Freshly-isolated cells (1.5×10^8) from each experiment were incubated for 20 minutes in PBS with 30 μ l FITC-conjugated anti-CD8, 30 μ l PE-conjugated anti-CD127, 20 μ l PE-Cy7-conjugated anti-CD3 (BD Biosciences), and 5 μ l Alexa Fluor 647-conjugated anti-CD25 (anti-CD25 from Immunotech coupled to the fluorochrome using a molecular probe kit from Invitrogen). Human CD4⁺CD25^{high}, CD4⁺CD25[−], CD4⁺CD25^{high}CD127^{low}, and CD4⁺CD25^{high}CD127^{high} T cells were then separated from PBMCs using a high-speed cell sorter (FACSAria; BD Biosciences). Purity was systematically greater than 98% for CD4⁺CD25[−] T cells and greater than 95% for CD4⁺CD25^{high}CD127^{low} cells. For sorting, parameters were set once and automatic compensations were performed using FACSDiva software (BD Biosciences). Because we performed anti-CD3 staining for the sorting procedure, we checked that this staining had no influence on further experiments. We compared the proliferation of CD4⁺CD25[−] and CD4⁺CD25^{high}CD127^{low} cells as well as their coculture when the sorting was performed with or without anti-CD3. We did not find any difference in terms of proliferation or suppression (data not shown).

Proliferation assay. All experiments were performed on fresh peripheral blood lymphocytes. To assess the functional activity of the different subsets of cells (CD4⁺CD25^{high} and CD4⁺CD25^{high}CD127^{low}), 2×10^4 responder cells (CD4⁺CD25[−] T cells) were cocultured for 5 days with 2×10^4 CD4⁺CD25^{high} cells or CD4⁺CD25^{high}CD127^{low} cells (ratio 1:1) and 1×10^5 autologous irradiated PBMCs in complete RPMI 1640 medium supplemented with HEPES, L-glutamine, penicillin, streptomycin, sodium pyruvate, nonessential aminoacids, and 10% human AB serum. All experiments were run in duplicate in 96-well plates bound with anti-CD3 (Orthoclone OKT3; Janssen-Cilag) at 1 μ g/ml as described previously (39). Anti-CD3 antibody was used as a polyclonal T cell stimulus. Cultures were incubated at 37 $^{\circ}$ C in a humidified atmosphere. After 5 days of culture, the cells were pulsed with 1 μ Ci per well of ³H-thymidine (Amersham Biosciences) for 16 hours. The cells were then harvested and counted in a scintillation counter. ³H-thymidine incorporation was measured as cpm. The percentage of suppression of the responding cell proliferation was determined as $1 - (\text{proliferation of coculture} / \text{proliferation of responder population alone}) \times 100$, where proliferation was expressed as cpm.

In order to compare the proliferation of each cell subpopulation and among individuals, and because of variability in proliferation from one patient to another, the proliferation of the T cell subsets (CD4⁺CD25^{high}, CD4⁺CD25^{high}CD127^{low}, and CD4⁺CD25^{high}CD127^{high}) was normalized to the proliferation of the CD4⁺CD25[−] subset in each patient or control. In each case, baseline proliferation in absolute cpm was checked, and several representative examples are provided. All data concerning the proliferation of each subpopulation of T cells for each patient and HI are available in Supplemental Figures 1–4.

Measurement of cytokine production. Cytokines (IL-2, TNF- α , and IFN- γ) were measured in supernatants taken from each well 24 hours after the initiation of coculture using a multiplex fluorescent bead immunoassay (Lincplex) together with a Luminex device. To assess the suppression of IL-2 and IFN- γ production by CD4⁺CD25[−] T cells, these cytokines were measured after 3 days in the cocultured supernatants of CD4⁺CD25^{high}CD127^{low} and



CD4⁺CD25⁻ responder cells (ratio 1:1) and 1×10^5 autologous irradiated PBMCs under the CD3 polyclonal stimulation as described above.

For comparison of cytokine production by CD4⁺CD25^{high}CD127^{high} T cells from patients and controls, CD4⁺CD25^{high}CD127^{high} T cells were cocultured with irradiated PBMCs as described above together with anti-CD3. Supernatants were removed 3 days after the beginning of the assay, and IFN- γ , TNF- α , and IL-2 were measured using the multiplex fluorescent bead immunoassay as above. For this experiment, 4 more patients and HIs were randomly included in the study according to the criteria set out in the patients section.

FACS analysis. PBMCs (10^6 per sample) were stained with PE-Cy7-conjugated anti-CD3, FITC-conjugated anti-CD8, PE-Cy5-conjugated anti-CD25, and PE-conjugated anti-CD127 (all from BD Biosciences), followed by intracellular staining with human FOXP3 (APC conjugate) staining assay kit (Imgenex).

Statistics. Statistical analyses were performed using GraphPad Prism 4.0. Parametric statistical analysis (mean and SEM) was performed using standard methods. Significant differences were calculated using the nonparametric Mann-Whitney *U* test, and linear regression analysis was performed using the Pearson correlation test. For all tests, *P* values of less than 0.05 were considered significant.

1. Baecher-Allan, C., and Hafler, D.A. 2006. Human regulatory T cells and their role in autoimmune disease. *Immunity*. **21**:203–216.
2. Tang, Q., and Bluestone, J.A. 2006. Regulatory T-cell physiology and application to treat autoimmunity. *Immunity*. **21**:217–237.
3. Asano, M., Toda, M., Sakaguchi, N., and Sakaguchi, S. 1996. Autoimmune disease as a consequence of developmental abnormality of a T cell subpopulation. *J. Exp. Med.* **184**:387–396.
4. Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M., and Toda, M. 1995. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor α -chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J. Immunol.* **155**:1151–1164.
5. Fontenot, J.D., Gavin, M.A., and Rudensky, A.Y. 2003. Foxp3 programs the development and function of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *Nat. Immunol.* **4**:330–336.
6. Khattri, R., Cox, T., Yasayko, S.A., and Ramsdell, F. 2003. An essential role for Scurfin in CD4⁺CD25⁺ T regulatory cells. *Nat. Immunol.* **4**:337–342.
7. Hori, S., Nomura, T., and Sakaguchi, S. 2003. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science*. **299**:1057–1061.
8. Allan, S.E., et al. 2005. The role of 2 FOXP3 isoforms in the generation of human CD4⁺ Tregs. *J. Clin. Invest.* **115**:3276–3284.
9. Morgan, M.E., et al. 2005. Expression of FOXP3 mRNA is not confined to CD4⁺CD25⁺ T regulatory cells in humans. *Hum. Immunol.* **66**:13–20.
10. Ziegler, S.F. 2007. FOXP3: not just for regulatory T cells anymore. *Eur. J. Immunol.* **37**:21–23.
11. Dieckmann, D., Plottner, H., Berchtold, S., Berger, T., and Schuler, G. 2001. Ex vivo isolation and characterization of CD4⁺CD25⁺ T cells with regulatory properties from human blood. *J. Exp. Med.* **193**:1303–1310.
12. Thornton, A.M., and Shevach, E.M. 2000. Suppressor effector function of CD4⁺CD25⁺ immunoregulatory T cells is antigen nonspecific. *J. Immunol.* **164**:183–190.
13. Seddiki, N., et al. 2006. Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells. *J. Exp. Med.* **203**:1693–1700.
14. Liu, W., et al. 2006. CD127 expression inversely corre-
- lates with FoxP3 and suppressive function of human CD4⁺ T reg cells. *J. Exp. Med.* **203**:1701–1711.
15. Hohlfeld, R., and Wekerle, H. 2004. Autoimmune concepts of multiple sclerosis as a basis for selective immunotherapy: from pipe dreams to (therapeutic) pipelines. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**(Suppl. 2):14599–14606.
16. Sospedra, M., and Martin, R. 2005. Immunology of multiple sclerosis. *Annu. Rev. Immunol.* **23**:683–747.
17. Hellings, N., et al. 2001. T-cell reactivity to multiple myelin antigens in multiple sclerosis patients and healthy controls. *J. Neurosci. Res.* **63**:290–302.
18. Putheti, P., Pettersson, A., Soderstrom, M., Link, H., and Huang, Y.M. 2004. Circulating CD4⁺CD25⁺ T regulatory cells are not altered in multiple sclerosis and unaffected by disease-modulating drugs. *J. Clin. Immunol.* **24**:155–161.
19. Haas, J., et al. 2005. Reduced suppressive effect of CD4⁺CD25^{high} regulatory T cells on the T cell immune response against myelin oligodendrocyte glycoprotein in patients with multiple sclerosis. *Eur. J. Immunol.* **35**:3343–3352.
20. Kumar, M., et al. 2006. CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ T lymphocytes fail to suppress myelin basic protein-induced proliferation in patients with multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.* **180**:178–184.
21. Vigiotta, 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.
22. Venken, K., et al. 2008. Compromised CD4⁺CD25^{high} regulatory T-cell function in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis is correlated with a reduced frequency of FOXP3-positive cells and reduced FOXP3 expression at the single-cell level. *Immunology*. **123**:79–89.
23. Huan, J., et al. 2005. Decreased FOXP3 levels in multiple sclerosis patients. *J. Neurosci. Res.* **81**:45–52.
24. Sakaguchi, S., et al. 2006. Foxp3⁺ CD25⁺ CD4⁺ natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease. *Immunity*. **21**:28–27.
25. Mazzucchelli, R., and Durum, S.K. 2007. Interleukin-7 receptor expression: intelligent design. *Nat. Rev. Immunol.* **7**:144–154.
26. Roncarolo, M.G., and Battaglia, M. 2007. Regulatory T-cell immunotherapy for tolerance to self antigens and alloantigens in humans. *Nat. Rev. Immunol.* **7**:585–598.
27. McFarland, H.F., and Martin, R. 2007. Multiple sclerosis: a complicated picture of autoimmunity. *Nat. Immunol.* **8**:913–919.
28. Hafler, D.A., et al. 2007. Risk alleles for multiple sclerosis identified by a genomewide study. *N. Engl. J. Med.* **357**:851–862.
29. Lundmark, F., et al. 2007. Variation in interleukin 7 receptor α chain (IL7R) influences risk of multiple sclerosis. *Nat. Genet.* **39**:1108–1113.
30. Gregory, S.G., et al. 2007. Interleukin 7 receptor α chain (IL7R) shows allelic and functional association with multiple sclerosis. *Nat. Genet.* **39**:1083–1091.
31. Baecher-Allan, C., Brown, J.A., Freeman, G.J., and Hafler, D.A. 2001. CD4⁺CD25^{high} regulatory cells in human peripheral blood. *J. Immunol.* **167**:1245–1253.
32. Baecher-Allan, C.M., and Hafler, D.A. 2005. Functional analysis of highly defined, FACS-isolated populations of human regulatory CD4⁺CD25⁺ T cells. *Clin. Immunol.* **117**:192; discussion 193.
33. Beissert, S., Schwarz, A., and Schwarz, T. 2006. Regulatory T cells. *J. Invest. Dermatol.* **126**:15–24.
34. Josien, R., et al. 1999. Recombinant IFN- γ abrogates allograft tolerance induced by donor-specific blood transfusion by restoring alloantibody production. *Eur. J. Immunol.* **29**:317–326.
35. Codarri, L., et al. 2007. Expansion and tissue infiltration of an allospecific CD4⁺CD25⁺CD45RO⁺IL-7R α ^{high} cell population in solid organ transplant recipients. *J. Exp. Med.* **204**:1533–1541.
36. Venken, K., et al. 2008. Natural naive CD4⁺CD25⁺CD127^{low} regulatory T cell (Treg) development and function are disturbed in multiple sclerosis patients: recovery of memory Treg homeostasis during disease progression. *J. Immunol.* **180**:6411–6420.
37. McDonald, W.I., et al. 2001. Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Ann. Neurol.* **50**:121–127.
38. Kurtzke, J.F. 1983. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology*. **33**:1444–1452.
39. Braudeau, C., et al. 2007. Variation in numbers of CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺ T cells with normal immunoregulatory properties in long-term graft outcome. *Transpl. Int.* **20**:845–855.

Acknowledgments

We would like to thank Joanna Ashton-Chess for her help in manuscript editing. This work was supported by a grant from the Collège des Enseignants de Neurologie et les Journées de Neurologie de Langue Française (to L. Michel) and a grant from the Association pour la Recherche sur la Sclérose en Plaques (to L. Berthelot).

Received for publication February 18, 2008, and accepted in revised form July 16, 2008.

Address correspondence to: Jean-Paul Soulillou, INSERM U643, 20 Bd J. Monnet, F-44093 Nantes Cedex, France. Phone: 33-2-40-08-74-10; Fax: 33-2-40-08-74-11; E-mail: Jean-Paul.Soulillou@univ-nantes.fr.

Sophie Brouard, Jean-Paul Soulillou, and David-Axel Laplaud are co-senior authors.

Laure Michel, Laureline Berthelot, and Ségolène Pettré contributed equally to this work.

ABBREVIATIONS :

- SEP : Sclérose En Plaques
- EAE : Encéphalite Auto-immune Expérimentale
- SP : Secondairement Progressif
- TLR : Toll-Like Receptor
- LT : Lymphocytes T
- LB : Lymphocytes B
- DC : Cellule Dendritique
- NK : Natural Killer
- Treg : Lymphocyte T régulateur
- Breg : Lymphocyte B régulateur
- VD : Vitamine D
- EBV : Epstein-Barr Virus
- KO : Knock-Out / KI : Knock-In
- SNC : Système nerveux Central
- LCR : Liquide Céphalo-Rachidien
- BHM : Barrière Hémato-Méningée
- CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité
- Igs : Immunoglobulines
- TCR : T Cell Receptor (Récepteur T)
- BCR : B Cell Receptor (Récepteur B)
- CG : Centre Germinatif
- Ag : Antigène
- TEC : Cellule Epithéliale Thymique
- TLSP : Lymphopoiétine Stromale Thymique
- CPA : Cellule Présentatrice d'Antigène

- IDO : Indoleamine Dioxygénase
- TIM : T Cell Immunoglobulin and Mucin Domain
- AICD : Activation Induced Cell Death (Mort cellulaire induite par l'activation)
- LPS : Lipopolysaccharide
- MOG : Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein
- MBP : Myelin Basic Protein
- PLP : Proteolipid Protein
- BAFF : B cell Activating Factor
- APRIL : A Proliferation Inducing ligand
- HSM : Hypermutation Somatique
- ODN : Oligodeoxynucléotide
- RAG : Recombinaison Activating Gene

INTRODUCTION	0
I- LA SCLEROSE EN PLAQUES	1
1- HISTORIQUE ET DEFINITIONS	1
2- EPIDEMIOLOGIE ET ETIOLOGIE DE LA SEP	2
2.1 Epidémiologie de la SEP.....	2
2.2 Facteurs génétiques	2
2.3 Facteurs environnementaux.....	3
3- LA SEP : UNE MALADIE AUTO-IMMUNE.....	6
3.1 Les modèles animaux.....	6
3.2 Les arguments neuropathologiques.....	7
3.3 Implication du système immunitaire.....	8
3.4 Les traitements de la SEP (Tableau 1).....	13
II- LA TOLERANCE IMMUNITAIRE.....	15
1- LA TOLERANCE IMMUNITAIRE B	15
1.1 La diversité du répertoire B.....	16
1.2 Les mécanismes de tolérance B.....	17
2- LA TOLERANCE IMMUNITAIRE T	26
2.1 La diversité du répertoire T.....	26
2.2 Les mécanismes de tolérance T.....	26
III- LES LYMPHOCYTES REGULATEURS.....	35
1- LES LYMPHOCYTES B REGULATEURS.....	35
1.1 Historique	35
1.2 Les lymphocytes B régulateurs dans les modèles animaux.....	36
1.3 Les Lymphocytes B régulateurs chez l'Homme	48
2- LES LYMPHOCYTES T REGULATEURS.....	51
2.1 Les différentes sous populations de LT régulateurs (Tableau 3).....	52
2.2 Les LT CD4 ⁺ Foxp3 ⁺ régulateurs naturels	53
IV- LYMPHOCYTES REGULATEURS ET SCLEROSE EN PLAQUES.....	68
1- LYMPHOCYTES B REGULATEURS ET SEP	68
1.1 Implication des LB régulateurs dans l'EAE.....	68
1.2 Implication des LB régulateurs dans la SEP.....	70
1.3 Traitements et LB régulateurs dans la SEP.....	71
2- LYMPHOCYTES T REGULATEURS ET SEP	73

2.1 Implication des LT régulateurs naturels CD4 ⁺ Foxp3 ⁺ dans l' EAE	73
2-2 Implication des LT régulateurs naturels CD4 ⁺ Foxp3 ⁺ dans la SEP	77
2-3 Traitements et LT régulateurs naturels CD4 ⁺ Foxp3 ⁺ dans la SEP.....	80
OBJECTIFS.....	82
RESULTATS	84
I- ARTICLE 1: PATIENTS WITH RELAPSING-REMITTING MULTIPLE SCLEROSIS HAVE NORMAL TREG FUNCTION WHEN CELLS EXPRESSING IL-7 RECEPTOR A-CHAIN ARE EXCLUDED FROM THE ANALYSIS	85
II- ARTICLE 2: PATIENTS WITH MULTIPLE SCLEROSIS PRESENT AN UNALTERED REGULATORY B CELL FREQUENCY, PHENOTYPE AND FUNCTION	96
III- REVUE : MULTIPLE SCLEROSIS AND IMMUNE REGULATION.....	122
DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....	152
I- DISCUSSION.....	153
II. PERSPECTIVES	160
REFERENCES.....	163
ANNEXE	192

INTRODUCTION

I- La sclérose en plaques

1- Historique et définitions

La première description clinique de sclérose en plaques a été publiée dans le journal intime de Sir Auguste D'Este, petit fils du Roi Georges III. Il rapporte en effet très précisément en 1822 sa première poussée clinique : une névrite optique rétro bulbaire bilatérale. Plus de 10 ans après, Sir Robert Carswell et Jean Cruveilhier, neuropathologistes, rapportèrent les premières descriptions anatomopathologiques de la maladie. Mais c'est le Dr Jean Martin Charcot qui en 1868 donne à la maladie son entité nosographique.

Depuis, presque 200 ans se sont écoulés, et malgré de considérables progrès dans l'approche diagnostique et thérapeutique, la physiopathologie de cette maladie reste encore énigmatique. La sclérose en plaques (SEP) est une maladie chronique inflammatoire démyélinisante du système nerveux central (SNC). Une personne sur 1000 en France est atteinte par cette pathologie, les symptômes débutant habituellement entre 20 et 40 ans (Fromont et al., 2010). Les femmes sont plus atteintes que les hommes avec un sex-ratio de 2.6/1 (Fromont et al., 2010). Cette maladie est considérée actuellement comme une pathologie auto-immune et se caractérise par l'apparition de lésions démyélinisantes au sein de la substance blanche du SNC. Cette démyélinisation est à l'origine de la formation de blocs de conduction responsables d'une altération de la transmission de l'influx nerveux. Elle peut aussi, quand elle se chronicise, entraîner une dégénérescence axonale. Les symptômes, très variables sont causés par ces troubles de la conduction nerveuse et correspondent en règle générale à des pertes de fonctions motrices, sensibles, visuelles voire cognitives.

Le diagnostic peut être établi si le patient présente les critères de dissémination temporelle et spatiale représentés par les critères de McDonald (Lublin, 2005; Polman et al., 2005; Polman et al., 2011). Actuellement, aucun test biologique ou radiologique ne permet de confirmer de façon certaine le diagnostic. Celui-ci repose sur un ensemble d'arguments cliniques et radiologiques.

La SEP peut se présenter sous quatre formes différentes selon la classification de Lublin et Reingold (Lublin and Reingold, 1996). La forme rémittente représente 85% des cas en début de maladie et se caractérise par la survenue répétée de poussées suivie de rémissions. Les formes rémittentes de SEP sont suivies d'une évolution vers une forme secondairement progressive (SP) pour 50% des malades en 15 ans et 90% des malades en 25 ans (Confavreux

et al., 2000). Le début de la forme progressive se caractérise par l'aggravation progressive de symptômes sur une période d'au moins 6 mois, avec ou sans poussées surajoutées. Une fois que la progression a débuté, son évolution est en général continue. La forme progressive primaire touche environ 15% des patients, et débute habituellement plus tardivement. Elle associe une progression permanente et lente des symptômes sur laquelle peuvent ou non se superposer des poussées.

2- Epidémiologie et étiologie de la SEP

2.1 Epidémiologie de la SEP

La distribution de la sclérose en plaques est très hétérogène, que ce soit entre pays mais également d'une région à l'autre au sein d'un même pays. Cette hétérogénéité semble être corrélée à la latitude, avec un gradient croissant sud-nord dans l'hémisphère nord (Kurtzke, 1975). Les prévalences les plus élevées se retrouvent ainsi en Europe du Nord (de 145 à 193/100 000 en Ecosse, 132/100 000 à Oslo en Norvège), et en Amérique du Nord (jusqu'à 196/100 000 à Barrhead au Canada) (Rosati, 2001). Cependant, la comparaison des prévalences est rendue difficile par les différences de méthodologies utilisées, et reste sujet à débat (Fromont et al., 2010). La France est considérée comme une zone de prévalence de la SEP moyenne à élevée, avec une prévalence moyenne de 95/100 000 et une incidence estimée entre 7.6 et 8.8 pour 100 000 habitants (Kurtzke and Delasnerie-Laupretre, 1996; Vukusic et al., 2007).

2.2 Facteurs génétiques

Cette hétérogénéité géographique semble être liée en partie à des facteurs génétiques. Ainsi, la rareté de la maladie chez les chinois, les japonais, les noirs africains et les amérindiens, ainsi que l'incidence élevée chez les sardes ou les palestiniens indiquent clairement qu'il existe des susceptibilités différentes d'une ethnie à l'autre (Ramagopalan et al., 2010). De plus, l'étude de jumeaux monozygotes montre une augmentation significative du risque de développer la maladie en comparaison aux jumeaux dizygotes (Oksenberg and Baranzini, 2010). Ce risque a été estimé, en fonction des études, entre 25 et 76% contre 5% pour les jumeaux dizygotes et 2% pour un apparenté au premier degré (Carton et al., 1997;

Ebers et al., 1995; Ebers et al., 2000; Hemminki et al., 2009; Oksenberg and Baranzini, 2010; Sadovnick et al., 1993; Sadovnick et al., 1996; Willer et al., 2003).

Cette prédisposition génétique associée à la maladie a conduit à une recherche intense de gènes de susceptibilité. Ainsi, de nombreuses études de génétiques ont validé l'association entre la SEP et les variants polymorphiques du Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH), et plus particulièrement l'allèle HLA-DRB1*1501 (Haines et al., 1998; Oksenberg and Hauser, 2005; Olerup et al., 1995). Plus récemment, plusieurs études d'association pan génomique ont été réalisées chez des patients atteints de SEP (ANZgene, 2009; Baranzini et al., 2009; Hafler et al., 2007; Oksenberg and Baranzini, 2010; Sawcer et al., 2011). Ces études ont toutes identifié HLA-DRB1 comme facteur de susceptibilité de la maladie avec une très forte significativité. Elles ont de plus permis d'identifier une vingtaine de nouveaux loci affectant la susceptibilité à la maladie. Ainsi, des allèles des chaînes α des récepteurs de l'IL-2, de l'IL-7 ou de CD58 (LFA3) ont été déterminés comme gènes de susceptibilité pour la SEP (Hafler et al., 2007; Lundmark et al., 2007a; Sawcer et al., 2011). Ces études ont également permis d'identifier des variations dans le gène HLA-A qui seraient responsables d'un effet protecteur indépendant (Sawcer et al., 2011).

Les données des études épidémiologiques confirment que les variations génétiques sont un déterminant important de la susceptibilité à la SEP. Les gènes de la région HLA représentent sans conteste le risque le plus élevé (Odds Ratio entre 4 et 5), les autres gènes identifiés contribuent plus modestement à cette susceptibilité (Odds Ratio entre 1.2 et 1.5). Cependant, d'autres facteurs interagissent avec ce terrain génétique dans le développement de la maladie.

2.3 Facteurs environnementaux

Malgré ces influences génétiques, les interactions avec l'environnement ont probablement un impact considérable sur la susceptibilité de développer la SEP. Ce rôle environnemental est renforcé par les études de migration. Ainsi, en Australie, les communautés d'origine anglo-saxonne ayant immigré voient leur risque de développer une SEP diminuer de moitié (Compston, 1990). De plus, le transfert de risque semble dépendre de l'âge de départ. Ainsi, les individus migrant après l'âge de 15 ans conservent le risque de la région d'origine alors que ceux migrant avant l'âge de 15 ans acquièrent le risque de la région d'arrivée, comme si un événement décisif se produisait durant le début de l'adolescence (plusieurs années avant le début clinique de la maladie) (Alter et al., 1966; Hammond et al.,

2000; Kurtzke and Heltberg, 2001). Le cas des îles Féroë plaide aussi pour une origine environnementale : en effet, c'est à l'occasion de l'occupation de ces îles par des troupes britanniques pendant la seconde guerre mondiale, qu'une épidémie de cas de SEP (21 cas) s'est développée, suivie dans les années suivantes par 3 autres épidémies (Kurtzke and Hyllested, 1987).

Plusieurs facteurs de risque environnementaux ont été étudiés, les facteurs les plus fortement impliqués étant l'infection à Epstein Barr Virus (EBV), l'exposition à la Vitamine D (VD) et l'usage de tabac (Ramagopalan et al., 2010).

1. EBV et SEP

De nombreuses équipes se sont ainsi intéressées à l'association entre EBV et SEP. La présence quasi constante (> 99%) d'anticorps anti-EBV chez les patients atteints de SEP, et les signes de réactivation de ce virus chez les patients sont des preuves indirectes du rôle probable de ce facteur infectieux dans la pathogénie de la SEP (Salvetti et al., 2009). De plus, les individus avec des titres élevés d'anticorps anti-EBV ont un risque plus élevé de développer la SEP que ceux avec des titres bas (Levin et al., 2005). Et l'augmentation de ces taux d'anticorps précède de plusieurs années le développement de la maladie (Levin et al., 2005). Plus récemment, des Lymphocytes B (LB) infectés par l'EBV ont été mis en évidence dans le cerveau de patients atteints de la maladie, et des signes de réactivation virale retrouvés au sein des lésions aiguës (Serafini et al., 2007). Il faut toutefois noter que ces résultats ont été remis en cause depuis (Willis et al., 2009) puis retrouvés dans une autre étude (Tzartos et al., 2012). Mais est-ce que l'EBV a un véritable rôle dans l'initiation et le développement de la SEP ? Ou est-ce juste un épiphénomène, reflet du « désordre » immunitaire ?

Une des hypothèses physiopathologiques repose sur la théorie du mimétisme moléculaire (Lucas et al., 2011). En effet, des Lymphocytes T (LT) reconnaissant des antigènes de l'EBV « cross » réagiraient avec des antigènes du SNC (Wucherpfennig and Strominger, 1995). Ainsi 3 à 4% des LT CD4⁺ anti EBNA1 de patients et de témoins sont capables de reconnaître des peptides de la myéline (Lunemann et al., 2008). Un travail en cristallographie a d'ailleurs montré comment le TCR d'un clone anti-MBP (Myelin Basic Protein) pouvait reconnaître un peptide EBV en fonction de la présentation par l'une ou l'autre des protéines du CMH-II (Lang et al., 2002). Il est cependant probable que ce mécanisme soit mineur dans la physiopathologie de la maladie.

Une autre hypothèse repose sur le fait que l'infection à EBV induirait l'expression d' $\alpha\beta$ -crystalline (« heat shock protein ») par les LB (van Sechel et al., 1999). Cette protéine est très

peu exprimée dans les tissus et le thymus et donc aucune tolérance immunitaire n'a pu se développer. L'expression de cette protéine génèrerait ainsi une réponse $CD4^+$, et une attaque des oligodendrocytes qui l'expriment (van Noort et al., 2000). L'infection par EBV entraîne de plus la sécrétion d'IL-10 virale. Cet homologue de l'IL-10 humaine entre en compétition pour les récepteurs de l'IL-10, mais sans entraîner les mêmes effets anti inflammatoires (Hayes and Donald Acheson, 2008). Enfin, une dernière hypothèse a été émise et concerne le développement des maladies auto immunes en général (Lucas et al., 2011). Elle propose que, suite à une diminution de la réponse des LT $CD8^+$ contre l'EBV, celui-ci infecte des LB auto-réactifs en périphérie. Ces LB prolifèrent alors et migrent au sein de leur organe cible, où ils vont produire des auto-anticorps et présenter des antigènes à des LT auto-réactifs (Pender, 2003; Pender, 2012). Cette hypothèse a été renforcée par la description récente (mais controversée) de LB infectés à l'EBV au sein du SNC de patients atteints de SEP (Serafini et al., 2007), mais également par la description dans deux études d'une dérégulation de la réponse $CD8^+$ contre des peptides de l'EBV (Jilek et al., 2012; Pender et al., 2009). Il existe donc des arguments forts pour impliquer ce virus dans la physiopathologie de la maladie.

2. Vitamine D et SEP

Des arguments indirects plaident en faveur d'un rôle de la vitamine D (VD) dans la physiopathologie de la SEP (Ascherio and Munger, 2010) : (1) La prévalence de la SEP augmente avec la latitude (et est donc inversement corrélée avec la durée et l'intensité des UVB). (2) Il existe une prévalence plus basse de la maladie dans des régions aux latitudes élevées chez les individus consommant des poissons gras riches en VD. (3) Des études ont identifié une diminution du risque de SEP dans les populations migrant de hautes à basses latitudes.

De nombreuses études s'intéressent depuis aux taux et aux apports de VD chez les patients atteints de SEP. Ainsi, des taux sériques bas d'hydroxyvitamine D seraient corrélés à un risque augmenté de développer une SEP et inversement (Munger et al., 2006; Raghuvanshi et al., 2008). Une étude prospective réalisée chez 200 000 femmes américaines a également montré que l'incidence de la SEP diminuait significativement avec un régime alimentaire riche en VD (Munger et al., 2004). Ces résultats restent cependant controversés (Ghadirian et al., 1998; van der Mei et al., 2003). Des études récentes ont également rapporté une protection dans le risque de développer la SEP, chez les individus s'exposant au soleil (Islam et al., 2007; Kampman et al., 2007; van der Mei et al., 2003).

En parallèle, des taux bas de VD ont aussi été corrélés avec le risque de poussées dans plusieurs études (Auer et al., 2000; Embry et al., 2000; Soilu-Hanninen et al., 2008; Tremlett et al., 2008). C'est dans ce cadre que deux essais de tolérance ont déjà démontré que la supplémentation en VD, en plus d'être bien tolérée, permettait une réduction de l'inflammation clinique et radiologique chez les patients atteints de SEP (Kimball et al., 2007; Wingerchuk et al., 2005). Actuellement, un essai de phase 3 randomisé vs placebo est en cours et teste les effets de la VD en « add on therapy » chez les patients traités par Rebif® (Merck serono), traitement immunomodulateur de la SEP de forme rémittente. Les mécanismes d'action exacts de la VD ne sont pas connus. Cependant, après supplémentation, une augmentation du nombre de LT CD4⁺ IL-10⁺ a été observé chez 14 patients atteints de SEP de forme rémittente (Smolders et al., 2010), alors que la fréquence des LT régulateurs naturels (nTregs) n'était pas modifiée. Cependant, une association positive a été retrouvée entre les taux sanguins de 25 hydroxyvitamine D et la capacité suppressive des nTregs (Smolders et al., 2009).

3. Tabac et SEP

Le tabac a également été impliqué dans le développement de la maladie (Hawkes, 2007; Hedstrom et al., 2009; Hernan et al., 2001). Ainsi, une méta analyse rétrospective a mis en évidence un Odds Ratio de 1.51 de développer la SEP pour les individus ayant fumé en comparaison à ceux n'ayant jamais fumé (Hawkes, 2007). Les explications physiopathologiques restent à ce jour mal déterminées.

Les variations géographiques de la prévalence et de l'incidence de la sclérose en plaques restent encore mal comprises. Il apparaît cependant clairement que les facteurs environnementaux et génétiques ne peuvent être dissociés, et s'associent pour déclencher la maladie.

3- La SEP : une maladie auto-immune

3.1 Les modèles animaux

Afin de mieux comprendre les mécanismes physiopathologiques sous-tendant cette maladie, les modèles animaux apparaissent indispensables, même si, à ce jour, ils restent un

reflet très imparfait de la maladie humaine. Plusieurs modèles d'Encéphalite Auto-immune Expérimentale (EAE) ont pu être mis au point chez l'animal, par injection d'auto-antigènes de la myéline (EAE « active ») ou de lymphocytes T auto-réactifs contre ces antigènes extraits d'animaux immunisés (EAE « passive ») (Lassmann, 2007).

Le premier modèle a été créé chez le singe par Thomas Rivers en 1933. En effet, des singes immunisés avec des extraits de cerveau de lapin développent une encéphalomyélite. Depuis, de nombreux modèles ont été développés : chez la souris, le rat, le mouton, le chien et de nombreuses autres espèces (Baxter, 2007). Ces modèles ont ainsi permis de mettre en évidence l'implication des LT auto-réactifs notamment les CD4⁺ Th1 et Th17 dans les phénomènes de démyélinisation (Lassmann, 2007). Mais à ce jour, aucun des modèles d'EAE ne mime à lui seul toutes les caractéristiques de la sclérose en plaques. Selon les souches animales et le mode d'induction, l'encéphalomyélite présente une démyélinisation, une symptomatologie et une évolution très variable (Lassmann, 2007). Cependant, malgré les nombreuses imperfections de ces modèles, ils permettent depuis maintenant plus de 50 ans, de décrypter certains mécanismes cellulaires lésionnels de l'auto-immunité et de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques chez l'homme (Acétate de glatiramère, natalizumab et plus récemment fingolimod).

3.2 Les arguments neuropathologiques

La SEP se caractérise sur le plan histopathologique par des lésions démyélinisantes focales plus ou moins accompagnées de lésions axonales. Les sites de prédilection de ces lésions sont le nerf optique, les zones sous-ventriculaires, les zones corticales sous-piales, le tronc cérébral et la moelle épinière cervicale (Bo et al., 2003). En 2000, une analyse histopathologique de biopsies cérébrales de patients en début de maladie a permis de mettre en évidence une hétérogénéité de ces lésions entre patients (Lucchinetti et al., 2000). Quatre types de lésions ont ainsi été décrits au sein des zones de démyélinisation active. Cette classification se basait sur la présence d'immunoglobulines (Igs), de complément ou d'une atteinte oligodendrocytaire primitive (avec ou sans perte de protéines de la myéline). Cette hétérogénéité lésionnelle semblait donc refléter des différences dans les mécanismes de démyélinisation selon les patients.

Cependant, dans une autre cohorte de patients, aussi en début de maladie, il a été retrouvé essentiellement des signes d'activation du complément accompagnés d'une apoptose

oligodendrocytaire massive (Barnett and Prineas, 2004). Dans ces deux études, les patients inclus présentaient des formes aiguës et particulièrement agressives de SEP.

En 2008, Breij *et al* se sont intéressés à l'analyse histopathologique de lésions cérébrales issues d'autopsies de patients ayant une SEP établie depuis plusieurs années (Breij *et al.*, 2008). Dans cette étude, l'analyse immunopathologique a mis en évidence des lésions homogènes entre les patients, consistant essentiellement en la présence de complément, d'anticorps et de macrophages. La phagocytose de myéline par les macrophages apparaît donc, au stade de maladie établie, dépendante surtout des anticorps et de l'activation du complément. Au même moment, plusieurs études ont rapporté, pour la première fois, la présence de follicules lymphoïdes B au sein des méninges chez environ 40% des patients atteints de forme secondairement progressive (Howell *et al.*, 2011; Magliozzi *et al.*, 2007; Serafini *et al.*, 2004). La présence de ces follicules est associée à des lésions corticales sous-piales (adjacentes) et à un gradient de perte neuronale (Magliozzi *et al.*, 2010). Ces follicules sont retrouvés chez les patients présentant un handicap plus sévère (Magliozzi *et al.*, 2007). Il a été montré par cette même équipe que ces follicules représentaient un site de réactivation de l'EBV (Serafini *et al.*, 2007), mais ces données n'ont pas été reproduites (Willis *et al.*, 2009) ou imparfaitement (Tzartos *et al.*, 2012). Ces travaux renforcent cependant l'importance des cellules B dans les mécanismes physiopathologiques de la maladie. Récemment, une équipe française s'est intéressée aux lésions de la moelle épinière chez des patients présentant une forme progressive de la maladie. Ils ont ainsi retrouvé des signes d'inflammation méningée lymphocytaire T associée à une perte axonale diffuse (Androdias *et al.*, 2010).

Il semblerait donc que chez les patients ayant une forme progressive, les méninges forment une niche immunologique au sein desquelles les LT et les LB peuvent s'activer et proliférer, autonomisant ainsi la réaction auto-immune et pouvant expliquer l'absence de réponse thérapeutique au stade secondairement progressif de la maladie.

3.3 Implication du système immunitaire

La SEP se caractérise donc par des foyers de démyélinisation, s'accompagnant d'un infiltrat de cellules du système immunitaire (Sospedra and Martin, 2005). Pendant les premières phases de la formation des lésions, des LT $CD4^+$, $CD8^+$ ainsi que des macrophages sont recrutés au sein de la substance blanche du SNC. Les antigènes reconnus par les LT sont actuellement inconnus et probablement différents d'un patient à l'autre. Cependant, il est probable que les antigènes reconnus appartiennent aux peptides de la myéline (Sospedra and

Martin, 2005). Tous les composants du système immunitaire, inné ou adaptatif, ont été impliqués dans la physiopathologie de la SEP. La succession d'événements aboutissants à cette cascade auto-immune reste peu claire, même si l'hypothèse du mimétisme moléculaire entre l'EBV et des peptides de la myéline reste privilégiée pour expliquer l'activation de LT auto-réactifs (Sospedra and Martin, 2005).

Dans la partie suivante, je vais résumer les différents arguments impliquant les cellules du système immunitaire dans les mécanismes lésionnels de la SEP. Du fait de la complexité de la maladie et de l'abondance de la littérature dans ce domaine, je ne résumerai que les principales études réalisées.

1. Les lymphocytes T CD4⁺ Th1

La sclérose en plaques a longtemps été considérée comme une maladie auto-immune essentiellement dépendante des lymphocytes T CD4⁺ de type Th1. En effet, des études sur le modèle animal de la SEP, l'EAE, ont permis de démontrer que les lymphocytes T autoréactifs - surtout CD4⁺ - jouaient un rôle prédominant dans la maladie. En effet, le transfert passif de T CD4⁺ engagés contre des composants de la myéline induit l'EAE chez des receveurs sains (Ben-Nun et al., 1981). Leur implication a aussi été renforcée par le fait que certaines molécules du Complexe Majeur d' Histocompatibilité (CMH) de classe II aient été démontrées comme prédisposant au développement de la maladie (Lincoln et al., 2005; Sawcer et al., 2011). Des efforts considérables ont été faits afin d'essayer d'identifier l'antigène reconnu dans la SEP. Ainsi, des LT CD4⁺ reconnaissant des épitopes de la myéline ont été identifiés dans le sang des patients (Sospedra and Martin, 2005). Au niveau des lésions, plusieurs études ont même montré la présence de clones T anti-MBP (Montes et al., 2009; Oksenberg et al., 1993). Cependant, ces travaux, s'ils montrent la présence de cellules capables de reconnaître des peptides de la myéline au sein du cerveau de patients SEP, n'apportent aucun renseignement sur leur fonction et sur leur fréquence *in situ*. En périphérie, la présence de LT auto-réactifs CD4⁺ ou CD8⁺ est retrouvée autant chez les témoins sains que chez les patients (Berthelot et al., 2008). Une hypothèse quant au déclenchement de la maladie serait l'augmentation de la fréquence de ces LT auto-réactifs en périphérie chez les patients. Cependant, l'augmentation de cette fréquence chez les patients par rapport aux individus sains reste toujours un sujet de débat (Elong Ngonu A., 2012). Une autre possibilité soulevée par l'équipe de D. Hafler serait une activation différente des clones T anti-myéline chez les patients par rapport aux témoins (Zhang et al., 1992). Quoi qu'il en soit, plusieurs traitements visant à éliminer spécifiquement les LT CD4⁺Th1 ont été développés. Ils n'ont

pas permis d'améliorer les symptômes des patients, voire ont entraîné une exacerbation de la maladie jetant ainsi un peu plus de trouble sur l'implication réelle de ces cellules dans la physiopathogénie des lésions de SEP (Kappos et al., 2000; Loftus et al., 2009; Segal et al., 2008; van Oosten et al., 1997; Viglietta et al., 2008).

2. Les lymphocytes T CD4⁺ Th17

Beaucoup d'arguments maintenant indiquent que des LT CD4⁺ sécrétant de l'IL-17 sont fortement impliqués dans la physiopathologie de la SEP. Les LT naïfs CD4⁺ exposés à de l'IL-6, du TGFβ, et de l'IL-21 se différencient en LT Th17 (Kimura et al., 2007). En 1995, l'injection d'un anticorps neutralisant anti-IL-6 a permis de réduire les symptômes de la maladie dans un modèle murin d'EAE (Gijbels et al., 1995). De plus, des souris Knock-Out (KO) pour CCR6, un récepteur de chémokine caractéristique des LT Th17, sont résistantes à l'induction d'une EAE (Reboldi et al., 2009). Dans cette même étude, il a été montré qu'au moment de l'initiation de la maladie, les cellules Th17 sont capables d'entrer dans le SNC par l'intermédiaire des plexus choroïdes qui expriment de manière constitutive le ligand de CCR6 (CCL20) (Reboldi et al., 2009). Chez l'homme, une immunoréactivité anti-IL-17 a été identifiée sur 79% des LT au sein des lésions aiguës de SEP (Tzartos et al., 2008). De plus, les cellules endothéliales de la barrière hémato-méningée issues de lésions cérébrales de patients expriment des taux élevés de récepteurs à IL-17 et le relargage de cette cytokine par les LT Th17 augmente significativement la perméabilité de la barrière hémato-méningée (BHM) (Kebir et al., 2007). En périphérie, une augmentation des taux d'IL-17 a également été retrouvée chez les patients en poussée (Durelli et al., 2009). Toutes ces données suggèrent donc un rôle important de ces LT Th17 dans l'inflammation du SNC (Kasper and Shoemaker, 2010). Cependant le blocage de la voie Th17 par un anticorps anti-p40 (sous unité de l'IL23 nécessaire à la génération de lymphocytes Th17) n'a montré aucune efficacité sur un plan clinico-radiologique soulevant encore de nombreuses questions sur l'impact réel de ces cellules dans la génération des lésions (Segal et al., 2008).

3. Les lymphocytes T CD4⁺ Foxp3⁺

Une autre catégorie de LT CD4⁺ a également fait l'objet d'intenses recherches dans la SEP : les LT régulateurs naturels CD4⁺CD25^{hi}Foxp3⁺. Je ne détaillerai pas ici le rôle de ces cellules car cela fait l'objet d'un chapitre complet par la suite.

4. Les lymphocytes T CD8⁺

On sait maintenant que les lymphocytes T CD8⁺ jouent probablement un rôle majeur dans le processus lésionnel en lui-même. Ainsi en 2001, Huseby *et al* ont démontré que le transfert adoptif de LT CD8⁺ spécifiques de la MBP et restreintes à une molécule de CMH-I induisait une EAE chez des souris présentant des caractéristiques retrouvées dans la maladie humaine (Huseby *et al.*, 2001). Depuis, plusieurs modèles d'EAE dépendant des LT CD8⁺ ont été développés (Ford and Evavold, 2005; Saxena *et al.*, 2008; Sun *et al.*, 2001). Ces études ont permis de montrer que les LT CD8⁺ auto-réactifs peuvent déclencher des lésions et contribuent donc probablement à la physiopathologie de la maladie. Chez l'homme, ces cellules sont retrouvées de manière nettement majoritaire au sein des lésions aiguës de SEP (Babbe *et al.*, 2000; Frischer *et al.*, 2009; Hauser *et al.*, 1986; Junker *et al.*, 2007). Et, dans plusieurs études, des expansions oligoclonales de lymphocytes T CD8⁺ ont été mises en évidence au sein des lésions aiguës, chroniques, dans la substance blanche d'apparence normale et dans le sang de patients atteints de SEP (Babbe *et al.*, 2000; Junker *et al.*, 2007; Laplaud *et al.*, 2004). De plus, la plupart des cellules du SNC sont capables d'exprimer des molécules du CMH-I dans des conditions inflammatoires, et peuvent donc devenir des cibles pour les LT CD8⁺ activés (Gobin *et al.*, 2001; Hayashi *et al.*, 1988; Ransohoff and Estes, 1991). Ainsi les neurones peuvent exprimer le CMH-I et être directement lysés par les cellules CD8⁺ par un mécanisme dépendant des molécules Fas/Fas Ligand (Neumann *et al.*, 2002). Une récente étude a également suggéré l'implication de LT CD8⁺ produisant de l'IL-17 (Tc17) dans la pathogénie de la maladie (Tzartos *et al.*, 2008). Les auteurs ont en effet observé que la majorité des LT CD4⁺ et CD8⁺ infiltrant les espaces périvasculaires des lésions actives de SEP sécrétaient de l'IL-17. De plus, Annibali *et al* ont identifié des LT CD8⁺ exprimant un récepteur des cellules Natural Killer (NK) : CD161. Ces cellules sont d'un type particulier s'apparentant aux NKT puisqu'elles possèdent un TCR semi-invariant composé d'un V α 7.2 invariant et d'un V β variable. Il s'agit de *Mucosal Associated Invariant T cells* (MAIT cells) dont l'implication dans la physiopathologie de la maladie fait l'objet de recherches intenses actuellement. Ces cellules contiennent la majorité des LT CD8⁺ IL-17⁺ (Annibali *et al.*, 2011). Enfin, des études génétiques d'association ont mis en évidence un rôle indépendant de certains allèles de CMH-I dans la susceptibilité à la SEP (Fugger *et al.*, 2009). Toutes ces données laissent peu de doute quant au rôle majeur joué par les lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ dans l'induction de la maladie. D'autres cellules du système immunitaire sont également impliquées dans les processus lésionnels.

5. Les Lymphocytes B

Depuis quelques années, un intérêt grandissant est porté au rôle des lymphocytes B dans la SEP. Ces cellules ont des mécanismes d'actions variés. Ainsi, en plus de sécréter des anticorps, elles ont la capacité de présenter des antigènes aux LT (Kasper and Shoemaker, 2010; Townsend et al., 2010), de sécréter des cytokines pro- ou anti-inflammatoires (Duddy et al., 2004), mais également de former des follicules lymphoïdes ectopiques (Magliozzi et al., 2007; Takemura et al., 2001). Plusieurs arguments plaident en faveur d'un rôle important de ces cellules dans les mécanismes physiopathologiques de la SEP. En effet, plus de 90% des patients présentent une synthèse intra thécale d'Igs dans leur Liquide Céphalo Rachidien (LCR) (Archelos et al., 2000; Freedman et al., 2005). De plus, Magliozzi *et al* ont identifié la présence de follicules B méningés chez 40% des patients atteints de forme SP (Magliozzi et al., 2007). Enfin, deux essais cliniques ont démontré que la déplétion des LB à l'aide d'anticorps monoclonaux anti-CD20 entraînait une amélioration significative de l'inflammation clinique et radiologique dans la forme rémittente de SEP (Hauser et al., 2008; Kappos et al., 2011). A ce jour, comme pour les LT, la fréquence des auto-anticorps périphériques reconnaissant des protéines de la myéline chez les patients atteints de SEP reste sujet à débat (Berger et al., 2003; Lampasona et al., 2004; O'Connor et al., 2007a; Reindl et al., 1999; Zhou et al., 2006). Les études sur la spécificité antigénique des Igs du LCR sont, elles aussi, contradictoires (Lambracht-Washington et al., 2007; Owens et al., 2009; von Budingen et al., 2008). Dans une étude récente, les auteurs ont ainsi cloné 53 anticorps recombinants monoclonaux à partir de clones plasmocytaires issus du LCR de patients. Leur réactivité a été testée contre différentes protéines de la myéline et aucune positivité n'a pu être détectée (Owens et al., 2009). Dans un travail encore plus récent, une réactivité des anticorps sériques de patients SEP a été démontrée vis-à-vis de structures présentes sur les axones et/ou les gaines de myéline (Elliott et al., 2012). Enfin, il y a quelques mois, un antigène reconnu de façon spécifique par des Igs G issus du sérum de patients SEP a été identifié, il s'agit d'un canal potassique Kir4.1 exprimé de manière spécifique par les cellules gliales (Srivastava et al., 2012).

Une autre fonction des LB est leur capacité à présenter des antigènes aux LT. En 2010, il a été ainsi montré pour la première fois que les LB mémoires de patients étaient capables de présenter des antigènes de la myéline et d'entraîner une prolifération et une sécrétion d'IFN γ par les LT (Harp et al., 2010). Enfin, depuis peu, une fonction régulatrice des LB a été mise en évidence, tout d'abord chez l'animal, mais aussi chez l'homme. Cette fonction sera abordée dans un chapitre suivant.

6. Le système immunitaire inné

Le système immunitaire inné présente deux fonctions principales. Il est la première ligne de défense contre les infections, mais il est également capable de stimuler et de moduler les cellules du système immunitaire adaptatif. De nombreux composants participent à ce système, que ce soit les cellules dendritiques (DCs), les cellules Natural Killers (NK), les mastocytes, les LT $\gamma\delta$, ou les astrocytes.

Dans les modèles animaux ou chez l'homme, ces cellules présentent une dualité d'action avec des effets soit bénéfiques soit délétères dans l'évolution de la maladie (Mayo et al., 2012). D'une part, elles peuvent contrôler l'auto-immunité en modifiant la différenciation lymphocytaire T vers un phénotype régulateur, en sécrétant des facteurs de croissance neurotrophiques et en activant la remyélinisation (Mayo et al., 2012). D'autre part, le système immunitaire inné peut jouer un rôle pathogénique en promouvant la différenciation des cellules vers un profil Th1 et Th17, induisant ainsi l'apoptose des neurones et des oligodendrocytes (Mayo et al., 2012). Ces cellules du système immunitaire inné ont été également fortement impliquées dans la phase progressive de la maladie (Mayo et al., 2012). De plus en plus d'études s'intéressent au rôle de ces cellules dans la physiopathologie de la SEP, et dans l'avenir, elles feront probablement l'objet de nouvelles stratégies thérapeutiques.

3.4 Les traitements de la SEP (Tableau 1)

La complexité de cette maladie n'a pas encore rendu possible à ce jour le développement d'un traitement curatif. Cependant, il existe de nombreux traitements de fond permettant de « stopper », au moins transitoirement, l'évolution de la maladie. De nombreuses autres molécules sont actuellement en étude pour développer de nouveaux médicaments. Les différents traitements de la SEP, leurs modes d'actions et leurs indications sont donc résumés dans le tableau ci-dessous (Tableau 1). Je ne vais pas plus détailler ici les essais cliniques et les mécanismes d'actions de ces traitements, car ce n'est pas le sujet de ma thèse, même si les études sur les populations régulatrices pourront probablement entraîner le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques tel que cela a été récemment fait avec la vascularite associée à l'hépatite C (Saadoun et al., 2011).

Traitements	Mode d'action	Indication	Références
Les Interférons	Immunomodulateur = - Diminution activation LT - Shift cytokinique Th1/2	- 1 ^{ère} intention SEP RR/ SP avec poussées - 1 ^{ère} intention SCI	- The IFNb Study group, 1993 - MSCRG, 1996 - Comi, 2001 ; Jacobs, 2000 ; Kappos, 2006
L'Acétate de glatiramère	Immunomodulateur = - Augmentation Tregs - Shift cytokinique Th1/2	- 1 ^{ère} intention SEP RR/ SP avec poussées - 1 ^{ère} intention SCI	- Johnson, 1995 - Comi, 2009
La Mitoxantrone	Immunosuppresseur = - Diminution de la prolifération LT/LB	- 2 ^{ème} intention SEP RR/ SP avec poussées - 1 ^{ère} intention SEP aggressive	- Edan, 1996
Le Natalizumab	Ac anti $\alpha 4\beta 1$ = - Bloque migration LT/LB à travers BHM	- 2 ^{ème} intention SEP RR/ SP avec poussées - 1 ^{ère} intention SEP aggressive	- Polman, 2006
Le Fingolimod	Agoniste R Sphingosine 1 phosphate= - Bloque sortie LT/LB des GG	- 2 ^{ème} intention SEP RR/ SP avec poussées - 1 ^{ère} intention SEP aggressive	- Kappos, 2010 - Cohen, 2010
Le Laquinimod	Immunomodulateur = - Shift cytokinique Th1/Th2 - Diminution présentation Ag	En développement	- Comi, 2008
Le Fumarate	Anti-inflammatoire et neuroprotecteur	En développement	- Kappos, 2008
La cladribine	Immunosuppresseur = - Analogue du nucléotide purine : Bloque la prolifération lymphocytes	Développement arrêté	- Giovannoni, 2010
Le Rituximab/ L' Ocrelizumab	Ac anti CD20 = - Apoptose des LB	En développement	- Hauser, 2008 - Kappos, 2011
Le Teriflunomide	Immunomodulateur = - Bloque synthèse pyrimidine et bloque activation LT	En développement	- O'connor, 2006
L'Alemtuzumab	Ac anti CD52 = - Apoptose des LB, LT, monocytes	En développement	- CAMMS223, 2008
Le Daclizumab	Ac anti CD25 = - Apoptose des LT activés	En développement	- Bielekova, 2009

Tableau 1: Traitements utilisés et en cours de développement dans la SEP. Modes d'actions et indications. GG : Ganglions Lymphatiques, BHM : Barrière Hémato-Méningée, RR : Rémittente, SP : Secondairement Progressive, SCI : Syndrome Cliniquement Isolé.

II- La tolérance immunitaire

Un des enjeux clés de l'immunologie est de réussir à comprendre tous les tenants et les aboutissants de la discrimination entre le soi et le non-soi, permettant des réponses immunitaires efficaces contre les antigènes étrangers, mais inhibant les réponses auto-immunes.

Notre système immunitaire a ainsi mis en place de nombreux mécanismes qui permettent d'établir et de maintenir une tolérance vis à vis des auto-antigènes. Les populations lymphocytaires T et B subissent et participent également activement à l'établissement de la tolérance immunitaire. Elles partagent ainsi certains mécanismes comme la délétion clonale, l'anergie, ou l'existence de cellules régulatrices, mais présentent également chacun des mécanismes de tolérance spécifiques.

Dans cette partie, je m'intéresserai aux mécanismes intervenant dans la tolérance immunitaire T et B, les lymphocytes régulateurs feront eux l'objet d'une partie distincte.

1- La tolérance immunitaire B

On connaît de mieux en mieux l'importance et le rôle prépondérant des LB dans le développement des maladies auto-immunes. L'importance des auto-anticorps était déjà bien éprouvée pour des maladies comme le lupus. Mais la redécouverte de la pluralité fonctionnelle de ces cellules a permis une meilleure compréhension de leur rôle dans des maladies auto-immunes considérées depuis toujours comme « T dépendantes » comme la SEP. Ainsi, la compréhension des mécanismes de sélection négative lors du développement lymphocytaire B est essentielle afin de mieux appréhender l'auto-immunité et de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques ciblant les processus défectueux dans les différentes maladies auto-immunes.

De même que pour le répertoire T, les mécanismes permettant une tolérance immunitaire B sont essentiels, et ce pour plusieurs raisons. La première concerne le spectre étendu de la fonction des LB : production d'anticorps, mais aussi présentation antigénique et sécrétion de cytokines (Townsend et al., 2010). La deuxième concerne l'étendue de la diversité du répertoire B. En effet, au cours de la maturation de ces cellules, des processus permettent la génération de plus de 10^{10} spécificités antigéniques différentes sont mis en place (Basten and

Silveira, 2010). Le premier est basé sur la recombinaison V (D) J des gènes des régions variables des Igs, et se déroule dans la moelle osseuse. Le deuxième implique les phénomènes d'Hypermutation Somatique (HSM) des régions variables d'Igs et se déroule dans les centres germinatifs après rencontre avec l'antigène. Cette diversité, en deux étapes, permet d'étendre le répertoire B à un maximum d'antigènes étrangers, mais est à l'origine également de l'apparition de nombreux récepteurs B (BCR) auto-réactifs. Les multiples mécanismes de tolérance existant lors des étapes de différenciation des lymphocytes B, encore mal connus, permettent ainsi de faire face et de contrer la menace, toujours permanente, de l'auto-immunité.

1.1 La diversité du répertoire B

Deux mécanismes principaux permettent la génération d'un répertoire d'anticorps chez l'homme (Figure 1) :

- **La recombinaison V (D) J** a lieu dans la moelle osseuse (Brack et al., 1978; Tonegawa, 1983; Weigert et al., 1978). Les réarrangements des gènes de la région variable s'opèrent selon une séquence ordonnée lors de la maturation des cellules B. Les gènes des régions variables des chaînes lourdes d'Igs sont réarrangés les premiers, au stade ProB. Le réarrangement des segments D et J est associé à l'expression des enzymes de recombinaison RAG1 et RAG2 (Recombinaison Activating Gene) et de la TdT (Terminal deoxynucleotidyl Transferase). Les enzymes de recombinaison reconnaissent les « séquences signal de recombinaison » et catalysent les jonctions V-D-J. La TdT permet l'addition de nucléotides au niveau des extrémités coupées des séquences codantes (Alt and Baltimore, 1982). C'est dans un deuxième temps que les gènes V deviennent accessibles à l'action des recombinases RAG1/2.

Les gènes de la chaîne lourde réarrangés avec succès s'expriment alors en surface de la cellule accompagnés de composants de la chaîne légère de substitution (CLS), V pré B et λ_5 , formant ainsi le pré BCR. Cette expression en surface induit alors le réarrangement des gènes de la chaîne légère d'Ig. En raison de l'exclusion allélique, un seul isotype de chaîne légère est exprimé sur la membrane d'une cellule B. Ainsi, chez l'homme, environ 60% des BCR portent une chaîne légère κ et 40% une chaîne légère λ .

- Le second mécanisme permettant la diversité du répertoire B est l'**hypermutation somatique (HSM)** des gènes d'Igs (McKean et al., 1984). Ce processus commence

après la rencontre avec l'antigène dans les centres germinatifs. Ainsi l'activation des LB et la costimulation apportée par les LT CD4⁺ helper entraînent la formation de centres germinatifs dans les organes lymphoïdes secondaires où ont alors lieu l'HSM et la commutation isotypique. Ces deux mécanismes sont initiés grâce à une même enzyme: la cytidine deaminase dont l'expression est induite dans les cellules B activées (Wardemann and Nussenzweig, 2007). L'HSM permet l'apparition de mutations au sein des gènes des régions variables des Igs et permet ainsi une augmentation de l'affinité pour l'antigène d'une population de cellules B. Ces cellules expriment donc un BCR plus affin et vont ensuite pouvoir reconnaître l'antigène présenté par les cellules dendritiques folliculaires et former des complexes immuns.

Les réarrangements V (D) J permettent d'augmenter encore la diversité en assemblant au hasard des segments géniques des gènes variables des Igs, alors que l'HSM, elle, introduit des mutations au niveau de ces gènes. Ces deux mécanismes sont nécessaires pour atteindre un degré suffisant de diversification du BCR. Cependant, l'envers de la médaille est, bien sûr, la génération d'auto-anticorps et donc de phénomènes auto-immuns. Pour prévenir ce risque, des mécanismes de tolérance sont mis en place au cours du développement. Ils permettent de modifier soit la spécificité des cellules, soit leur fréquence.

1.2 Les mécanismes de tolérance B

1. Les différents points de contrôle (Figure 1)

Les premiers modèles animaux de souris transgéniques pour des molécules de lymphocytes B ont permis de décrire assez précisément les mécanismes de tolérance immunitaire B (Gay et al., 1993; Nemazee and Buerki, 1989; Nemazee and Burki, 1989; Tiegs et al., 1993). Cependant, ils n'ont pas permis de déterminer la proportion des LB auto-réactifs délétés, ni le moment exact du développement auquel ces mécanismes avaient lieu.

Afin de mieux comprendre ces mécanismes de tolérance chez l'homme, Wardemann *et al* en 2003 se sont intéressés à la spécificité des anticorps des précurseurs B durant leur développement dans la moelle osseuse et dans le sang de 3 témoins sains (Wardemann et al., 2003). Pour cela, ils ont amplifié des transcrits des chaînes lourdes et légères d'Igs de lymphocytes B par PCR (Polymerase Chain Reaction), séquencés et clonés. La réactivité de ces anticorps a ensuite été testée contre des lysats de cellules Hep-2 (Cellules tumorales

d'origine humaine permettant de détecter une auto-réactivité anti nucléaire ou anti cytoplasmique) et un panel d'antigènes prédéfinis pour tester leur poly-réactivité. Cette étude a permis de montrer que 75% des cellules immatures présentaient une auto-réactivité anti-Hep2 après l'étape de recombinaison V (D) J, et 55% une poly-réactivité (Figure 1). De manière intéressante, ces auto-anticorps présentent sur leur chaîne lourde d'Ig un long fragment CDR3 enrichi en résidus chargés positivement (Wardemann et al., 2003). L'analyse de la fréquence de ces cellules B auto-réactives à différents stades de leur développement a permis de retrouver deux différents points de contrôles. **Le premier**, central, se situe dans la moelle osseuse entre les stades pré immatures et immatures. **Le deuxième**, périphérique, se situe entre les stades de cellules transitionnelles et de cellules matures naïves. Néanmoins, 20% de cellules B matures naïves échappent à ces premiers processus de sélection. Cette première étude a permis de mettre en évidence l'étendue de la production d'auto-anticorps chez l'homme durant le développement des LB, et a mis en évidence l'existence de deux points de contrôle majeurs permettant une régulation (Wardemann et al., 2003).

Il faut noter qu'en 2008, une étude réalisée à l'aide d'un modèle de souris déficientes en chaîne légère de substitution (stade pré BCR), a permis de mettre en évidence un **point de contrôle supplémentaire très précoce au stade de pré BCR**, avec une augmentation de la fréquence des chaînes lourdes auto-réactives en périphérie chez ces souris. Le mécanisme soutenant ce processus de sélection, ainsi que son importance, ne sont actuellement pas bien définis (Keenan et al., 2008).

Au cours de la réponse immunitaire, les LB matures naïfs ayant rencontré l'antigène se différencient en plasmocytes/plasmablastes ou LB mémoires. Chez l'homme, deux types de cellules B mémoires circulantes ont été décrites : les LB mémoires IgM⁺ et les LB mémoires switchés. Ces cellules se caractérisent entre autres par l'expression du marqueur de surface CD27, non présents sur les LB naïfs (Agematsu et al., 2000; Klein et al., 1998). Les LB mémoires IgM⁺ participent essentiellement aux réponses immunes T-indépendantes dirigées contre les infections bactériennes et les antigènes polysaccharidiques, contrairement aux LB switchés qui sont produits dans les centres germinatifs pendant les réponses T-dépendantes (Carsetti et al., 2004).

L'équipe de Wardemann s'est intéressée à l'auto-réactivité des anticorps produits par ces LB mémoires IgM⁺, et a ainsi décrit un **3^{ème} point de contrôle** chez l'homme (Tsuiji et al., 2006). A partir d'anticorps recombinants clonés à partir de LB mémoires IgM⁺, les profils de réactivité ont pu être étudiés. Ainsi, comme attendu, environ 20% des anticorps issus des LB matures naïfs présentaient une auto-réactivité et 6% une poly-réactivité. En revanche, seuls

2% et 1% des anticorps issus des LB mémoires IgM⁺ présentaient, de manière respective, une auto- ou une poly-réactivité. Il semble donc exister un point de contrôle à l'étape de transition entre les LB matures naïfs et les LB mémoires IgM⁺. Afin de déterminer si cette sélection se produisait avant ou après l'étape d'HSM, les auteurs ont reconstruit les anticorps à partir de leurs formes non mutées et ont de nouveau testé leur réactivité. Aucun des anticorps testés ne présentaient alors de poly- ou d'auto-réactivité. Cela indique donc que l'étape de sélection se situe avant ce phénomène d'HSM, et que les quelques LB CD27⁺ IgM⁺ auto-réactifs le deviennent après cette étape.

De la même manière, Tiller *et al* ont étudié la réactivité de 141 anticorps recombinants issus de LB mémoires CD27⁺ IgG⁺, et ont retrouvé 46.8% et 22.7% d'auto- et de poly-réactivité, donc significativement plus que pour les LB matures naïfs (Tiller et al., 2007). Les auteurs ont ensuite démontré que cette augmentation d'auto-réactivité entre le stade mature naïf et mémoire IgG⁺ s'acquerrait au moment de l'HSM au sein des **centres germinatifs (CG)**. Cette poly-réactivité, s'observant chez des témoins sains, n'a probablement aucune conséquence pathogénique.

Même si la fréquence des LB auto-réactifs augmente après leur passage au sein des CG, il existe également des mécanismes de **sélection négative** à ce niveau (Vinuesa et al., 2009). En effet, les CG représentent un microenvironnement au sein des follicules où les LB ayant subi l'HSM sont sélectionnés positivement ou négativement sur la base de leur affinité antigénique, mais également sur leur auto-réactivité. Ainsi, il existe une compétition locale afin d'accéder aux antigènes présentés par les cellules dendritiques folliculaires et aux signaux de costimulation des LT *helper* folliculaires. Si les cellules B ne reçoivent pas ces signaux, elles sont alors déléetées de manière Bim-dépendante (cf 2.2 La tolérance périphérique).

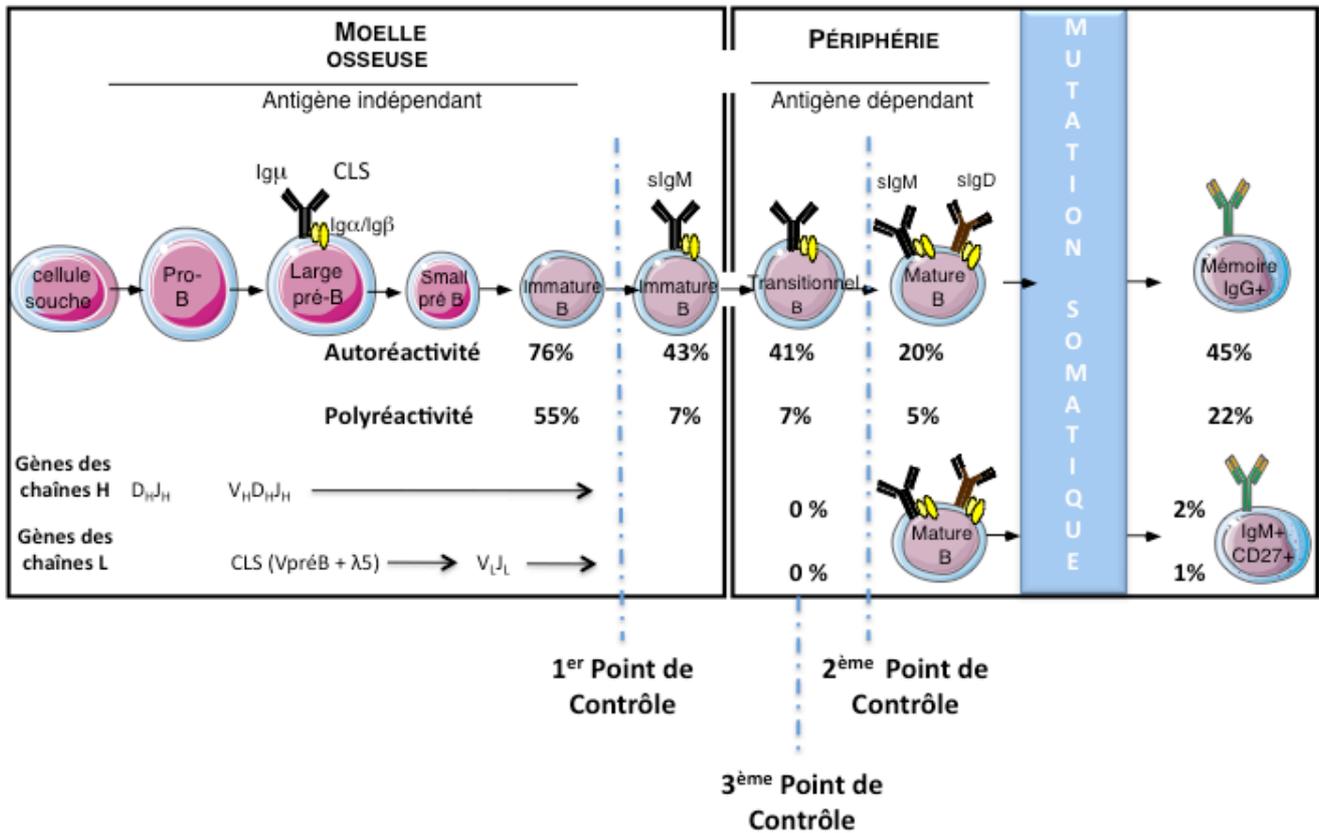


Figure 1 : *Points de contrôle de la tolérance B chez l'homme.* Les différentes étapes de la lymphopoïèse B sont représentées ainsi que l'expression à la surface cellulaire des chaînes d'Igs. La fréquence des cellules B présentant une réactivité anti Hep-2 (auto-réactivité) ou poly-réactives est représentée sous chaque fraction cellulaire. Un point de contrôle central permet l'élimination de la plupart des cellules poly-réactives ou réagissant contre des cellules Hep-2 dans la moelle osseuse. Un point de contrôle périphérique permet d'éliminer de nouveau des cellules B anti Hep-2 avant l'étape de LB matures. Un troisième point de contrôle permet l'élimination complète des LB naïfs auto et poly-réactifs avant leur développement en LB mémoires IgM^+ . Adapté de Wardemann et al. 2007.

2. Les différents mécanismes de tolérance (Figure 2)

2.1 La tolérance centrale

Une variété relativement importante de mécanismes allant de l'élimination des cellules B auto-réactives, à leur inactivation fonctionnelle, permet de façonner le répertoire des lymphocytes B. Dans la moelle osseuse, la sélection est due principalement à deux mécanismes : le *receptor editing* et la délétion clonale. L'inclusion allélique représente un mécanisme de tolérance plus anecdotique.

- **Le receptor editing** est un mécanisme de tolérance B identifié indépendamment par deux équipes il y a presque 20 ans (Gay et al., 1993; Tiegs et al., 1993). Ces auteurs ont ainsi décrits, dans des modèles de souris transgéniques, qu'une certaine proportion de LB immatures auto-réactifs n'était pas éliminée par délétion mais exprimait un nouveau BCR non auto-réactif grâce à de nouveaux réarrangements V (D) J. Le *receptor editing* a longtemps été considéré comme un processus de sélection secondaire. Depuis, il a été démontré que ce mécanisme était prédominant dans la tolérance centrale et que le phénomène de délétion clonale n'apparaissait qu'en cas d'échappement au *receptor editing* (Halverson et al., 2004).

Ce mécanisme implique la réactivation des gènes RAG et ainsi de nouveaux réarrangements de la chaîne légère (moins communément de la chaîne lourde) jusqu'à obtention d'une spécificité BCR dirigée contre un antigène étranger. Cette étape de sélection s'effectue au stade de cellule B immature une fois que les réarrangements des chaînes lourdes et légères ont été effectués avec succès. Ce mécanisme de tolérance immunitaire est prédominant dans la sélection négative des cellules B auto-réactives à forte avidité et concernerait 20 à 50% des cellules B en développement (Basten and Silveira, 2010; Pelandra and Torres, 2006). L'enclenchement de ce nouveau réarrangement n'est cependant pas *a priori* dû uniquement à la voie de signalisation du BCR mais impliquerait d'autres voies. En effet, des études récentes réalisées chez des patients déficients en certaines protéines impliquées dans les voies de signalisation des Toll-Like-Receptors (TLRs) (MyD88, IRAK-4, ou UNC 93B) ont permis de mettre en évidence un rôle majeur de ces molécules dans les mécanismes de *receptor editing* (Isnardi et al., 2008).

- **L'inclusion allélique** : Lors des réarrangements V (D) J, un signal, à la fin de la recombinaison, permet l'exclusion de l'autre allèle, mais également l'expression d'un seul

isotype de chaîne légère (λ ou κ). Lors du mécanisme de *receptor editing*, dans certains cas, le nouveau réarrangement peut se produire sur le deuxième allèle ou sur un autre isotype, et la cellule B peut se retrouver alors avec deux réarrangements productifs (Li et al., 2002; Liu et al., 2005). Ces cellules B peuvent alors co-présenter les deux récepteurs, ou internaliser le BCR auto-réactif et n'exprimer que le deuxième BCR non auto-réactif. Dans le premier cas, le second récepteur « dilue » l'auto-réactivité (souvent de faible avidité) du premier BCR, et la cellule est déroutée vers la zone marginale (Li et al., 2002). Dans le deuxième cas, le BCR auto-réactif est retenu à l'intérieur de la cellule B qui ne peut donc pas rencontrer l'antigène mais se différencie en plasmocytes et sécrète des auto-anticorps de type IgM. Ces cellules B pourraient donc avoir un rôle dans certaines maladies auto-immunes (Liu et al., 2005).

- **La délétion clonale** est le second mécanisme principal permettant l'élimination des anticorps auto-réactifs du répertoire. Ce mécanisme a pour la première fois été décrit par Nemazee *et al* en 1989 dans un modèle de souris transgénique H-2k (CMH-I) porteuses de LB sécrétant une IgM anti H-2k (Nemazee and Burki, 1989). La délétion clonale n'apparaît qu'en seconde ligne, et se limite aux cellules B auto-réactives ayant échappé au *receptor editing*. En effet ce processus d'apoptose est une voie par défaut qui se déclenche au bout de 1 à 3 jours après reconnaissance d'un auto-antigène, si un nouveau BCR non auto-réactif n'a pas été réarrangé dans ce délai (Pelandra and Torres, 2006). De la même manière qu'en périphérie, l'activation d'une protéine pro apoptotique, Bim (membre de la famille Bcl2), apparaît comme un préalable nécessaire à cette délétion (Enders et al., 2003).

2.2 La tolérance périphérique

Seules 10 à 20% des cellules B immatures générées émergent de la moelle osseuse comme cellules transitionnelles (Wardemann and Nussenzweig, 2007). Ces cellules doivent alors compléter leur maturation en périphérie. Elles migrent vers la rate où elles peuvent rencontrer des antigènes du soi non présents dans la moelle osseuse. De nouveaux mécanismes de tolérance se mettent alors en place.

- **La délétion clonale** : En périphérie, des interactions de forte avidité de ces cellules avec des antigènes du soi entraînent une délétion rapide Bim-dépendante (Enders et al., 2003). En revanche, des interactions de faible ou très faible avidité résultent

respectivement en l'induction d'une anergie ou d'une ignorance clonale (Figure 2). Ces mécanismes de délétion apparaissent à tous les niveaux de la sélection négative lors du développement des lymphocytes B.

- **L'anergie clonale** : Des expériences réalisées dans différents modèles de souris transgéniques ont montré que des interactions prolongées de faible affinité de LB auto-réactifs avec des auto-antigènes aboutissaient à une perte de réponse de la signalisation du BCR (Cambier et al., 2007; Goodnow et al., 1988; Nossal and Pike, 1980). L'état d'anergie se caractérise ainsi par une désensibilisation de la signalisation du BCR, résultant en une perte de la réponse, une incapacité à présenter l'Antigène (Ag) ou à produire des anticorps. Ces cellules présentent également d'autres caractéristiques qui les distinguent des LB naïfs : une espérance de vie plus courte, une migration altérée, une incapacité à interagir avec les LT *helper*, mais également une dépendance à de fortes quantités du facteur de survie BAFF (B cell Activating Factor) (Lesley et al., 2004; Thien et al., 2004). Toutes ces caractéristiques agissent de concert pour limiter la capacité des cellules anergiques à participer à la réponse immunitaire (Cambier et al., 2007).

- **L'ignorance clonale** : Les cellules B exprimant des récepteurs faiblement auto-réactifs échappent aux processus de sélection négative de la moelle osseuse, et peuvent émerger en périphérie (Shlomchik, 2008). Le signal médié par l'auto-antigène est considéré comme trop faible pour entraîner une réponse : on parle alors d'ignorance clonale (Aplin et al., 2003; Hannum et al., 1996; Shlomchik et al., 1993). Ce mécanisme est principalement dû à l'activation des voies de régulation négative du BCR (SIAE/Siglec (SIAE : Sialic acid Acetyl Esterase)) permettant le maintien d'un seuil d'activation de la cellule B. Chez certains patients présentant des maladies auto-immunes, des variants défectueux de SIAE ont été retrouvés renforçant le rôle de cette voie inhibitrice dans la tolérance immunitaire B (Pillai et al., 2011; Suroliya et al., 2010).

- **Rôle du FcγRIIB** : FcγRIIB est un récepteur reconnaissant la fraction Fc des Igs G. Il est exprimé entre autres par les LB et est responsable d'un signal inhibiteur. Plusieurs études ont démontré l'importance de cette molécule dans les mécanismes de tolérance périphérique au niveau des CG à l'aide de souris KO pour cette molécule (Bolland and

Ravetch, 2000; Tarasenko et al., 2007; Tiller et al., 2010). Ainsi des souris déficientes en Fc γ RIIB présentent un répertoire B, au niveau des CG, significativement enrichi en anticorps auto-réactifs (Tiller et al., 2010).

- **Les lymphocytes B régulateurs (cf partie III-1) :** La tolérance périphérique implique également des cellules B possédant des propriétés immunosuppressives. Ces LB régulateurs seront décrits dans une deuxième partie.

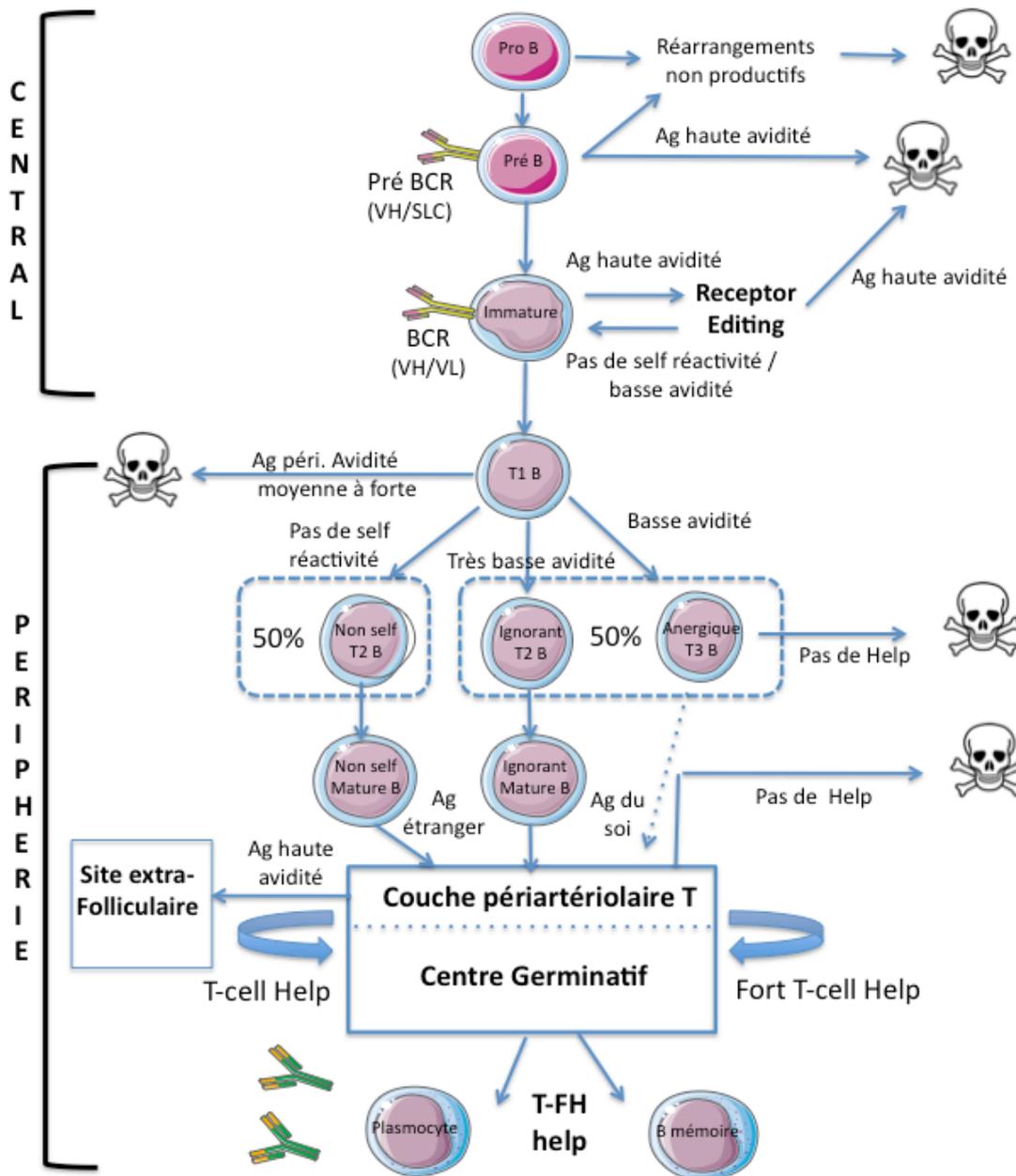


Figure 2 : Différents points de contrôle et mécanismes de sélection négative durant le développement des LB. La majorité des LB auto-réactifs sont éliminés par des mécanismes de tolérance centrale au niveau de la moelle osseuse, comme le receptor editing et la délétion clonale. Les LB auto-réactifs échappant à ces premiers mécanismes de sélection sont alors soumis en périphérie à d'autres mécanismes de sélection, dépendant surtout de l'avidité de l'interaction Ag-BCR : en cas de forte ou de moyenne avidité, les cellules sont respectivement soumises aux processus de délétion et d'anergie. En cas de faible avidité, un processus d'ignorance clonale se met alors en place. Ag= Antigène, T-FH : LT Folliculaire Helper, Adapté de Basten et al. 2010.

2- La tolérance immunitaire T

2.1 La diversité du répertoire T

Comme pour les LB, les LT doivent, pour assurer une réponse immune efficace, être capable de reconnaître un nombre infini d'antigènes étrangers. La diversité du répertoire lymphocytaire T est ainsi assurée, au cours de l'ontogénèse, par les réarrangements V (D) J des gènes des régions variables du récepteur T (TCR) sur le même principe que pour les LB (cf partie II-1), mais au sein du thymus. Ces réarrangements et les étapes de sélection qui s'ensuivent permettent d'aboutir à une diversité des TCR très importante puisqu'estimée > à 2.5×10^7 (Arstila et al., 1999). Le pendant à cette diversité est l'auto-immunité, avec la production de TCR auto-réactifs. De multiples mécanismes permettant l'élimination, ou l'inhibition de ces cellules sont pourtant mis en place durant le développement lymphocytaire T (tolérance centrale), ainsi qu'en périphérie après maturation (tolérance périphérique).

2.2 Les mécanismes de tolérance T

1. La tolérance centrale

Le développement lymphocytaire T s'effectue, contrairement aux LB, dans le thymus, où se mettent en place les étapes de sélection positive et négative des thymocytes. Le facteur clé permettant ces processus de sélection est basé sur l'avidité du TCR avec son complexe CMH/peptide présenté par les cellules stromales (Ashton-Rickardt et al., 1994). Ces étapes permettent ainsi de sélectionner positivement les thymocytes possédant un TCR capable de reconnaître le complexe CMH/peptide avec une affinité intermédiaire. Cette étape a lieu dans le cortex thymique au stade Double Positif (DP). Lors d'une deuxième étape, se déroulant dans la medulla du thymus, la sélection négative permet l'élimination des thymocytes reconnaissant ce complexe avec une forte affinité.

- La sélection positive

Pendant leur développement, les progéniteurs T entrent dans le thymus au niveau de la jonction cortico medullaire. Ces progéniteurs se développent en thymocytes Doubles Négatifs (DN) et migrent au niveau de la zone sous capsulaire. Les étapes de

réarrangement de la chaîne β se déroulent lors de cette migration. Les thymocytes exprimant un pré-TCR constitué de la chaîne β et d'une chaîne α de substitution deviennent alors DP CD4⁺CD8⁺. Ils vont se déplacer, au hasard, au sein du cortex, afin de *scanner* les cellules épithéliales thymiques corticales (cTEC) à la recherche de leur ligand (Bouso et al., 2002; Klein et al., 2009). Leur survie dépend des interactions qu'ils vont réaliser avec les cTEC. Les thymocytes DP ont une espérance de vie de 3-4 jours dans le cortex. Pendant cette période, des réarrangements de la chaîne α sont successivement effectués afin de générer une interaction avec un complexe CMH-peptide du soi présenté par une cTEC (Petrie et al., 1993). En cas de reconnaissance du complexe CMH-peptide du soi avec une affinité intermédiaire, les thymocytes survivent et deviennent matures en perdant l'un des marqueurs (CD4 ou CD8) fonction du CMH qu'ils ont reconnu (Jameson et al., 1995). Ils deviennent alors Simples Positifs (SP) et peuvent migrer dans la medulla. Seuls 5% des thymocytes DP vont interagir avec le complexe CMH/peptide du soi et s'orienter vers le stade SP (Anderson et al., 1998; Hogquist and Bevan, 1996). Les autres meurent par « négligence » car ils ne peuvent intégrer les signaux dépendant du TCR nécessaires à leur survie. Cette première sélection est à l'origine d'un enrichissement significatif en cellules auto-réactives capables de reconnaître des antigènes du soi. En effet, des études ont montré que dans des modèles expérimentaux où l'expression des molécules du CMH est restreinte aux cTEC, les LT présentent une forte fréquence d'auto-réactivité (Capone et al., 2001; Laufer et al., 1996). Une étape de sélection négative apparaît donc indispensable.

- **La sélection négative**

Les thymocytes résident 4 à 5 jours dans la medulla avant de pouvoir sortir dans la circulation sanguine (McCaughy et al., 2007). La présentation des antigènes du soi est réalisée par les cellules épithéliales thymiques medullaires (mTEC) et par les DCs. Depuis quelques années, on sait que les mTEC sont capables de présenter un large éventail d'antigènes tissulaires (Derbinski et al., 2001; Gotter et al., 2004), et que les DCs peuvent également présenter ces antigènes préalablement capturés par les mTEC (Gallegos and Bevan, 2004). L'expression de ces milliers d'antigènes tissulaires est rendue possible par l'expression d'un gène régulateur de l'auto-immunité : *Aire*. La protéine codée par ce gène représente la pierre angulaire de la tolérance centrale (Mathis and Benoist, 2009; Peterson et al., 2008). En 1997, deux équipes différentes

ont rapporté que des mutations au niveau de ce gène entraînaient chez l'homme une maladie auto-immune sévère nommée APECED (Autoimmune Polyendocrinopathy Candidiasis Ectodermal Dystrophy) (consortium, 1997; Nagamine et al., 1997). Chez la souris, la délétion de ce gène entraîne une diminution franche de l'expression des antigènes tissulaires par les mTEC, et des manifestations auto-immunes importantes (Anderson et al., 2002). Les mécanismes par lesquels *Aire* contrôle cette expression antigénique restent à ce jour mal compris. On sait tout de même que la protéine présente des similitudes importantes avec des facteurs de transcription et que son expression est restreinte aux tissus lymphoïdes (Kyewski and Derbinski, 2004).

Les thymocytes SP peuvent donc entrer en contact avec des milliers d'antigènes du soi. Si le complexe CMH-peptide du soi est reconnu avec une haute affinité, les cellules sont délétées. Cette étape est indispensable. En effet, différentes études ont permis de mettre en évidence que des défauts d'entrée dans la medulla, ou de désorganisation de l'architecture medullaire résultent en des manifestations auto-immunes sévères (Boehm et al., 2003; Kurobe et al., 2006; Srivatsan and Peng, 2005). Suite à ces mécanismes de sélection négative, seuls 3% des thymocytes survivent et quittent le thymus pour les organes lymphoïdes secondaires (Egerton et al., 1990; Scollay et al., 1980).

Cependant, le rôle de la medulla thymique ne se cantonne pas à la sélection négative des cellules auto-réactives. En effet, elle favorise également la sélection positive des LT régulateurs $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ (Fontenot et al., 2005; Sakaguchi, 2004). Cette sélection serait due à la sécrétion par les mTEC de lymphopoiétine stromale thymique (TLSP). Cette cytokine permettrait la sur-régulation de l'expression du CMH-II, et l'expression par les DCs des molécules CD80 et CD86. Les DCs activées induiraient alors la différenciation des thymocytes en LT régulateurs naturels (Watanabe et al., 2005). A noter cependant que l'induction des LT régulateurs ne semble pas uniquement dévolue à la medulla. Une étude récente a en effet montré que le cortex thymique participait également à la différenciation de ces cellules (Liston et al., 2008).

2. La tolérance périphérique

Les mécanismes de délétion thymique, à la base de la tolérance centrale, laissent s'échapper des LT présentant un certain degré d'auto-réactivité. En effet, les LT auto-réactifs

présentant une avidité moyenne pour les complexes CMH-peptide présentés par les DCs médullaires ou les mTEC peuvent migrer en périphérie. De même, des LT présentant une forte avidité mais pour des antigènes présents en trop faible quantité dans la médulla peuvent échapper aux mécanismes de sélection négative (Mueller, 2010). Il existe donc des mécanismes de tolérance périphérique permettant d'éviter des phénomènes auto-immuns. En effet, une association claire entre l'auto-immunité et des déficits géniques impliqués dans la tolérance périphérique a été démontrée (Walker and Abbas, 2002). Dans cette partie, deux types de mécanismes principaux vont être présentés :

- les mécanismes de tolérance intrinsèques aux cellules T auto-réactives (Tolérance passive).
- Les mécanismes extrinsèques aux cellules T auto-réactives impliquant d'autres populations cellulaires (Tolérance active).

1.1 Les mécanismes de tolérance passive

- L'ignorance clonale

La tolérance périphérique agit à différents niveaux. Une des premières barrières à l'auto-réactivité est l'ignorance des antigènes du soi. En effet, ces derniers peuvent être « séquestrés » dans des sites difficilement accessibles aux cellules du système immunitaire (Alferink et al., 1998). Les LT naïfs circulent du sang vers les organes lymphoïdes secondaires puis dans les vaisseaux lymphatiques. Guidés par un gradient de concentration en ligand pour CCR7 (CCL19 et CCL21), ils entrent dans le cortex des organes lymphoïdes et *scannent* les DCs à la recherche de leur antigène. Si la signalisation par le TCR n'a pas lieu, l'expression de CCR7 diminue et les LT naïfs recirculent dans le sang. Ces cellules T naïves sont donc « exclues » des organes tissulaires non lymphoïdes riches en antigènes tissulaires. Au contraire, les LT effecteurs mémoires ayant déjà rencontré leur antigène ont une expression réduite de CCR7 et sont donc moins soumis à la recirculation au sein des organes lymphoïdes. Ils sur-expriment au contraire des intégrines (comme CD11a ou l'intégrine $\alpha_4\beta_1$) et les ligands de P et E sélectine (comme PSGL-1), leur permettant de pénétrer dans les tissus par l'intermédiaire des veinules post capillaires, et donc de déclencher des maladies auto-immunes (Mueller, 2010). Cette entrée dans les organes n'est permise que dans un contexte inflammatoire. Ainsi, la circulation limitée des LT effecteurs activés en l'absence de stimulus inflammatoire, permet le maintien d'un état d'ignorance clonale envers les antigènes tissulaires.

- L'anergie clonale

Alternativement, les LT auto-réactifs peuvent subir une inactivation fonctionnelle, appelée anergie. Ce phénomène est induit en cas de présentation de l'antigène par une Cellule Présentatrice d'Antigène (CPA) « au repos », en l'absence de signaux de dangers, mais peut également se déclencher après une activation isolée du TCR (signal 1), en l'absence des signaux de costimulation médiés par la liaison de CD28 à CD80/86 (signal 2) (DeSilva et al., 1991; Harding et al., 1992; Jenkins et al., 1987) ou en cas d'activation anormale du TCR (stimulation chronique, forte dose d'antigène soluble) (Wells, 2009).

L'anergie se caractérise par un blocage du cycle cellulaire en phase G1. Les deux signaux sont normalement nécessaires au recrutement de facteurs de transcription impliqués dans la synthèse de l'IL-2 (NFAT, NFκB, AP1). La fixation de cette cytokine sur le complexe IL-2R permet ensuite l'activation de la voie PI3K/AKT-mTOR et donc l'entrée dans le cycle cellulaire (Chappert and Schwartz, 2010).

Des études récentes ont montré que d'autres voies, indépendantes des signaux de costimulation, pouvaient être impliquées dans l'induction de l'anergie. Ainsi, l'activation ou l'inhibition de la voie PI3K/AKT-mTOR peut se faire par l'intermédiaire de molécules énergétiques comme l'ATP, mais aussi par des nutriments comme certains acides aminés (Wells, 2009). mTOR est donc capable d'intégrer des signaux environnementaux et agit alors comme un « capteur » du microenvironnement cellulaire (Powell, 2006). Enfin, indépendamment de mTOR, la kinase GCN2, activée spécifiquement par une carence en acides aminés, inhibe l'entrée en phase S de la cellule T (Grallert and Boye, 2007). Ainsi, *in vivo*, les LT GCN2^{-/-} sont résistants à la tolérance induite par les DCs IDO⁺ (Indoleamine Dioxygénase). L'IDO entraîne normalement un catabolisme du tryptophane, activant ainsi la voie GCN2, et bloquant la prolifération lymphocytaire T (Munn et al., 2005).

L'absence du signal de costimulation est un phénomène important dans l'induction de l'anergie, mais d'autres voies qui permettent de bloquer le cycle cellulaire lymphocytaire T ont été décrites. Ainsi, de nombreux signaux extra-cellulaires permettent de déterminer l'état de tolérance/anergie du LT.

- La délétion clonale

Une des voies de la tolérance passive probablement la plus efficace passe par l'apoptose des LT auto-réactifs par un mécanisme de mort cellulaire induite par

l'activation (AICD : Activation Induced Cell Death). Ainsi, un LT auto-réactif engagé de manière chronique dans la reconnaissance d'un complexe CMH-peptide meurt par apoptose suite à une combinaison d'événements moléculaires : l'engagement de la voie du Fas récepteur et de celle dépendante de Bim et Bcl2 (Marrack and Kappler, 2004).

Une des pierres angulaires soutenant ce processus est donc la liaison de Fas récepteur avec son ligand (Fas-L). En effet, un défaut de cette voie est à l'origine, chez l'homme, d'un syndrome lymphoprolifératif autoimmun (ALPS) (Fisher et al., 1995). De même, des LT de souris déficientes pour Bim (protéine pro apoptotique) résistent à l'apoptose, et ces souris développent avec le temps une glomérulonéphrite (Bouillet et al., 1999). D'autres molécules ont également été impliquées dans la signalisation de l'AICD : Pten (Suzuki et al., 2001), mais également l'IL-2, dont le déficit chez la souris entraîne un défaut d'activation de la voie Fas-FasL (Van Parijs et al., 1997), et l'apparition de manifestations auto-immunes (Sadlack et al., 1995).

2.2 Les mécanismes de tolérance active

- Les cellules dendritiques tolérogènes

Les DCs sont des CPA professionnelles, considérées comme des éléments clés de l'immunité innée et adaptative. Ces cellules jouent un rôle majeur en dirigeant la réponse immunitaire vers un état de tolérance ou d'immunité. Les DCs jouent déjà un rôle essentiel dans les mécanismes de sélection négative thymique. En périphérie, ces cellules participent également à l'élimination ou l'inactivation des LT auto-réactifs. Le prototype des DCs tolérogènes est classiquement représenté par les DCs immatures, qui ont une faible capacité à stimuler les LT (Steinman and Nussenzweig, 2002). Ainsi, dans des modèles murins d'allogreffe cardiaque, l'injection de DCs immatures 7 jours avant la greffe permet de prolonger la survie du greffon (Fu et al., 1996; Lu et al., 1997). Suite à ces premières descriptions, plusieurs études ont montré que divers types de DCs (myéloïdes et plasmacytoïdes) possédaient des propriétés tolérogènes (Ezzelarab and Thomson, 2011).

En l'absence de signaux inflammatoires, les DCs tolérogènes maintiennent un état de tolérance aux antigènes du soi par différents mécanismes incluant la délétion lymphocytaire T, l'anergie, l'induction de Tregs, mais aussi l'expression de molécules immunomodulatrices et immunosuppressives (IL-10, TGF β , IDO) (Ezzelarab and Thomson, 2011). Chez l'homme, la preuve de l'existence de DCs immatures

tolérogènes a été apportée par plusieurs études. Ainsi, l'injection sous cutanée de DCs immatures autologues chargées en peptides du virus de l'influenza induit l'expansion de LT régulateurs CD8⁺ Ag-spécifiques mais aussi le développement de LT CD8⁺ mémoires présentant un défaut de sécrétion d'IFN γ (Dhodapkar et al., 2001; Dhodapkar and Steinman, 2002). Le développement de ces cellules fait l'objet de nombreux essais cliniques, entre autres, dans le domaine de la transplantation d'organes. Dans la SEP, une étude récente (Raiotach-Regue et al., 2012) a montré qu'il était possible de dériver à partir de monocytes de patients, des DCs tolérogènes semi matures stables chargées en peptides de la myéline. In vitro, ces cellules induisent une diminution significative de la réponse des LT dirigés contre des peptides de la myéline et pourraient donc constituer un outil thérapeutique intéressant dans le futur.

- **Les lymphocytes T régulateurs (cf partie III-2)**

La tolérance périphérique implique également des cellules T possédant des propriétés immunosuppressives. Ces LT régulateurs seront décrits dans une deuxième partie.

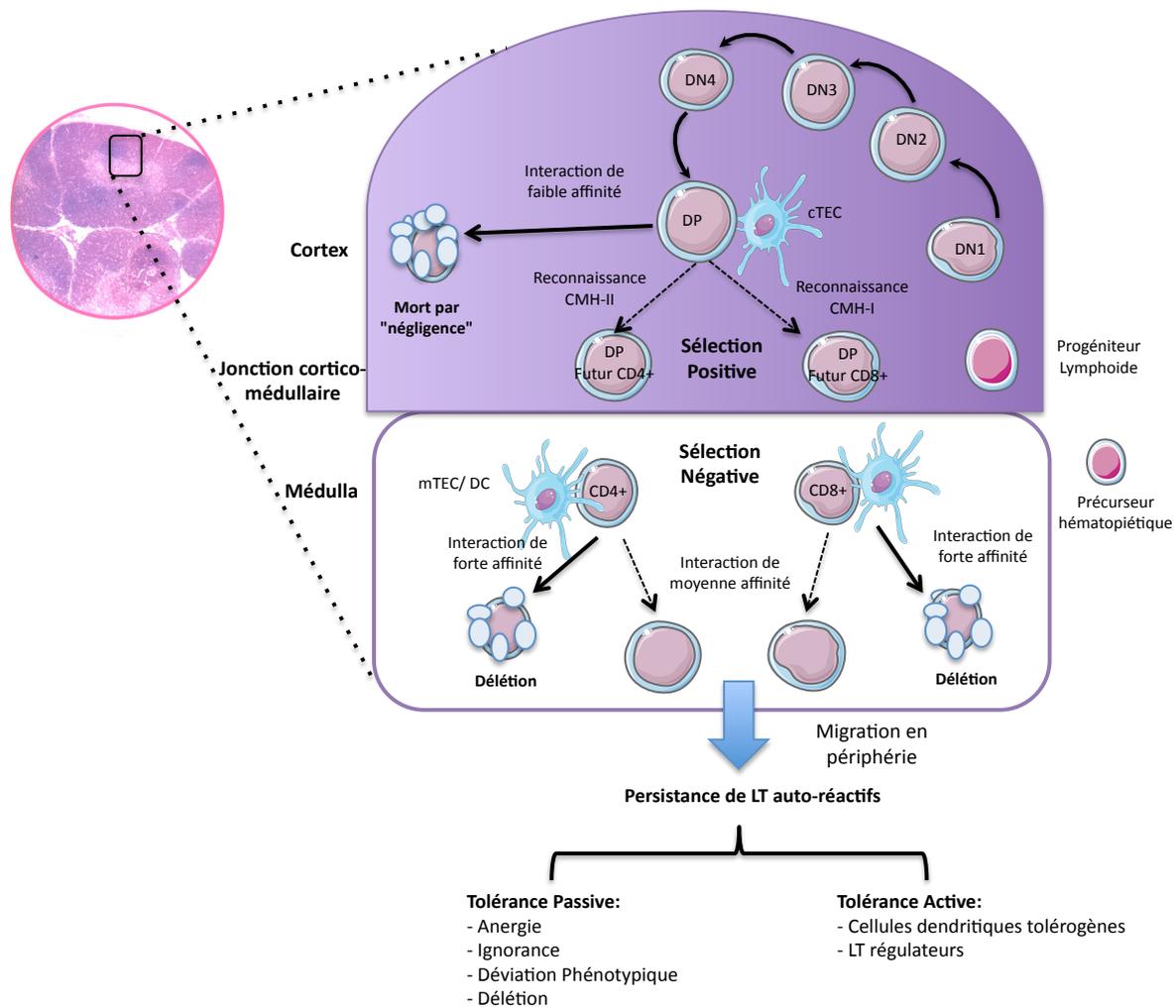


Figure 3 : Mécanismes de tolérance centrale au sein du thymus au cours du développement lymphocytaire T. La sélection positive a lieu dans la zone corticale : les thymocytes DP interagissent avec le complexe CMH/peptide présente par les cellules épithéliales corticales (cTEC). En cas de faible affinité, les cellules sont délétées, en cas de forte affinité, elles sont sélectionnées, se déterminent en lignée CD4 ou CD8 et migrent alors dans la medulla. Elles y interagissent alors avec les cellules épithéliales medullaires (mTEC) ou les cellules dendritiques (DCs). Une interaction de trop forte affinité avec le complexe CMH/peptide entraîne une mort par apoptose des LT auto-réactifs.

Les mécanismes de tolérance immunitaire T sont nombreux et indispensables afin d'éviter une activation des LT auto-réactifs générés durant le développement. Plus récemment, des cellules présentant des fonctions immunosuppressives ont été identifiées et caractérisées. Ces cellules jouent un rôle fondamental dans les phénomènes de tolérance active périphérique.

Un rôle régulateur a ainsi été retrouvé pour de nombreuses populations cellulaires : les lymphocytes T (qui sont les mieux connus), mais également les lymphocytes B, les cellules dendritiques, les cellules myéloïdes suppressives, les cellules souches mésenchymateuses ou les macrophages.

Dans cette troisième partie, je vais donc m'intéresser au rôle des lymphocytes T et B régulateurs, ainsi qu'à leur implication dans la sclérose en plaques.

III- Les lymphocytes régulateurs

Les mécanismes permettant le maintien d'un état de tolérance vis à vis d'auto antigènes impliquent également des populations de cellules régulatrices, qui, par différents modes d'actions, contribuent de manière fondamentale au maintien d'un état tolérogène.

Ces cellules n'ont été réellement identifiées que dans les années 1990, même si leur existence était déjà suspectée auparavant. On sait actuellement que presque toutes les cellules du système immunitaire sont en mesure d'exercer des activités de régulation et de suppression. Dans cette partie, je n'aborderai que les lymphocytes régulateurs qui ont été mon principal sujet de recherche pendant ma thèse.

1- Les lymphocytes B régulateurs

Depuis quelques dizaines d'années, les différentes fonctions des LB sont « découvertes ». En effet, à la production d'anticorps, bien connue, se sont ajoutées la capacité de présenter des antigènes présents en faible quantité, de manière efficace, mais également la production de multiples cytokines. Dans ce cadre, des données assez convaincantes ont rapporté un rôle régulateur des LB sécrétant de l'IL-10 dans des modèles animaux d'auto-immunité.

Dans cette partie, je vais donc reprendre les données de la littérature concernant la mise en évidence, le phénotype, et la fonction de ces cellules dans les modèles animaux, mais également depuis peu, leur mise en évidence et leur caractérisation chez l'homme.

1.1 Historique

L'existence de LB suppresseurs a été pour la première fois décrite en 1974 dans deux études sur l'hypersensibilité retardée chez des cobayes (Katz et al., 1974; Neta and Salvin, 1974). En effet, chez ces animaux, le phénomène d'hypersensibilité retardée est transitoire, et cette « résistance » peut être transmise à des receveurs par le transfert de cellules de la rate d'un donneur immunisé.

C'est seulement 20 ans après, qu'il a été possible d'impliquer spécifiquement les LB dans des phénomènes de suppression. En effet, Wolf *et al* ont rapporté que des souris déficientes en LB

présentaient un risque de développer une EAE identique à celle des souris sauvages, mais sans entrer en rémission, contrairement à ces dernières (Wolf et al., 1996). Ces données ont été reproduites dans un autre modèle de maladie auto-immune : la colite inflammatoire. Mizoguchi rapporte ainsi une exacerbation de la maladie en l'absence de LB, alors que le transfert de LB de souris sauvages permet une amélioration franche des symptômes (Mizoguchi et al., 1997).

Par la suite, différentes approches ont permis de montrer que les LB exerçant une régulation chez l'animal le faisaient par la sécrétion d'IL-10. Ainsi, des souris chimériques présentant des LB déficients en IL-10 développent une EAE permanente, sans rémission (Fillatreau et al., 2002), alors que le transfert de LB de souris sauvages permet de rétablir une évolution normale. La sévérité de l'EAE est de plus associée à une augmentation de la réponse Th1 chez ces animaux. La même année, un sous-groupe de LB régulateurs caractérisé par l'expression de CD1d et par la production d'IL-10 a été décrit dans un modèle de colite (Mizoguchi et al., 2002). Ainsi dans ce modèle, le transfert de LB CD1d^{hi} permet d'inhiber la progression de l'inflammation intestinale (Mizoguchi et al., 2002). Par la suite, plusieurs équipes ont caractérisé les voies d'activation, le phénotype et les mécanismes suppresseurs de cette population cellulaire, essentiellement chez l'animal, et depuis peu chez l'homme.

1.2 Les lymphocytes B régulateurs dans les modèles animaux

1. Phénotype des LB régulateurs : un progéniteur commun ? (Tableau 2)

L'existence d'une seule « source » *in vivo* de LB régulateurs reste mal déterminée. En effet, différentes sous-populations B ont été impliquées dans des phénomènes de régulation. L'existence de marqueurs phénotypiques communs à ces populations n'exclut cependant pas la possibilité d'un progéniteur partagé. Deux principales populations aux propriétés régulatrices ont été décrites chez l'animal : les LB précurseurs de la zone marginale (LB T2-MZP) et les LB CD5⁺CD1d^{hi}. D'autre part, récemment, la molécule TIM-1 (T cell Ig domain and Mucin domain) a été décrite comme spécifique des LB sécrétant de l'IL-10.

- Les LB T2-MZP IgM^{hi}IgD^{hi}CD21^{hi}CD1d^{hi}

En 2002, Mizoguchi *et al* ont rapporté, dans un modèle de colite inflammatoire murin, un phénotype CD1d^{hi} aux cellules B régulatrices sécrétant de l'IL-10 (Mizoguchi et

al., 2002). Dans la rate, deux populations cellulaires B distinctes expriment des niveaux élevés de CD1d : les LB de la zone marginale, et leurs précurseurs directs : les LB T2-MZP. En 2005, Lenert *et al* ont ainsi démontré que les LB de la zone marginale (CD21^{high}CD23^{low}CD35^{high}) était la source prédominante d'IL-10 dans un modèle de souris lupiques, en réponse à l'activation de la voie du TLR-9 (Lenert et al., 2005).

C'est quelques années plus tard, en 2007, que l'équipe de C. Mauri identifie de manière plus précise les cellules responsables de la sécrétion d'IL-10 dans un modèle murin d'arthrite induite par le collagène (Evans et al., 2007). Dans cette étude, les LB spléniques produisant de l'IL-10 en réponse à une stimulation *in vitro* par du collagène d'origine bovine ont un phénotype CD19⁺CD21^{hi}CD23⁺CD24^{hi}CD93⁺, et appartiennent aux T2-MZP. Dans leur modèle, le transfert de ces cellules de souris en rémission à des souris au moment de l'induction de la maladie, empêche son développement chez 60% des souris, mais inhibe également la prolifération et la sécrétion d'IFN γ par les LT *in vitro*. De la même manière, c'est dans un modèle murin de lupus (MRL/lpr) que la même équipe a démontré que des LB T2 pré stimulés par un anti-CD40 *in vitro* et transférés à des souris malades permettaient d'améliorer la maladie et la survie de façon IL-10-dépendante (Blair et al., 2009). Toutes ces données suggèrent donc que, chez la souris, les LB ayant un effet régulateur sont en majorité contenu dans les LB T2-MZP.

- **Les LB CD5⁺CD1d^{hi} (ou B10)**

Pendant la même période, l'équipe de T. Tedder a identifié un autre groupe de cellules B régulatrices impliquées dans des phénomènes d'hypersensibilité de contact (Yanaba et al., 2008). L'hypersensibilité de contact est une réaction inflammatoire médiée par les LT, se développant après sensibilisation initiale par de l'oxazolone et nécessitant une restimulation. Dans cette étude, l'inflammation locale a été étudiée dans différents modèles de souris : des souris déficientes en CD19 (CD19^{-/-}), des souris surexprimant le CD19 (hCD19Tg), et des souris sauvages. Ils ont ainsi montré que dans les souris CD19^{-/-} l'inflammation était significativement augmentée et prolongée, alors que chez les souris hCD19Tg, elle était réduite de manière importante. Cette diminution était corrélée à une augmentation de LB CD1d^{hi}CD5⁺IL-10⁺. Le transfert adoptif de ces cellules aux souris CD19^{-/-} permettait une réduction importante de l'inflammation de manière IL-10 dépendante. Ces cellules (nommées « B10 ») représentent environ 1 à

2% des splénocytes et 7 à 8% des LB de la cavité péritonéale des souris sauvages. A noter que les LB CD5⁺ avaient déjà auparavant été impliqué dans la sécrétion d'IL-10 et l'inhibition de l'activation des DCs (Sun et al., 2005).

Par la suite l'équipe de T. Tedder a rapporté l'existence de cette population dans différents modèles animaux de maladies auto immunes dont l'EAE (Matsushita et al., 2008; Matsushita et al., 2010; Watanabe et al., 2010).

Malgré des différences phénotypiques et fonctionnelles avec les T2-MZP (expression du CD23, modalités de stimulation), il ne semble pas exclu que ces deux sous populations régulatrices puissent provenir d'un progéniteur commun (expression commune du CD21, CD24, CD1d) (Mauri, 2010; Mauri and Bosma, 2012). De plus, il est possible que ces différentes populations jouent un rôle différent en fonction du type de maladie auto-immune et de l'organe où elles interviennent.

- **Les LB TIM1⁺**

Les protéines de la famille TIM (T cell Ig domain and Mucin domain) représentent une famille de molécules de costimulation jouant un rôle important dans la différenciation des LT CD4⁺ effecteurs. Leur fonction sur les autres populations cellulaires reste cependant mal connue. Récemment, deux équipes, américaine et japonaise, ont montré que TIM-1, chez la souris, était exprimé par une large majorité des LB IL-10⁺ (environ 70%) (Ding et al., 2011). De plus, dans cette étude, les LB TIM-1⁺ sont capables de transférer directement une tolérance d'allogreffe d'ilots pancréatiques de manière IL-10 dépendante. Le rôle de TIM-1 dans la régulation dépendante des LB a été confirmé cette année (Xiao et al., 2012). Cette étude a démontré que le domaine mucique de TIM-1 est crucial pour la production d'IL-10 par les LB, et qu'en l'absence de ce domaine, les souris mutantes peuvent développer des manifestations auto-immunes systémiques sévères (Xiao et al., 2012). A notre connaissance, chez l'homme, l'expression de TIM-1 par les LB régulateurs (Bregs) n'a pas encore été rapportée.

Année / Auteurs	Modèles animaux	Homme
1974 (Neta)	Effet suppresseur des LB (Hypersensibilité retardée)	
1996 (Wolf)	Effet des LB sur la rémission (EAE) Phénotype non décrit	
2000 (Mizoguchi)	Voie du CD40 et B7-2	
2002 (Mizoguchi, Fillatreau)	CD19 ⁺ CD1d ^m IL-10 ⁺ (colite) CD19 ⁺ IL-10 ⁺ / Voie du CD40 (EAE)	
2003-2004 (Mauri, Duddy)	Activation CD40 dépendante Activation Ag dépendante (CIA)	Sécrétion IL-10 par les LB CD40 dépendante (Témoins)
2007 (Mann, Evans)	CD19 ⁺ CD21 ^m CD23 ^m IL-10 ⁺ (CIA)	
2008 (Lampropoulou, Correale, Yanaba, Matsushita)	Activation LB/TLRs (EAE) CD19 ⁺ CD5 ⁺ CD1d ^h IL10 ⁺ (B10) (Hypersensibilité retardée, EAE) Activation Ag dépendante (Hyper.ret., EAE)	LB IL10 ⁺ CD1d ^{hi} (SEP)
2009 (Yanaba, Bouaziz)	Rôle du TLR4 et du CD40 (souris sauvages)	CD19 ⁺ CD27 ⁺ CD38 ⁺ (Témoins) Activation par le TLR9
2010 (Blair, Iwata, Ding)	LB IL10 ⁺ TIM1 ⁺	CD19 ⁺ CD24 ⁿ CD38 ⁿ IL10 ⁺ (Témoins et Lupus) Activation CD40 dépendante CD19 ⁺ CD24 ⁺ CD27 ⁺ IL-10 ⁺ Rôle de l'activation des TLRs (Témoins)
2011 (Matsumoto, Lemoine)	Régulation dépendante de STIM1 et 2	CD19 ⁺ CD24 ^{hi} CD38 ^{hi} CD5 ⁺ (Témoins) Activation CD40 dépendante

Tableau 2 : Marqueurs phénotypiques et voies d'activation des LB régulateurs, rapportés dans la littérature, dans des modèles animaux et chez l'homme. EAE : Encéphalite Auto-immune Expérimentale, CIA : Arthrite induite par le collagène

2. Mécanismes d'activation (Tableau 2)

- Rôle des Toll Like Receptors (TLRs)

Les TLRs interviennent surtout au cours des mécanismes de l'immunité innée en reconnaissant des motifs moléculaires conservés chez des pathogènes. Ils fonctionnent ainsi comme des sentinelles membranaires. Les cellules dendritiques, les macrophages, et les LB expriment ces TLRs et leur protéine de signalisation MyD88 (Lampropoulou et al., 2008; Lemaitre et al., 1996). L'importance de la voie du TLR-9 dans la sécrétion d'IL-10 par les LB de la zone marginale a été établie en 2005, dans un modèle de souris lupiques (Lenert et al., 2005). Une autre étude a ensuite montré que l'activation des TLRs 2, 3, 4, 7 et 9 induisait la sécrétion d'IL-10 par les LB CD5⁺ de souris nouveaux-nés (Zhang et al., 2007).

Quelques années plus tard, il a été démontré que l'activation par la voie du TLR-2, mais également du TLR-4 intervenaient dans la production d'IL-10 mais aussi dans les phénomènes suppressifs médiés par les LB dans des modèles d'EAE et d'hypersensibilité retardée (Lampropoulou et al., 2008; Yanaba et al., 2008).

Par la suite, l'équipe de T. Tedder s'est intéressée de manière très exhaustive à différentes modalités de stimulations (ainsi qu'à différentes durées) permettant la production puis la sécrétion d'IL-10 par les LB CD5⁺CD1d^{hi} (Yanaba et al., 2009). Ils ont ainsi démontré que la maturation des B10 nécessitait une stimulation d'au moins 48h avec du CD40-Ligand ou du Lipopolysaccharide (LPS : activant le TLR-4), mais que la sécrétion en elle même était induite essentiellement par la stimulation par le LPS ajouté à de la PMA, Ionomycine et Monensin (PIM) pendant 5 heures.

- Rôle du CD40

CD40 est un membre de la famille du TNF (Tumor Necrosis Factor), et est exprimé principalement sur les LB et les DCs, mais aussi sur les cellules endothéliales, les macrophages, les LT et les fibroblastes (Banchereau et al., 1994). L'interaction CD40-CD40-L est cruciale pour la production de facteurs solubles, comme les cytokines, les chémokines, mais également pour la sur régulation de molécules de costimulation comme CD80 et CD86 (Banchereau et al., 1994).

La stimulation de la voie du CD40 semble être un pré requis nécessaire à la sécrétion d'IL-10 par les LB dans les modèles animaux. En effet, dans son modèle murin d'EAE, Fillatreau a démontré que des souris chimériques déficientes en LB exprimant

le CD40 n'entraient pas en rémission (Fillatreau et al., 2002). De plus, dans un modèle murin d'arthrite, l'activation de splénocytes par leur antigène et un agoniste anti-CD40 permet l'expansion d'une population produisant de forts taux d'IL-10 (Mauri et al., 2003) dont le transfert inhibe le développement de la maladie chez 80% des souris. Des expériences antérieures, réalisées par la même équipe, avaient déjà montré que le traitement par un anti-CD40 améliorait les symptômes chez les souris immunisées par le collagène II (Mauri et al., 2000). Dans un autre modèle d'auto-immunité, la colite ulcéreuse, le rôle majeur de la voie du CD40 dans les phénomènes suppresseurs médiés par les LB a été confirmé (Mizoguchi et al., 1997; Mizoguchi et al., 2000). En effet, le transfert de LB de souris $TCR\alpha^{-/-}$ est corrélé à une diminution de l'infiltration cellulaire au niveau du colon des souris $TCR\alpha^{-/-}$ déficientes en LB. Le traitement de ces LB transférés avec un anticorps bloquant le CD40 inhibe cet effet régulateur des LB (Mizoguchi et al., 2000). L'étude de Yanaba, s'intéressant aux différentes modalités de stimulation des LB $CD5^{+}CD1d^{hi}$, confirme l'importance du CD40 dans le phénomène de différenciation et de maturation des progéniteurs des B10 (« B10pro »). Ainsi, une stimulation simple de 5h des LB de souris sauvages par du LPS induit une sécrétion d'IL-10 d'environ 2%, alors que la stimulation courte par le CD40-L entraîne une sécrétion 2 fois plus basse. Cependant, la stimulation par ce même CD40-L sur une durée de 48h augmente significativement la sécrétion d'IL-10 (6%) par ces LB et permet ainsi le recrutement et la maturation de progéniteurs de B10 (Yanaba et al., 2009).

- **Rôle de la spécificité antigénique et de la signalisation du BCR**

In vivo, dans les modèles animaux d'EAE et d'hypersensibilité de contact, les fonctions régulatrices des LB apparaissent clairement comme antigène spécifique. En effet, Matsushita *et al* ont montré que le transfert de B10 isolés à partir de souris naïves n'a aucun effet sur l'évolution de l'EAE, contrairement au transfert de B10 provenant de souris immunisées (Matsushita et al., 2010). Dans un modèle d'hypersensibilité retardée, le transfert adoptif de LB $CD5^{+}CD1d^{hi}$ isolés à partir d'une souris pré sensibilisée à un autre antigène n'entraîne aucun effet régulateur chez les receveurs (Yanaba et al., 2008). Le même phénomène a été mis en évidence dans un modèle murin d'arthrite (Evans et al., 2007). Néanmoins, *in vitro*, la génération et l'expansion des B10 ne nécessite pas de stimulation par le BCR. On note même une diminution de la sécrétion d'IL-10 en cas de stimulation par un anti-IgM (DiLillo et

al., 2010; Yanaba et al., 2009). Même si la stimulation du BCR n'est pas requise *in vitro*, une étude a démontrée dans plusieurs modèles de souris KO ou transgéniques (exprimant un seul BCR), que la diversité du BCR, et les signaux générés par le CD19 et la protéine MyD88 étaient nécessaires à la production d'IL-10 par les LB (Yanaba et al., 2009). De même l'expression de CD22, molécule impliquée dans la régulation négative du BCR, intervient dans la suppression dépendante des LB péritonéaux dans un modèle murin d'hypersensibilité de contact (Nakashima et al., 2010).

Le développement et l'expansion de LB-IL-10⁺ dépendent donc en partie de signaux transmembranaires.

- **Rôle des régulateurs calciques STIM1 et 2**

Une des réponses majeures à la stimulation du BCR est l'augmentation du calcium intra cellulaire responsable de l'activation de nombreux facteurs de transcription (Feske, 2007). Cette élévation calcique peut se faire par deux voies : le relargage de calcium du réticulum endoplasmique, ou l'entrée de calcium par la membrane cytoplasmique. Dans le premier cas, cet influx calcique requiert deux molécules de régulation calcique STIM1 et 2 (Brandman et al., 2007; Liou et al., 2005). Dans une étude récente, Matsumoto *et al* ont ainsi montré que, chez la souris, la délétion de ces molécules sur les LB entraînait une incapacité à produire de l'IL-10 en rapport avec un défaut d'activation de NFAT (Nuclear Factor of Activated T cells) alors que le développement et la production d'anticorps par les LB ne sont pas affectés par cette délétion (Matsumoto et al., 2011). Dans un modèle d'EAE, cette délétion est à l'origine d'une exacerbation franche de la maladie (Matsumoto et al, 2011). Ainsi, l'influx calcique dépendant de STIM1 et 2 semble être un signal clé dans les mécanismes de régulation B.

3. Mécanismes suppressifs (Figure 4)

La **sécrétion d'IL-10**, apparaît comme quasiment toujours nécessaire aux mécanismes régulateurs observés dans les modèles animaux de maladies auto immunes, que ce soit *in vitro* ou *in vivo* (cf partie historique et phénotype) (Evans et al., 2007; Fillatreau et al., 2002; Matsushita et al., 2008; Mauri et al., 2003; Yanaba et al., 2008). L'IL-10 exerce ainsi des effets immunosuppresseurs et anti inflammatoires sur la plupart des cellules hématopoïétiques, elle inhibe la production de cytokines Th1 mais prévient aussi les réponses

Th2, la production de cytokines pro inflammatoires par les monocytes/macrophages, et inhibe la présentation antigénique par les CPA professionnelles (DiLillo et al., 2010).

Cependant, d'autres cytokines ont été impliquées dans ces phénomènes suppresseurs. C'est par exemple le cas du **TGF β** . En effet, des LB pré stimulés avec du LPS inhibent la sécrétion de cytokines Th1 et préviennent le développement du diabète de type 1 chez des souris NOD (Non Obese Diabetic). Ces cellules sécrètent de fortes quantités de TGF β mais peu d'IL-10 (Tian et al 2001). De même, les LB non activés sont capables de promouvoir l'expansion des Tregs *in vitro* par l'intermédiaire de l'expression de TGF β -3 (Shah and Qiao, 2008). Récemment, une étude réalisée dans un modèle murin de cancer du sein a permis de mettre en évidence un rôle fondamental des Bregs sécrétant du TGF β dans le développement des métastases (par l'intermédiaire de la conversion de LT en Tregs) (Olkhanud et al., 2011).

Cependant, dans certains modèles de maladies auto immune, les mécanismes de régulation ne passent pas exclusivement par la sécrétion de cytokines mais aussi par le **contact**. Ainsi, dans des modèles d'EAE ou de colite inflammatoire, l'expression des molécules CD80 et de CD86 par les LB est nécessaire à l'entrée en rémission médiée par les LB (Mann et al., 2007; Mizoguchi et al., 2000). Alors que, dans les modèles murins d'arthrite le contact entre les LB régulateurs et les LT CD4⁺ n'apparaît pas nécessaire afin d'obtenir une suppression complète de la maladie (Evans et al., 2007).

Par l'intermédiaire de ces deux modalités - production de cytokines anti inflammatoires et implication de molécules de costimulation - différents effets régulateurs ont été rapportés dans la littérature :

- **Inhibition de la différenciation Th1**

Cet effet inhibiteur des LB a pour la première fois été suggéré dans un modèle murin d'EAE déficients en LB (μ MT) : en effet, les splénocytes de ces souris présentaient, *in vitro*, une sécrétion plus importante d'IFN γ en comparaison aux souris sauvages (Fillatreau et al., 2002). Ces résultats préliminaires ont par la suite été confirmés dans des modèles murins d'arthrite et de lupus, dans lesquels le transfert de LB pré stimulés par un anti-CD40 entraînait, par l'intermédiaire de l'IL-10, une inhibition de la différenciation Th1 mais aussi de la prolifération des LT (Blair et al., 2009; Blair et al., 2010; Evans et al., 2007; Mauri et al., 2003). Cette inhibition de la sécrétion de TNF α et d'IFN γ , dépendante de l'IL-10, a également été retrouvée *in vitro* dans un modèle d'EAE MOG (Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein), sans cependant de suppression de la prolifération des LT CD4⁺ (Matsushita et al., 2010).

- Inhibition de la différenciation Th17

C'est dans un modèle d'EAE anti MOG, qu'il a été démontré pour la première fois que la déplétion des LB avant l'induction de l'EAE augmentait significativement le taux de LT CD4⁺ IL-17⁺ infiltrant le SNC (Matsushita et al., 2008). Par la suite, grâce à un modèle de souris chimériques B IL-10^{-/-} arthritiques, l'implication des LB dans la balance entre Tregs/Th17-Th1 a été confirmée (Carter et al., 2011).

- Induction de cellules T régulatrices

En plus de l'inhibition de la différenciation des LT pro inflammatoires, les LB régulateurs permettent de rétablir l'homéostasie entre Tregs/T pro inflammatoires. En effet, dans les modèles murins d'EAE, les souris déficientes en LB présentent un retard dans l'émergence de Tregs Foxp3⁺ au sein du SNC (Mann et al., 2007). Une étude plus récente, a mis en évidence, dans un modèle de souris chimériques B IL10^{-/-} arthritiques, une diminution du nombre absolu de Tregs CD4⁺ Foxp3⁺ et du niveau d'expression de foxp3 dans les ganglions drainant le site de l'inflammation (Carter et al., 2011). Dans un modèle murin de tolérance orale, il a également été observé une diminution de la génération de Tregs Foxp3⁺ chez les souris déficientes en LB, alors que le transfert adoptif de LB rétablit le développement de ces Tregs (Sun et al., 2008). Cette expansion des LT régulateurs naturels Foxp3⁺, mais aussi d'autres populations T régulatrices (Tr1 Foxp3⁻, CD3⁺ NK1.1⁺, CD4⁺CD8α⁺) après transfert de LB a été également retrouvé dans des modèles murins de lupus et de colite (Scapini et al., 2011; Watanabe et al., 2010; Wei et al., 2005). Enfin, une étude plus récente a également démontrée, dans un modèle murin de cancer du sein, que les Bregs infiltrant la tumeur induisaient la conversion de LT naïfs CD4⁺ en Tregs Foxp3⁺ (Olkhanud et al., 2011).

- Induction d'apoptose ou d'anergie des LT CD8⁺ et CD4⁺

Concernant les interactions des LB avec les LT CD8⁺, une étude a montré que les LB activés *in vitro* par du LPS induisent un état d'anergie chez les LT CD8⁺. Cette induction est corrélée à l'expression de TGFβ-1 à la surface des LB (Parekh et al., 2003).

De même, dans un modèle de souris exprimant sur les LB un CMH-II spécifique de la MOG 35-55, il a été montré que, *in vivo*, suite à l'interaction des LT CD4⁺ naïfs anti MOG avec des LB, il existait une activation partielle des LT et une augmentation de l'expression de molécules de régulation négative comme PD-1 et CTLA-4. Les LT

deviennent alors sensibles à la mort cellulaire induite par l'activation et sont délétés après nouvelle rencontre antigénique (Frommer et al., 2008).

- Effet inhibiteur sur les cellules dendritiques

Le rôle suppresseur des LB peut également passer par l'intermédiaire d'autres populations cellulaires. En 2000, une étude a comparé la réponse immunitaire T induite par un antigène présenté par des DCs, chez des souris sauvages ou déficientes en LB (Moulin et al., 2000). Les LT des souris LB^{-/-} ne sécrétaient pas d'IL-4, contrairement aux LT des souris sauvages. L'injection de DCs des souris LB^{-/-} à des souris sauvages reproduisait ce profil cytokinique. Ces données suggèrent que les LB régulent la capacité des DCs à promouvoir la sécrétion d'IL-4 par les LT. Dans le même esprit, les LB activés par des radiations UV inhibent l'activation des LT Th1 induite par les DCs (Byrne and Halliday, 2005).

Plus récemment, une étude a montré que les LB CD5⁺CD1d^{hi} IL-10⁺ pouvaient réguler la capacité des DCs à présenter l'antigène aux LT dans un modèle de souris EAE/MOG. En effet, la coculture de LB CD5⁺CD1d^{hi} IL10⁺ avec des DCs en présence de MOG diminue la capacité de présentation antigénique et de stimulation de ces cellules. En effet, les auteurs ont observé une diminution franche de la prolifération des LT anti MOG quand ils sont par la suite cultivés avec ces mêmes DCs (Matsushita et al., 2010). Il semble donc bien exister un rôle suppresseur des LB sur la fonction des DCs.

4. Développement et différenciation des LB régulateurs

Chez la souris, Yanaba *et al* ont démontré que la sécrétion d'IL-10 par les LB régulateurs CD5⁺CD1d^{hi} (B10) dépendait d'une stimulation *in vitro* courte de 5h par le LPS, associé à de la PMA, Ionomycine, et Monensin (PIM). Cependant, la différenciation et la maturation de progéniteurs de LB régulateurs (proB10) peut être induite en stimulant pendant 48h ces cellules par la voie du CD40 ou du TLR-4 (Yanaba et al., 2008). Ces cellules sont alors ensuite capables de sécréter de l'IL-10 après une nouvelle stimulation courte de 5h par du LPS+PIM (Yanaba et al., 2009).

Récemment, la même équipe a démontré, grâce à l'utilisation de souris Tiger (expression cytoplasmique de GFP concomitant de la transcription d'IL-10), que les cellules B IL-10⁺ ont la capacité de se différencier en plasmocytes et plasmablastes sécrétant des anticorps poly-réactifs de type IgM ou Ag-spécifiques de type IgM ou IgG (Maseda et al., 2012). Les LB

régulateurs IL-10⁺ ont ainsi la capacité de réguler la réponse immunitaire en deux vagues successives. La première, par l'intermédiaire d'une production transitoire d'IL-10, et la deuxième en promouvant la clairance antigénique par la production d'anticorps spécifiques ou poly-réactifs.

BAFF est un membre de la famille des TNF, et un régulateur clé de la maturation des LB. Il a été démontré que cette molécule, à basse concentration, jouait un rôle probablement majeur dans la différenciation et la survie des LB IL-10⁺CD5⁺CD1d^{hi}, *in vitro* et *in vivo*, et pourrait ainsi représenter une cible thérapeutique pour l'expansion de ces cellules régulatrices dans le traitement des maladies auto-immunes (Yang et al., 2010).

Les résultats des nombreuses études réalisées chez l'animal ont permis de montrer que les LB régulateurs sécrétant de l'IL-10 avaient une fonction probablement déterminante dans la prévention du développement de maladies auto-immunes, ou dans le développement de cancers. Les multiples mécanismes d'actions rapportés expliquent parfaitement le rôle de ces cellules dans les mécanismes de tolérance immunitaire.

Cependant, chez l'homme, même si leur existence a été démontrée, leur phénotype, leur mode d'actions et leurs voies d'activation restent relativement peu décrits. De plus, leur éventuelle implication dans le développement de maladies auto-immunes reste à ce jour un mystère.

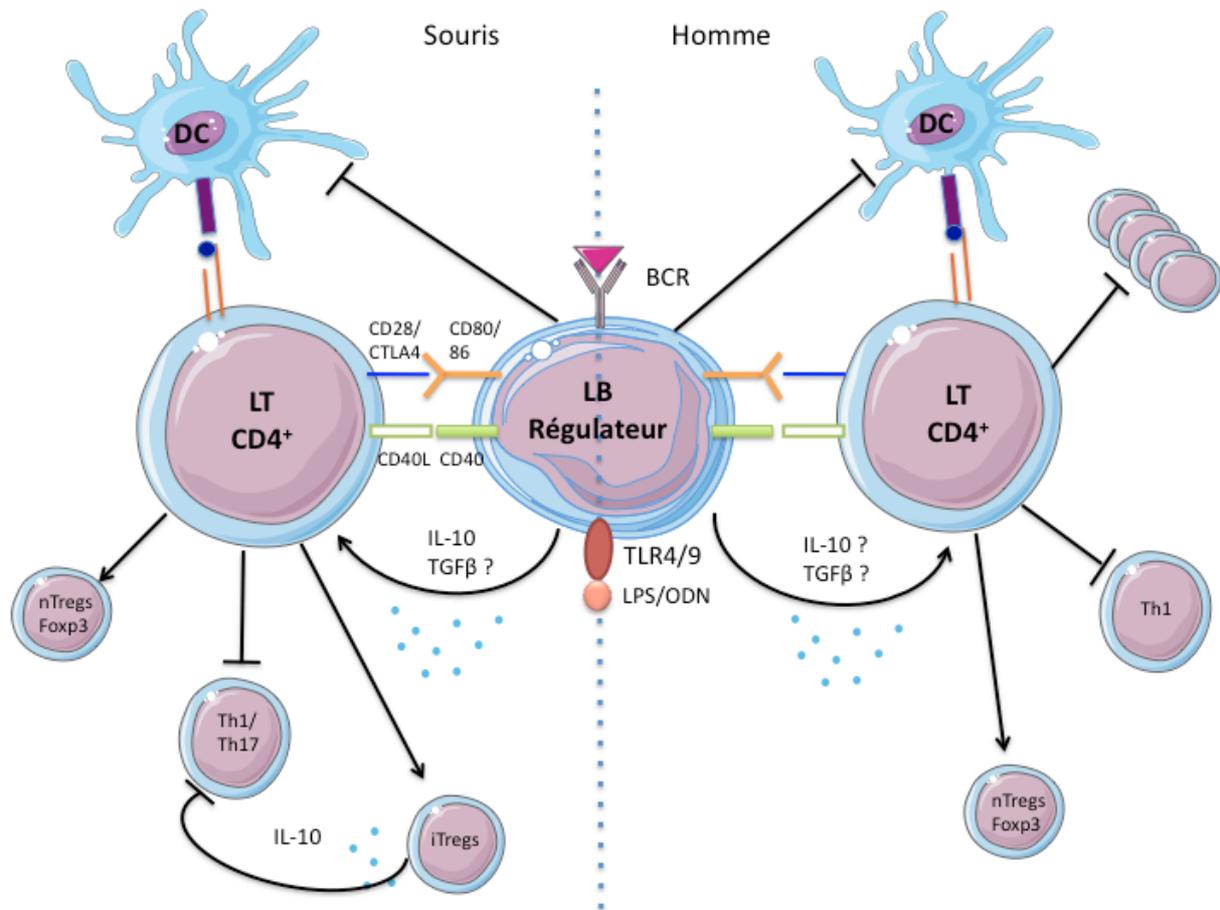


Figure 4 : Mécanismes suppressifs des LB régulateurs sur les LT $CD4^+$ identifiés chez l'animal et l'homme. Chez la souris (à gauche), les LB régulateurs exercent leurs mécanismes suppressifs par la sécrétion d'IL-10 et de TGF β , par la voie du CD40 et probablement via des contacts avec les LT. Leurs effets sont multiples : (1) inhibition de la différenciation Th1 et Th17, (2) inhibition de la différenciation des DCs et de leur activation et (3) probable induction de LT régulateurs naturels. Concernant l'homme, les mécanismes d'actions de ces cellules sont moins clairs et restent à confirmer : (1) très probable inhibition de la prolifération des LT $CD4^+$, (2) probable inhibition de la différenciation Th1, (3) expansion des LT régulateurs Foxp3 $^+$ et (4) inhibition de la différenciation des DCs et de leur activation.

1.3 Les Lymphocytes B régulateurs chez l'Homme

1. Identification d'une population de LB régulateurs chez l'Homme

L'existence de cellules B régulatrices et leur importance dans le développement des maladies auto-immunes chez l'animal semblent donc maintenant bien établies. Chez l'homme, des arguments indirects amènent à penser que ces populations de LB régulateurs existent également.

Premièrement, des exacerbations de colites ulcéreuses ont été observées chez des patients traités par des anticorps monoclonaux anti-CD20, déplaçant les LB. De même, des apparitions de colites ulcéreuses ont été déclenchées par ce même traitement chez des patients traités pour des lymphomes et des maladies de Graves (Ardelean et al., 2010; Blombery et al., 2011; El Fassi et al., 2008; Goetz et al., 2007). Ces cas de colites suggèrent ainsi que le traitement par anti-CD20 pourrait avoir induit une déplétion de LB régulateurs présents dans l'intestin à l'origine d'une inflammation localisée.

Deuxièmement, plusieurs articles ont rapportés l'existence de LB sécrétant de l'IL-10 de manière spécifique chez l'homme (DiLillo et al., 2010). Comme pour les LT, des profils cytokiniques distincts, dépendants de l'environnement, ont été décrits. Ainsi, la stimulation par la voie du CD40 seule, en l'absence de reconnaissance antigénique spécifique, est responsable d'une sécrétion majoritaire d'IL-10 par les LB. Au contraire, une stimulation double par le CD40 et le BCR entraîne plutôt une production de TNF α , d'IL-6 et de lymphotoxine (Duddy et al., 2007; Duddy et al., 2004).

Plusieurs études ont ensuite rapporté des diminutions de sécrétion d'IL-10 par les LB dans différentes maladies auto-immunes dont la SEP (Correale et al., 2008; Duddy et al., 2007).

2. Caractérisation des LB régulateurs chez l'Homme (Tableau 1, Figure 4)

- Caractérisation Phénotypique

La première véritable description fonctionnelle et phénotypique de l'existence de LB ayant des fonctions suppressives chez l'Homme a été faite par l'équipe de C. Mauri (Blair et al., 2010). Dans cette étude, les auteurs se sont en effet intéressés aux propriétés fonctionnelles régulatrices de différents sous-groupes de LB chez des témoins sains, mais également chez des patients atteints de lupus (Blair et al., 2010). Ils ont ainsi montré, chez

14 témoins, que les LB IL-10⁺, après stimulation par la voie du CD40, étaient enrichis spécifiquement dans la population des LB transitionnels/immatures CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi}. Ce phénotype a par la suite été confirmé par une équipe française chez des témoins sains (Lemoine et al., 2011).

Cependant, d'autres études nous amènent à penser que, comme chez l'animal, il existe probablement différents sous-groupes de LB régulateurs avec des modes d'actions différents. En effet, en 2011, l'équipe de T. Tedder s'est attachée à décrire les capacités de sécrétion d'IL-10 des LB de témoins sains, en fonction de différentes modalités de stimulation. Ils ont ainsi mis en évidence qu'une sécrétion optimale d'IL-10 était obtenue par stimulation par la voie du CD40 et la voie du TLR-9 pendant 48h (de l'ordre de 7%), ce qui permet, comme chez souris, la différenciation de B10pro en B10, alors qu'une stimulation de 5h par la voie du TLR-4 ou du TLR-9 permet uniquement le recrutement de B10 (de l'ordre de 1%) (Iwata et al., 2011). La caractérisation phénotypique de ces cellules sécrétant de l'IL-10 a permis de souligner un phénotype plutôt mémoire CD24^{hi}CD27⁺, avec également une fréquence de B10 et de B10pro dix fois plus élevée dans le sous-groupe des LB mémoires. En utilisant une stimulation de 5h passant par le TLR-9, Bouaziz *et al* confirme l'expression de CD27 par les cellules sécrétant de l'IL-10, et retrouve également une forte expression de CD38, marqueur d'activation (Bouaziz et al., 2010). Cependant, les LB IL-10⁺ se répartissent dans les différents sous-groupes de cellules B et ne sont pas restreintes au compartiment mémoire ou transitionnel/immature, contrairement aux précédentes études.

- Caractérisation fonctionnelle

Dans l'étude de Blair *et al*, les LB transitionnels sont capables d'inhiber la sécrétion d'IFN γ et de TNF α par les LT CD4⁺CD25⁻ *in vitro* et de manière « dose dépendante » (Blair et al., 2010). Cet effet suppressif est partiellement dépendant de la sécrétion d'IL-10 (uniquement pour la sécrétion de TNF α), mais aussi de l'engagement de CD80 et CD86 (pour la sécrétion de TNF α et d'IFN γ). De manière intéressante, cette même population isolée chez des patients lupiques présentait un défaut de suppression. Cette inhibition de la différenciation Th1 à la fois IL-10 et "contact dépendante" a été retrouvée par Lemoine *et al*, avec également une inhibition de la prolifération des LT CD4⁺ uniquement "contact dépendante" (mais non IL-10 dépendante) (Lemoine et al., 2011). A noter cependant, que contrairement à l'étude de Blair *et al*, cet effet régulateur n'apparaît qu'à 5 jours. Ces mécanismes d'inhibition passent par l'activation des LB par la voie du CD40. Les auteurs

ont de plus rapporté une expansion de LT régulateurs CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ en présence des LB pré activés, comme il a pu être décrit chez la souris (Lemoine et al., 2011). Ces résultats sont en accord avec des études précédentes ayant démontré que des LB humains activés par le CD40, ou exprimant fortement CD25 entraînaient le développement et l'expansion de LT CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ (Kessel et al., 2012; Tu et al., 2008; Zheng et al., 2010).

Cependant, des résultats différents ont été retrouvés concernant l'effet des Bregs sur les LT CD4⁺Th1 (Iwata et al., 2011). Ainsi, l'étude fonctionnelle des B10 de Tedder *et al* a démontré une régulation uniquement de la sécrétion de TNF α des LT CD4⁺ par les LB pré activés 24h, et cela indépendamment de leur phénotype (mémoire ou non) et de la sécrétion d'IL-10 (Iwata et al., 2011). Par contre, cette étude a rapporté une diminution de la production de TNF α par les monocytes en présence de LB CD24^{hi}CD27⁺ spécifiquement pré activés et de manière IL-10 dépendante cette fois-ci.

Comme retrouvé chez la souris, une étude récente a rapporté un effet régulateur des LB, *in vitro* sur la maturation et la fonction des DCs de manière contact dépendante. En effet, des LB humains activés (par les voies du CD40 et du TLR9) peuvent moduler la maturation des DCs, diminuer leur expression de molécules de costimulation et d'activation, et inhiber la prolifération des LT induite par les DCs (Morva et al., 2012). Ces données suggèrent que les LB humains peuvent réguler l'inflammation induite par les DCs.

Il existe donc des différences notables entre les différentes études, que ce soit concernant le phénotype des LB IL-10⁺, mais également concernant leur mode d'action. Deux raisons principales peuvent expliquer ces apparentes contradictions :

- Tout d'abord, les paradigmes de stimulation utilisés pour l'étude de la sécrétion d'IL-10 sont très différents (durées et modalités). Il en est de même pour les protocoles de coculture rapportés, qui sont réalisés après tri de sous populations présélectionnées sur leur phénotype (soit transitionnels, soit mémoires), pré activées dans certains cas, et avec des modalités de stimulations des LT également différentes.
- De plus, il semble très probable, comme démontré chez l'animal, qu'il existe différentes sous populations de LB régulateurs avec des modes d'actions différents.

Il apparaît donc nécessaire de standardiser au plus vite les protocoles de stimulation de ces cellules. Des études supplémentaires, sont à ce jour indispensables pour mieux caractériser ces différentes populations de LB régulateurs, mais également pour déterminer leur éventuelle implication dans les maladies auto-immunes chez l'homme.

2- Les lymphocytes T régulateurs

Il existe maintenant des preuves substantielles concernant les effets suppresseurs exercés par les LT sur leurs homologues auto-réactifs. Bien que ce concept de LT régulateurs ne soit pas nouveau en immunologie, de nombreuses controverses ont foisonné pendant des années, que ce soit pour savoir si ces cellules constituaient réellement une entité distincte dans le système immunitaire, ou concernant leur importance et leur rôle dans le contrôle de l'auto-immunité. La découverte du facteur transcriptionnel Foxp3 et des conséquences de son absence chez la souris ou chez l'homme ont mis en partie fin à ce débat.

A ce jour, de nombreuses populations lymphocytaires T aux capacités régulatrices ont pu être identifiées. Les mieux connus étant les LT régulateurs naturels Foxp3⁺ (nTregs). Dans cette partie, je vais rapidement résumer les différentes sous populations de LT régulateurs identifiées à ce jour. Je m'attacherai par la suite à expliciter les connaissances actuelles sur le développement, l'homéostasie et les fonctions des nTregs. Ces cellules sont en effet les mieux identifiées à ce jour et jouent un rôle incontestable et central dans l'homéostasie du système immunitaire. Elles ont par ailleurs fait l'objet d'un de nos travaux dans la SEP.

2.1 Les différentes sous populations de LT régulateurs (Tableau 3)

Suite à la mise évidence dans les années 1980 d'une population de LT régulateurs naturels d'origine thymique, on a observé une forte résurgence dans l'intérêt porté à ces cellules. Depuis, des myriades de sous populations lymphocytaires T ont été décrites comme possédant des activités de régulation. Le tableau ci-dessous résume l'origine, mais aussi les caractéristiques phénotypiques et les mécanismes d'actions de ces cellules, en l'état de nos connaissances actuelles, chez l'homme.

Sous populations	Origine	Phénotype/ Caractéristiques	Mécanismes d'actions
LT CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺	Thymique	- Foxp3 ⁺ / Anergie - CD25 ⁺ CD127 ⁻ CTLA4 ⁺ - GITR ⁺ - Helios ⁺	- Sécrétion cytokines - Cytolyse (Granzyme, perforine) - Inhibition maturation DC - Perturbation du métabolisme
LT CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ induits	Induction/TGFβ ou Stimulation par DC immature	- Foxp3 ⁺ - CD25 ⁺ - Helios ⁻	- Sécrétion IL-10, TGFβ - Contact dépendant
LT CD4⁺ IL-10⁺ (Tr1)	Induction/IL-10, IFNα ou IL-27, Stimulation par DC immature	- CD4 ⁺ /Anergie - Foxp3 ⁻ , CTLA-4 ⁺ - Spécifique Ag	- Sécrétion IL-10 ⁺⁺⁺ , TGFβ ⁺ , IL-5 - Contact dépendant - Cytolyse (Granzyme B, perforine)
LT CD4⁺ TGFβ⁺ (Th3)	Induction/ TGFβ-IL-4-IL-10 ou stimulation par DC immature	- CD4 ⁺ , - CTLA-4 ⁺ , LAP ⁺ , Foxp3 ⁻ - Spécifique Ag	- Sécrétion TGFβ ⁺⁺⁺ , IL10 ⁺ , IL4 ⁺
LT CD8⁺IL-10⁺	stimulation par pDC	- CD8 ⁺ /CCR7 ⁺	- Sécrétion IL-10
LT CD8⁺CD28⁻	Stimulation répétée	- CD8 ⁺ CD28 ⁻ - Foxp3 ⁺ - Spécifique Ag	- Inhibe costimulation/CPA - Contact dépendant
LT CD8⁺CD25⁺Foxp3⁺	Thymique	- CD25 ⁺ Foxp3 ⁺ CTLA-4 ⁺ - GITR ⁺	- Contact dépendant
LT CD3⁺HLA-G⁺	Thymique	- CD8 ⁺ ou CD4 ⁺ - CD25 ⁻ , Foxp3 ⁻ - Hypoprolifératives	- Facteurs solubles dont HLA-G
LT CD3⁺CD4⁻CD8⁻	Thymique/induite	- CD4 ⁻ CD8 ⁻ CD161 ⁻ - CTLA4 ⁺ - Spécifique Ag	- Cytolyse (Fas-FasL, Voie granzyme / perforine) - Sécrétion IFNγ - Inhibe costimulation/DC
NKT	Thymique	- CD161 ⁺ - TCR semi invariant : reconnaissance Ags glycolipidiques	- inhibe LT Th1, LT CD8 ⁺ , (+) nTregs - Sécrétion TGFβ, IL-2 - inhibe maturation DC
LT γδ	Thymique	- CD4 ⁻ CD8 ⁻	- Sécrétion IL-10, TGFβ - Cytolyse (Fas/FasL) - Signalisation TLR

Tableau 3 : Description phénotypique et mécanismes d'actions des LT régulateurs connus à ce jour.

2.2 Les LT CD4⁺Foxp3⁺ régulateurs naturels

1. Identification et caractérisation phénotypique

- Identification des LT suppresseurs CD4⁺CD25⁺

L'implication des LT dans les mécanismes de tolérance a été mise en évidence pour la première fois dans les années 1980. En effet, des maladies auto-immunes ont pu être générées chez les rongeurs par la déplétion de certaines sous populations lymphocytaires T du système immunitaire (McKeever et al., 1990; Sakaguchi et al., 1985; Sugihara et al., 1988). Par exemple, l'élimination de LT CD4⁺CD25^{high} ou de LT CD4⁺CD45RB^{low} entraîne l'expansion de LT CD4⁺ auto-réactifs et le développement d'une altération sévère de l'état général chez la souris, accompagnée d'atteintes auto-immunes (Morrissey et al., 1993; Powrie et al., 1993). La reconstitution, chez ces souris, de la population absente permet de prévenir le développement de l'auto-immunité. Ces premières études ont montré que des LT CD4⁺ pathogéniques auto-réactifs sont présents en périphérie et que leur expansion est contrôlée par d'autres sous populations de LT CD4⁺.

Des efforts importants dans le domaine de la recherche ont ensuite permis de démontrer que CD25 (IL-2R α), qui est exprimé par 5 à 10% des LT CD4⁺ circulants chez la souris, permet de différencier des LT régulateurs des autres populations (Asano et al., 1996; Itoh et al., 1999; Sakaguchi et al., 1995; Suri-Payer et al., 1998). Ainsi, le transfert de LT ou de thymocytes déplétés en LT CD25⁺ d'une souris normale à une souris *nude* déficiente en LT entraîne le développement de différentes maladies auto-immunes. Au contraire, le transfert de LT CD4⁺CD25⁺ permet de prévenir le développement de cette auto-immunité (Itoh et al., 1999; Sakaguchi et al., 1995). De même, le transfert isolé de LT CD4⁺CD25⁻ induit une colite inflammatoire chez les souris déficientes en LT et en LB (Singh et al., 2001). *In vitro*, ces cellules CD4⁺CD25⁺ présentent un état d'hypoprolifération suite à une stimulation par le TCR, et cet état naturel d'anergie est reversé par l'ajout de fortes doses d'IL-2 ou d'anti-CD28 (Itoh et al., 1999; Takahashi et al., 1998; Thornton and Shevach, 1998). Toujours *in vitro*, ces LT CD4⁺CD25⁺ inhibent la prolifération des LT CD4⁺CD25⁻ et des LT CD8⁺, de manière contact dépendante (Takahashi et al., 1998; Thornton and Shevach, 1998).

En 2001, cette population régulatrice a pu être identifiée chez l'homme. Les LT CD4⁺CD25⁺ présentent les mêmes caractéristiques que chez la souris : un état d'anergie levé par de fortes doses d'IL-2, une capacité à inhiber la prolifération et la sécrétion

d'IFN γ par les LT CD4⁺CD25⁻ de manière contact dépendante, et l'expression de marqueurs d'activation comme HLA-DR, CD45RO, et CTLA-4 (Baecher-Allan et al., 2001; Dieckmann et al., 2001; Jonuleit et al., 2001; Levings et al., 2001; Stephens et al., 2001). Cependant, contrairement à la souris, tous les LT CD4⁺CD25⁺ ne possèdent pas de fonction régulatrice, et les cellules véritablement suppressives se situent essentiellement dans la fraction CD25^{high} qui ne représente que 2% environ des LT CD4⁺ (Baecher-Allan et al., 2001). La sélection de ces cellules chez l'homme reste donc assez difficile, et un marqueur spécifique manque encore à l'appel.

- **Foxp3 : un marqueur spécifique ?**

L'identification des LT régulateurs naturels a été bouleversée par la description d'un facteur de transcription spécifique de cette population régulatrice : Foxp3 (Forkhead-winged-helix family transcription factor P3). En effet, une mutation du gène codant cette protéine est à l'origine d'un syndrome auto-immun léthal chez la souris (Brunkow et al., 2001), accompagné d'un déficit en LT CD4⁺CD25⁺ (Fontenot et al., 2003; Khattri et al., 2003). Chez l'homme, des mutations de ce gène sont à l'origine d'un désordre auto-immun récessif, nommé « syndrome IPEX » (Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X linked) (Bennett et al., 2001; Brunkow et al., 2001; Wildin et al., 2001). Ce syndrome associe, comme son nom l'indique, des atteintes auto-immunes touchant différents organes (diabète de type 1, thyroïdite, colite, ainsi que des allergies sévères et des infections). Ce facteur de transcription Foxp3 semble donc impliqué dans la régulation de l'auto-immunité. C'est en 2003 que plusieurs équipes ont mis en évidence que Foxp3 était exprimé spécifiquement par les LT CD4⁺CD25⁺ régulateurs chez la souris (Fontenot et al., 2003; Hori et al., 2003; Khattri et al., 2003).

Par la suite, le développement d'anticorps utilisables en cytométrie dirigés contre Foxp3, ainsi que celui de souris transgéniques Knock-In (KI) pour une molécule de Foxp3 fluorescente ont permis de mieux définir et caractériser ce groupe de cellules T régulatrices (Fontenot et al., 2005). Chez la souris, il existe une très bonne corrélation entre l'expression de Foxp3 et CD25, même si environ 10% des LT Foxp3⁺ sont CD25⁻, et que 10% des LT CD4⁺CD25⁺ sont Foxp3⁻. Chez l'homme, la situation est plus complexe, car il existe une fraction de LT CD4⁺CD25^{int} qui expriment Foxp3 (Liu et al., 2006). Une autre différence importante avec la souris est que, chez l'homme, l'expression de Foxp3 peut être induite de manière transitoire par les LT effecteurs activés (Allan et al., 2007; Gavin et al., 2006; Wang et al., 2007). Cette population induite Foxp3⁺ n'est ni anergique,

ni suppressive *in vitro*, et n'exprime pas non plus les mêmes marqueurs de surface que les nTregs. De plus, les taux d'expression de Foxp3 sont significativement plus bas que ceux des nTregs. Foxp3 peut également être induit en périphérie chez des LT naïfs, après stimulation en présence de TGF β (Apostolou and von Boehmer, 2004; Chen et al., 2003; Kretschmer et al., 2005). Ces Tregs induites présentent alors toutes les caractéristiques des nTregs, mais sont plus instables sur le plan fonctionnel (Floess et al., 2007).

L'expression transitoire de Foxp3 apparaît donc comme une conséquence normale de l'activation des LT, mais peut aussi être induite en périphérie chez des LT naïfs qui deviennent alors régulateurs. De plus, d'autres voies transcriptionnelles, indépendantes de Foxp3, contribuent au développement des nTregs (Hill et al., 2007). Foxp3 seul ne constitue en effet pas un marqueur suffisant des nTregs humaines, et l'identification de ces cellules nécessite l'utilisation d'autres marqueurs cellulaires (Vignali et al., 2008).

- Autres marqueurs des nTregs

Une des difficultés majeures dans la caractérisation des nTregs a été l'identification de marqueurs de surface cellulaire permettant d'isoler des populations purifiées, sans avoir à effectuer un marquage Foxp3 intra-cellulaire nécessitant une perméabilisation. Beaucoup de marqueurs d'activation ont ainsi été décrits comme exprimés constitutivement par les nTregs : CTLA-4, GITR (Glucocorticoid-Induced Tumor necrosis factor Receptor), CD38, CD62L, OX-40L (Lan et al., 2005; Shevach et al., 2006). Par contre, ces molécules de surface ne sont pas spécifiques des nTregs, car également exprimées par les LT activés. L'expression de CD25 a longtemps été utilisée de manière isolée pour identifier les nTregs : seules les LT CD4⁺CD25^{high} (représentant 2% des LT CD4⁺) ont été décrits comme ayant des fonctions suppressives (Baecher-Allan et al., 2001). Il existe cependant des LT CD4⁺ régulateurs Foxp3⁺ exprimant des niveaux moins élevés de CD25 (Liu et al., 2006). Chez l'homme, il a été rapporté que l'utilisation de CD127 (IL-7R) permettait un enrichissement significatif des LT régulateurs Foxp3⁺. Foxp3 interagit avec le promoteur de CD127 et induit une diminution de son expression par les nTregs (Liu et al., 2006). Il existe ainsi une corrélation d'environ 90% entre les LT CD4⁺CD25⁺CD127^{low} et l'expression de Foxp3 (Liu et al., 2006; Seddiki et al., 2006). Ces cellules présentent un effet suppressif important *in vitro* contrairement aux LT CD4⁺CD25⁺CD127⁺ (Liu et al., 2006; Seddiki et al., 2006). Toujours afin d'identifier un marqueur spécifique des nTregs, non exprimé par les LT activés CD4⁺CD25⁺, plusieurs études ont rapporté chez la souris, des taux élevés de FR4 (Récepteur au méthyltétrahydrofolate) sur les nTregs (Tian et al.,

2012; Yamaguchi et al., 2007). L'utilisation d'un anticorps monoclonal dirigé contre la protéine FR4 chez des souris naïves entraîne une disparition spécifique des nTregs et l'apparition de manifestations auto-immunes (Yamaguchi et al., 2007). Cependant, FR4 est également exprimé fortement par les LT CD4⁺Foxp3⁺ induits par le TGFβ (Yamaguchi et al., 2007).

Afin de différencier les nTregs Foxp3⁺ des Tregs Foxp3⁺ induites, un nouveau facteur de transcription a été décrit. Helios est un membre de la famille des facteurs de transcription Ikaros. Récemment, il a été démontré que son expression était spécifique des Tregs Foxp3⁺ d'origine thymique chez la souris et chez l'homme. Il permettrait ainsi de distinguer les LT CD4⁺Foxp3⁺ naturels de ceux induits en périphérie (qui représenteraient environ 30% des LT CD4⁺Foxp3⁺ totaux) (Getnet et al., 2010; Thornton et al., 2010; Verhagen and Wraith, 2010). Ces résultats restent cependant à ce jour controversés puisqu'une étude récente a montré que l'expression d'Helios pouvait être induite sous certaines conditions de stimulation (Zabransky et al., 2012).

- **Sous populations de nTregs**

En 2005, une équipe française a identifié pour la première fois, chez l'homme, une sous population de nTregs naïves CD4⁺CD25⁺CD62L⁺CD45RA⁺CD45RO⁻ (Valmori et al., 2005). Comme les autres nTregs, ces cellules sont anergiques en l'absence d'IL-2, et exercent des fonctions suppressives contact dépendante. Ces nTregs naïves diminuent proportionnellement avec l'âge. Une autre étude a rapporté que l'expression *ex vivo* de HLA-DR chez les nTregs permettait d'identifier une population fonctionnellement distincte de nTregs matures, impliquées dans des phénomènes précoces de suppression contact dépendant (Baecher-Allan et al., 2006).

Deux autres sous-groupes de nTregs ont été décrits chez l'homme, dans le thymus et en périphérie, en fonction de leur expression de la molécule de costimulation : ICOS (Inducible T cell Costimulator) (Ito et al., 2008). Ainsi les nTregs Foxp3⁺ICOS⁺ produisent de l'IL-10 pour inhiber la présentation d'Ags par les DCs et du TGFβ pour inhiber la prolifération des LT effecteurs, alors que les nTregs ICOS⁻ inhibent uniquement la prolifération des LT effecteurs par la sécrétion et l'expression de TGFβ.

Plus récemment, chez l'homme, l'équipe de Sakaguchi a redéfini les nTregs CD4⁺Foxp3⁺ en 2 sous populations phénotypiquement et fonctionnellement distinctes (Miyara et al., 2009). Les Tregs activés CD45RA⁻Foxp3^{high} meurent rapidement au stade de différenciation terminale alors que les Tregs au repos de phénotype CD45RA⁺Foxp3^{low}

prolifèrent et peuvent s'activer *in vitro* et *in vivo*. De plus cette classification permet d'identifier les cellules $\text{Foxp3}^{\text{low}}\text{CD45RA}^-$, qui, malgré l'expression de Foxp3, n'exercent pas d'effet suppresseur. Cette classification devrait permettre une meilleure compréhension des mécanismes de régulation dans les maladies auto-immunes, et favoriser le développement de stratégies thérapeutiques plus ciblées.

2. Développement thymique et molécules impliquées dans l'homéostasie et la fonction des $\text{LT CD4}^+\text{Foxp3}^+$ régulateurs naturels

- Développement thymique

Une des caractéristiques importantes des nTregs est qu'ils se développent au sein du thymus comme une sous population distincte (Sakaguchi, 2005). Une thymectomie réalisée pendant la période néonatale (2-4 jours après la naissance), au moment où les $\text{LT CD4}^+\text{CD25}^+$ deviennent détectables en périphérie, entraîne chez la souris le développement de maladies auto-immunes. Le transfert de thymocytes ou de $\text{LT CD4}^+\text{CD25}^+$ de souris normales prévient le développement de cette auto-immunité (Asano et al., 1996). En 1999, Itoh *et al* ont mis en évidence le rôle suppresseur des thymocytes $\text{CD25}^+\text{CD4}^+\text{CD8}^-$ (Itoh et al., 1999). Dans cette étude, les thymocytes sont anergiques *in vitro*, et inhibent la prolifération des thymocytes $\text{CD4}^+\text{CD8}^-$ et $\text{CD4}^+\text{CD8}^+$.

Mais à quel moment du développement thymique, ces cellules se différencient-elles ?

Plusieurs études indiquent que les premières étapes d'engagement des thymocytes vers la voie des Tregs se fait tôt au cours du développement thymique au stade de DP (Bensinger et al., 2001; Pennington et al., 2006). Ainsi, dans des modèles de souris transgéniques où l'expression du CMH de classe II est limitée aux cellules épithéliales corticales du thymus, les nTregs se développent normalement (Bensinger et al., 2001; Liston et al., 2008; Ribot et al., 2007). Deuxièmement, l'analyse de souris KI pour un rapporteur de Foxp3 a démontré l'existence de cellules Foxp3^+ dans la fraction DP (Fontenot et al., 2005; Liston et al., 2008). Ces données indiquent donc que le cortex thymique contribue à la sélection positive des nTregs.

Cependant, on sait depuis peu que seule une minorité de nTregs (environ 1% des thymocytes) se développent au stade DP et que pour la plupart, Foxp3 s'exprime dans un sous-groupe de thymocytes SP CD4^+ au niveau de la medulla thymique (Lee and Hsieh, 2009). Ainsi, au niveau de la medulla, cette sélection serait due à la sécrétion par les mTEC de lymphopoiétine stromale thymique (TLSP). Cette cytokine permettrait la sur-

régulation du CMH-II, et l'expression par les DCs de CD80 et CD86. Les mDCs, mais aussi les pDCs, activées induiraient alors la différenciation des thymocytes en LT régulateurs naturels (Hanabuchi et al., 2010; Watanabe et al., 2005).

Le développement des nTregs au sein du thymus est dépendant de la spécificité du TCR. En effet, des souris transgéniques n'exprimant qu'une seule spécificité du TCR et ne pouvant réarranger et exprimer de nouveaux TCR, ne développent pas de nTregs (Alli et al., 2008; Hori et al., 2002; Larkin et al., 2008). Plusieurs groupes ont également montré que le répertoire T des LT effecteurs et des nTregs était très différent (Hsieh et al., 2004; Liu et al., 2009; Pacholczyk et al., 2006) avec un enrichissement significatif de TCR reconnaissant des auto-antigènes pour les nTregs. Ainsi, dans le cortex thymique, la sélection positive de ces cellules est favorisée par des interactions de haute affinité avec le complexe CMH/peptide présenté par les cTEC. Après avoir reçu leur signal de survie, ces cellules migrent dans la medulla où ont lieu les processus de sélection négative permettant l'élimination des TCR auto-réactifs.

Comment les nTregs, présentant un répertoire principalement auto-réactif, échappent-elles à ce processus ? Deux mécanismes ont été évoqués. Le premier est que ces cellules seraient relativement résistantes à la sélection négative par les mTEC et les DCs (Jordan et al., 2001; Romagnoli and van Meerwijk, 2010). La deuxième hypothèse est qu'il existerait au sein de la medulla un processus de sélection positive des précurseurs des Tregs sous le contrôle du promoteur Aire (Aschenbrenner et al., 2007; Romagnoli and van Meerwijk, 2010). Il existe cependant tout de même une sélection négative des précurseurs des nTregs interagissant trop fortement avec les mDCs (Atibalentja et al., 2009).

Ces caractéristiques permettent la génération d'un répertoire régulateur de TCR auto-réactifs adapté à la prévention du développement de pathologies auto-immunes. Après être sortis du thymus, ces nTregs se localisent spécifiquement dans les organes correspondant à leur spécificité de reconnaissance antigénique (Lathrop et al., 2008; Wheeler et al., 2009).

- **Foxp3 : Molécule clé du développement et de la fonction des nTregs ?**

La découverte de Foxp3, comme marqueur « spécifique » des nTregs est relativement récente. Les souris *scurfy* présentent ainsi un déficit profond en LT CD4⁺CD25⁺ (Fontenot et al., 2003). Et, la transduction par un rétrovirus ou l'expression transgénique de Foxp3 dans des LT CD4⁺CD25⁻ ou des LT CD8⁺ permet de convertir ces cellules

(phénotypiquement et fonctionnellement) en « nTregs-like » (Fontenot et al., 2003; Hori et al., 2003). Les LT CD4⁺CD25⁻ transduites avec *Foxp3* sont capables alors d'inhiber la prolifération des LT *in vitro*, mais également de supprimer le développement de maladies auto-immunes *in vivo* (Fontenot et al., 2003; Hori et al., 2003; Khattri et al., 2003). Ce facteur de transcription est donc une molécule clé dans le développement mais aussi la fonction des nTregs qui semble donc être en partie génétiquement programmé.

- Rôle de l'IL-2 et de l'IL-15

CD25 (IL-2R α) a d'abord été décrit comme un marqueur des nTregs (Sakaguchi et al., 1995). Pour ces cellules, CD25 est plus qu'un marqueur d'activation, et semble avoir un rôle crucial dans leur développement, leur survie et leur fonction.

En effet, un déficit en IL-2, CD25 ou CD122 (IL-2R β) entraîne un syndrome auto-immun et lymphoprolifératif fatal qui s'accompagne d'une réduction de la fréquence des LT CD4⁺CD25⁺ dans le thymus et en périphérie (Horak, 1995; Kramer et al., 1995; Suzuki et al., 1995; Willerford et al., 1995). De plus, l'administration d'anticorps bloquants anti-IL-2 à des souris naïves entraîne une diminution du taux de LT CD4⁺CD25⁺ et le développement de désordres auto-immuns (Setoguchi et al., 2005). L'IL-2 est aussi nécessaire à l'activation *in vivo* et *in vitro* des nTregs (Thornton et al., 2004). La principale source d'IL-2 est représentée par les autres sous populations lymphocytaires T (Setoguchi et al., 2005). Ainsi, l'IL-2 sécrété par les LT CD4⁺ effecteurs permet le maintien et l'activation des nTregs, qui, en retour, inhibent la prolifération des LT effecteurs.

La chaîne β du récepteur de l'IL-2 est partagée avec le récepteur de l'IL-15. Les déficits en IL-2 ou IL-2R α entraînent une réduction profonde de la moitié du pool de nTregs, cependant le déficit en CD122, chez la souris est à l'origine d'une déplétion plus marquée du nombre de Tregs Foxp3⁺ (Burchill et al., 2007; Soper et al., 2007). Cette observation implique que l'IL-15 possède un rôle probablement important dans le développement des nTregs. En effet, les souris déficientes en IL-15 présentent également une réduction du nombre de Tregs Foxp3⁺ thymiques (Burchill et al., 2007). L'IL-2 et l'IL-15 sont donc des cytokines indispensables au développement thymique des nTregs. Cette forte dépendance à l'IL-2 ainsi que l'expression de Foxp3 sont des caractéristiques spécifiques des nTregs.

- Rôle de CTLA-4

Une des caractéristiques des LT CD4⁺CD25⁺ est qu'elles expriment de manière constitutive CTLA-4, alors que les LT naïfs n'expriment cette molécule qu'après activation (Read et al., 2000; Takahashi et al., 2000). Plusieurs études ont mis en évidence la contribution de CTLA-4 dans la fonction suppressive des nTregs. L'administration d'anticorps monoclonaux anti-CTLA-4 à des souris naïves entraîne une maladie auto-immune sans réduction du taux de LT CD4⁺CD25⁺ (Takahashi et al., 2000). De plus, ces anticorps inhibent l'action protectrice des LT CD4⁺CD25⁺ dans un modèle murin de maladie inflammatoire intestinale (Read et al., 2000). *In vitro*, le blocage de CTLA-4 inhibe la suppression médiée par les nTregs, que ce soit chez la souris ou chez l'homme (Manzotti et al., 2002; Read et al., 2000; Tang et al., 2004). Tous ces résultats suggèrent que la signalisation par le TCR et CTLA-4 permet l'activation des nTregs.

Un autre effet de CTLA-4, concernant cette fois la fonction des nTregs a été décrit. En effet, CTLA-4 permet l'induction d'IDO en interagissant avec CD80/86 sur les DCs (Fallarino et al., 2003). Cette enzyme catalyse la conversion du tryptophane en différents métabolites, qui exercent un effet immunosuppresseur sur le microenvironnement local (Munn et al., 2004).

- Rôle de CD28

La signalisation passant par CD28 semble indispensable au développement thymique des nTregs ainsi que pour leur survie en périphérie. Le nombre de LT CD4⁺CD25⁺ est significativement réduit dans le thymus et en périphérie chez les souris déficientes en CD28, en CD80/86, et aussi en cas d'utilisation d'anticorps bloquant CD80/86 (Salomon et al., 2000; Takahashi et al., 2000; Tang et al., 2003). Chez la souris NOD, un déficit en CD28 ou CD80/86 accélère le développement du diabète de type 1 (Salomon et al., 2000). Il semblerait ainsi que le déficit en CD28 ou en CD80/86 bloquerait partiellement l'activation des LT effecteurs et entraînerait ainsi une diminution de la production d'IL-2. Cette réduction d'IL-2 serait alors à l'origine d'une altération de la survie des nTregs (Tang et al., 2003).

De manière opposée, une trop forte stimulation de CD28 et du TCR sur les nTregs entraîne une levée de l'anergie et de l'effet suppresseur de ces cellules (Takahashi et al., 1998; Thornton and Shevach, 1998). Ce phénomène permet ainsi à l'organisme de faire la différence entre le « danger » et le « soi ». En effet, les DCs fortement activées exprimant des taux élevés de CD86, activent ainsi les LT effecteurs et lèvent l'anergie des nTregs,

permettant ainsi une réponse immunitaire efficace. Au contraire, les DCs immatures présentant des peptides du soi, expriment faiblement les molécules CD80/86. En l'absence de signaux de danger, elles activent principalement les nTregs et maintiennent ainsi un état de tolérance.

En résumé, de nombreux signaux participent à la sélection et au développement des nTregs. Ainsi, la qualité de signalisation du TCR, mais aussi l'expression de CD28, et d'autres signaux permettent de guider, au sein du thymus, le développement de ces cellules et l'expression de Foxp3, indispensable à leur fonction. Cependant, des zones d'ombre persistent, essentiellement concernant les signaux qui déterminent leur engagement vers la voie des Tregs au niveau du thymus.

La survie et ainsi l'homéostasie de ces cellules est ensuite assurée par la sécrétion d'IL-2 par les cellules environnantes, mais également par la signalisation de certaines molécules (CD28, CTLA-4).

3. Modes d'actions et mécanismes de suppression (Figure 5)

Les cibles des nTregs sont larges et incluent des cellules du système immunitaire inné et adaptatif (Lan et al., 2005). Ainsi, les nTregs doivent être préalablement activés par leur TCR en présence d'IL-2 (Lan et al., 2005; Sakaguchi et al., 1995; Shevach, 2002). Dans des modèles de souris transgéniques pour le TCR, la concentration d'antigène nécessaire pour activer les nTregs a été estimée 10 à 100 fois plus basse que celle nécessaire à l'activation de LT naïfs (Takahashi et al., 1998). Cela suggère que ces cellules peuvent être activées par des DCs immatures dont les niveaux d'expression de CD80/86 et de CMH-II sont normalement trop bas pour activer des LT naïfs. Une fois activées, les nTregs sont alors capables d'inhiber, *in vitro* et *in vivo*, de manière indépendante de l'antigène, la prolifération et la production de cytokines des LT CD4⁺ Th1 et Th2 mais aussi des lymphocytes CD8⁺ (Baecher-Allan et al., 2001; Dieckmann et al., 2001; Jonuleit et al., 2001; Oberle et al., 2007; Stephens et al., 2001; Takahashi et al., 1998; Thornton and Shevach, 2000). D'autres études ont montré que les DCs (cf ci dessous), mais aussi les LB pouvaient également être la cible des nTregs (Gotot et al., 2012). Ainsi, chez la souris, les nTregs peuvent inhiber l'activation et la prolifération des LB auto-réactifs et induire leur apoptose par la voie PD-1/PD-1 Ligand (Gotot et al., 2012; Ludwig-Portugall et al., 2008; Ludwig-Portugall et al., 2009).

Bien comprendre les mécanismes d'actions des Tregs est d'une importance cruciale pour le développement de nouvelles cibles thérapeutiques. Des progrès manifestes ont été fait dans ce domaine ces dernières années. D'un point de vue fonctionnel, les mécanismes suppressifs utilisés par les nTregs peuvent être divisés en 4 groupes : 1) Suppression par sécrétion de cytokines inhibitrices, 2) Suppression par cytololyse, 3) Suppression par modification du métabolisme cellulaire, et enfin 4) Suppression par modulation de la maturation et de la fonction des DCs.

- **Suppression par sécrétion de cytokines « inhibitrices »**

Les cytokines « inhibitrices », comme l'IL-10 et le TGF β , ont fait l'objet d'une attention considérable, en tant que médiateurs des mécanismes suppressifs des nTregs. En effet, la contribution de ces cytokines à la fonction des nTregs reste débattue. Des études *in vitro* avec des anticorps neutralisants, ou des LT ne produisant pas d'IL-10 ou de TGF β , ont suggéré que ces cytokines n'étaient pas indispensables à la fonction des nTregs (Dieckmann et al., 2001; Jonuleit et al., 2001; Thornton and Shevach, 1998). Cependant, ces données sont contradictoires avec les études *in vivo*. Ainsi, dans des modèles d'allergie et d'asthme (Hawrylowicz, 2005), la sécrétion d'IL-10 joue un rôle prédominant dans le contrôle de la maladie. De même dans d'autres modèles de maladies auto-immunes (colite, EAE) (Annacker et al., 2003; Mann et al., 2007; Zhang et al., 2004), mais aussi de tumeurs ou d'hépatite induite (Erhardt et al., 2007; Strauss et al., 2007), la production d'IL-10 par les nTregs semble essentielle à l'établissement d'une tolérance.

En 2008, Rubtsov *et al* ont montré que, chez la souris, l'inactivation des nTregs IL10⁺ était à l'origine du développement de colites spontanées, mais également d'une augmentation des réponses inflammatoires au niveau de la peau et des poumons (Rubtsov et al., 2008). Ils ont ainsi émis l'hypothèse que les nTregs IL10⁺ jouaient surtout un rôle régulateur au niveau des zones d'interface avec l'environnement extérieur et que les mécanismes suppressifs des nTregs dépendaient et de l'organe et du type de pathologie.

Concernant le TGF β , des premières études *in vitro* utilisant des anticorps neutralisants anti-TGF β ou des nTregs TGF β (-) semblaient indiquer que cette cytokine n'était pas requise pour la fonction des nTregs (Piccirillo et al., 2002; Takahashi et al., 1998). Cependant, des études plus récentes contredisent ces données. En effet, dans un modèle murin de colite inflammatoire, les LT effecteurs résistants à l'action du TGF β ne sont pas contrôlés par les nTregs (Fahlen et al., 2005). De même, le TGF β produit par les nTregs

apparaît comme essentiel au contrôle de la réponse immunitaire dans la suppression des réponses allergiques (Joetham et al., 2007) ou la prévention de la colite inflammatoire (Li et al., 2007).

La forme membranaire du TGF β peut également médier la suppression exercée par les nTregs d'une manière contact dépendante. Dans un modèle murin de diabète, les nTregs peuvent ainsi contrôler l'infiltration des LT CD8⁺ au sein des ilots pancréatiques (Green et al., 2003). De plus, l'inflammation des voies aériennes induite par l'ovalbumine est atténuée par l'intermédiaire de l'IL-10 sécrétée par les nTregs mais aussi par la forme membranaire du TGF β (Xia et al., 2007).

Plus récemment, une nouvelle cytokine inhibitrice, l'IL-35, a été décrite. Elle est préférentiellement exprimée par les nTregs, et semble requise pour une activité suppressive maximale (Collison et al., 2007). L'IL-35 est une cytokine hétérodimérique et membre de la famille de l'IL-12. Elle est formée par la combinaison de Ebi3 (Epstein Barr virus induced gene 3) et p35. Les nTregs Ebi3^{-/-} ou p35^{-/-} présentent une activité régulatrice significativement réduite *in vitro*, et ne contrôlent plus la prolifération des LT effecteurs dans un modèle de colite *in vivo* (Collison et al., 2007). Il est également important de noter que l'IL-35 est suffisante à l'activité régulatrice des LT : l'expression ectopique de l'IL-35 permet en effet de conférer une activité régulatrice à des LT naïfs. Malgré ces premiers résultats, il reste encore à déterminer le mode d'action exact de cette cytokine, entre autres sur le développement et la fonction d'autres types cellulaires.

L'IL-10, le TGF β , et l'IL-35 sont donc des médiateurs clés de la régulation cellulaire, même s'il existe des divergences importantes concernant leur implication entre les modèles *in vitro* et *in vivo*.

- **Suppression par cytolyse**

La cytolysse, par la voie granzyme/perforine, a longtemps été considérée comme étant surtout la marque de fabrique des cellules Natural Killers (NK) et des LT CD8⁺ cytotoxiques. Cependant les LT CD4⁺ humains, dont les nTregs, présentent également une activité cytotoxique. De nombreuses études ont démontré ainsi qu'un des modes d'action principal des nTregs était contact dépendant (Sakaguchi et al., 2010). Cependant, le mécanisme précis par lequel passe cet effet supprimeur reste à déterminer.

Chez l'homme, il a été montré ainsi que les nTregs exercent une activité de cytolysse cellulaire par l'intermédiaire de la sécrétion de granzyme A et de perforine (Grossman et al., 2004). Chez la souris, Gondek *et al* ont rapporté que des nTregs de souris déficientes

en granzyme B présentent une activité suppressive réduite *in vitro*, mais n'ont pas retrouvé d'implication de la voie des perforines (Gondek et al., 2005). D'autres études ont également montré que les nTregs peuvent induire l'apoptose de cellules NK et de LT cytotoxiques par la voie du granzyme B et de la perforine (Cao et al., 2007). Cependant, ce ne sont, à priori, pas les seules voies impliquées dans ces mécanismes de cytotoxicité. En effet, la voie TRAIL-DR5 (TNF related Apoptosis Inducing Ligand –Death Receptor 5) a été décrite comme engagée dans l'apoptose de LT effecteurs induite par des nTregs activés (Ren et al., 2007). Toutes ces études soulignent le fait qu'il reste encore beaucoup de travail pour définir plus précisément les mécanismes cytolytiques impliqués dans la suppression exercée par les nTregs.

- **Suppression par modification du métabolisme cellulaire**

Récemment, de « nouveaux » mécanismes suppresseurs ont été rapportés, qui impliquent une modification du métabolisme cellulaire des LT effecteurs cibles. Ainsi, la forte expression de CD25 par les nTregs a fait l'objet de nombreux débats. Le taux d'expression élevé de la chaîne α du récepteur de l'IL-2 pourrait ainsi entraîner dans l'environnement des nTregs une carence en IL-2 à l'origine de l'apoptose des LT effecteurs. Une étude récente a suggéré que ce mécanisme d'action était possible *in vitro* et *in vivo* (Pandiyani et al., 2007). Au contraire Oberle *et al* suggèrent que cette carence seule, *in vitro*, ne peut pas être responsable de la suppression exercée sur les LT effecteurs (Oberle et al., 2007).

Deux autres mécanismes ont été également proposés impliquant le relargage d'adénosine. L'expression par les nTregs des ectoenzymes CD39 et CD73 entraîne la production d'adénosine péricellulaire, à l'origine d'une inhibition des LT effecteurs par l'activation du récepteur 2A de l'adénosine ($A_{2A}R$) (Borsellino et al., 2007; Dwyer et al., 2007). L'activation de ce récepteur a d'autres effets puisqu'il inhibe la sécrétion d'IL-6 et augmente celle du TGF β , induisant ainsi le développement de Tregs induites (Zarek et al., 2008).

- **Modulation de la maturation et de la fonction des DCs**

Les nTregs n'agissent pas seulement de manière directe sur les LT effecteurs. En effet, des études réalisées en microscopie électronique ont révélé l'existence de nombreuses interactions directes entre les nTregs et les DCs (Tadokoro et al., 2006; Tang and Krummel, 2006). Les nTregs peuvent atténuer la capacité des DCs à activer des LT en

diminuant l'expression des molécules de costimulation CD80 et CD86 *in vitro* (Cederbom et al., 2000), mais également en inhibant la maturation et la fonction des DCs (Houot et al., 2006; Lewkowich et al., 2005; Misra et al., 2004). Cet effet passerait en partie par CTLA-4, constitutivement exprimé par les nTregs. Ainsi, l'utilisation d'anticorps bloquant CTLA-4 ou de nTregs déficientes en CTLA-4, a montré que la suppression exercée par les nTregs via les DCs était réduite (Oderup et al., 2006; Serra et al., 2003). Une étude a également montré que le blocage de la maturation des DCs peut se faire par l'expression de LAG3 (Lymphocyte Activation Gene 3) par les nTregs. LAG3 est un homologue de CD4 qui se lie aux molécules de CMH-II avec une haute affinité. Cette molécule est nécessaire pour une activité suppressive maximale des nTregs (Huang et al., 2004). En effet, sa liaison avec les molécules de CMH-II des DCs inhibe leur maturation et ainsi leur capacité immunostimulatrice (Liang et al., 2008).

Les nTregs induisent également la sécrétion d'IDO par les DCs. Cette molécule régulatrice est impliquée dans les mécanismes d'anergie des LT effecteurs (cf tolérance périphérique) (Fallarino et al., 2003).

Que ce soit *in vitro* ou *in vivo*, la fonction suppressive des nTregs ne peut être imputée à un seul mécanisme ou à une seule molécule. Ainsi, en fonction de la nature de la réponse immunitaire, du site inflammatoire, et de l'hôte, certains mécanismes semblent privilégiés. De plus, l'hétérogénéité de cette population qui est de mieux en mieux identifiée, pourrait expliquer également les différents mécanismes d'actions mis en évidence.

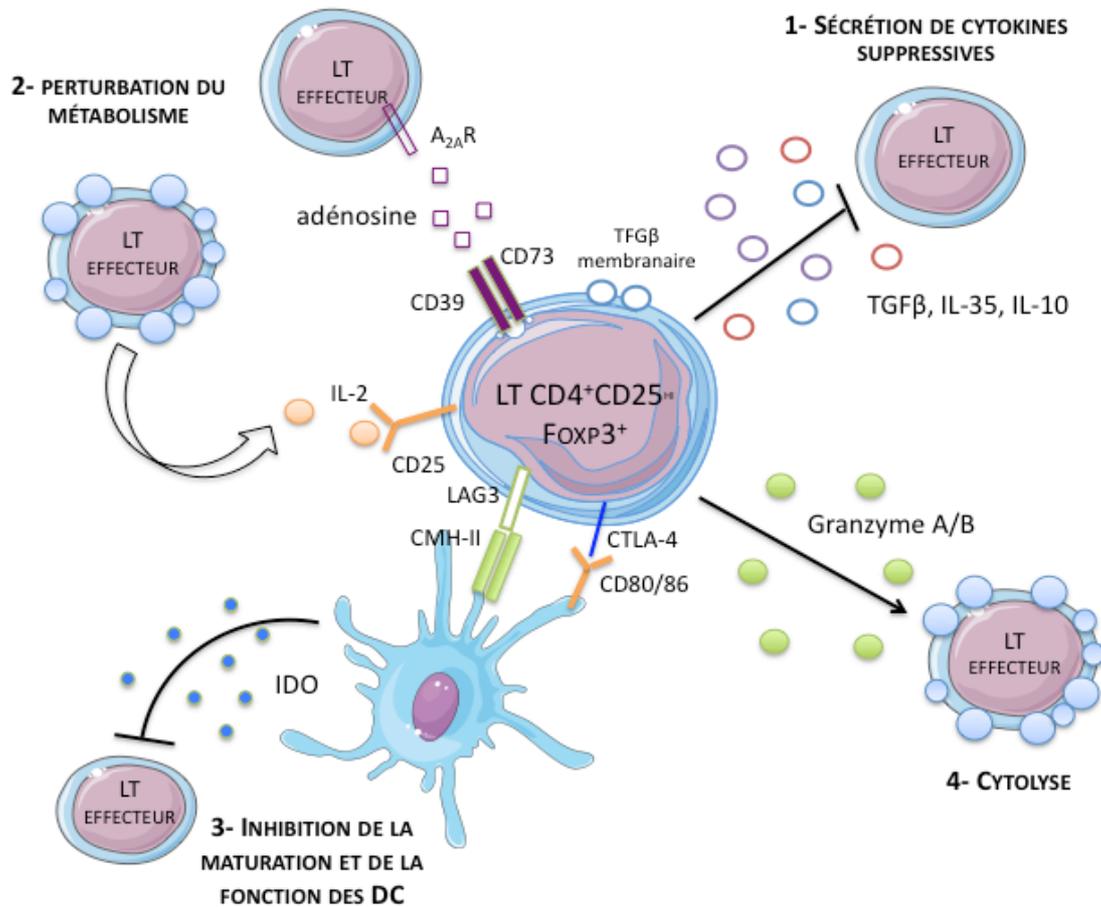


Figure 5: Description des différents mécanismes suppressifs des nTregs: 1- Sécrétion de cytokines suppressives : IL-10, IL-35 et TGFβ, 2- Perturbation du métabolisme cellulaire par carence en IL-2, ou sécrétion d'adénosine, 3- Inhibition de la maturation et de la fonction des DCs par downrégulation des molécules de costimulation ou sécrétion d'IDO, 4- Cytolyse cellulaire par la voie granzyme/perforine.

Les LT régulateurs naturels CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ établissent un lien entre la tolérance centrale et périphérique. En effet, la sélection thymique est responsable à la fois de la sélection négative des LT auto-réactifs, mais aussi du développement de LT régulateurs naturels agissant en périphérie pour contrôler les LT auto-réactifs ayant échappé à ces processus de sélection thymique. Ces LT régulateurs sont impliqués dans de nombreuses pathologies, dans le contrôle du développement de maladies auto-immunes, dans le blocage de l'immunité anti-tumorale, ou dans la tolérance au greffon. Les progrès faits récemment dans l'identification de marqueurs spécifiques de ces cellules permettent et vont permettre le développement de nouvelles thérapies permettant l'expansion de ces cellules (maladies auto-immunes et greffes) ou leur inhibition (cancers).

IV- Lymphocytes régulateurs et sclérose en plaques

La SEP est classiquement caractérisée par le recrutement de LT activés et de macrophages au sein du SNC. La dérégulation de la réponse inflammatoire et de la tolérance au “soi” est considérée comme un élément clé dans la physiopathologie de la SEP. L’hypothèse principale expliquant le développement de cette maladie se base sur la présence de LT auto-réactifs reconnaissant des peptides de la myéline (Hohlfeld and Wekerle, 2004; Sospedra and Martin, 2005). Cependant, à ce jour, il n’existe aucune étude convaincante et reproductible confirmant l’existence à une fréquence plus élevée de ces cellules chez les patients atteints de SEP par rapport aux témoins (Elong Ngono A., 2012). Il semble cependant exister dans cette maladie un « échappement » de ces LT aux mécanismes de tolérance immunitaire. De multiples mécanismes de tolérance périphérique ont été identifiés, l’un des plus puissants étant l’existence de populations lymphocytaires régulatrices. Depuis l’identification de ces cellules, un intérêt grandissant s’est développé concernant leur rôle dans la SEP et son modèle animal, l’EAE.

1- Lymphocytes B régulateurs et SEP

L’importance des LB dans la physiopathologie de la SEP a été redécouverte il y a quelques années, avec l’efficacité des thérapeutiques anti-CD20 chez les patients souffrant d’une forme rémittente de maladie (Hauser et al., 2008; Kappos et al., 2011). L’utilisation de ces traitements permet, en plus de la déplétion de LB pathogènes, l’émergence d’une population cellulaire ayant des propriétés suppressives (Duddy et al., 2007; Leandro et al., 2006). Ces LB régulateurs ont été abondamment décrits dans l’EAE, et leur rôle dans la sévérité de la maladie, ou l’entrée en rémission apparaît crucial. Dans la SEP, peu d’études se sont pour le moment intéressées à ces cellules.

1.1 Implication des LB régulateurs dans l’EAE

L’EAE est un modèle de maladie inflammatoire démyélinisante du SNC médiée principalement par des LT CD4⁺ et classiquement considérée comme une maladie Th1. Cependant, des études relativement récentes ont permis de clarifier le rôle des LB, essentiel,

dans la pathogénie de cette maladie. Un double rôle de ces cellules B est maintenant mieux connu :

- Un rôle pathogène, où les LB participent aux phénomènes de démyélinisation par la production d'auto anticorps et la présentation d'antigènes aux LT CD4⁺ (Franciotta et al., 2008).
- Un rôle protecteur, décrit plus récemment, essentiel dans la rémission de la maladie.

Cette deuxième fonction des LB a été mise en évidence dans l'EAE pour la première fois en 1996 : ainsi, des souris μ MT déficientes en LB présentaient une EAE plus sévère à la phase tardive de la maladie, et n'entraient pas en phase de rémission contrairement aux souris sauvages (Wolf et al., 1996). Le transfert adoptif de LB de souris sauvages (mais pas de LB IL-10^{-/-}) permettait la normalisation de l'évolution de l'EAE chez les souris μ MT suggérant donc l'existence d'une sous population B régulatrice capable de produire de l'IL-10 (Fillatreau et al., 2002). De plus, la rémission des souris EAE dépendait de la présence de LB spécifiques de l'auto-antigène, de la stimulation par un agoniste CD40, mais également de l'activation des molécules de TLR (surtout 2/4) (Fillatreau et al. 2002; Lampropoulou et al. 2008). En l'absence de LB IL-10⁺, une réponse pro inflammatoire Th1 persistait et les souris n'entraient pas en phase de rémission. Ainsi, les LB IL-10⁺ semblent réguler la phase tardive de l'EAE dans ce modèle (Fillatreau et al., 2002).

Un rôle protecteur des LB dans l'EAE a par la suite été confirmé par Matsushita *et al* en 2006 dans un modèle de souris CD19^{-/-} immunisées avec de la MOG. Ces souris présentaient une maladie clinique plus sévère que les souris sauvages. Cette sévérité s'associait à une polarisation Th1 franche dans le SNC. Ces résultats suggèrent donc un rôle fondamental de CD19 comme molécule suppressive dans le développement de l'EAE (Matsushita et al., 2006).

De manière intéressante, la déplétion des LB par l'intermédiaire d'un anti-CD20 est à l'origine d'effets opposés sur la progression de la maladie chez des souris sauvages immunisées par de la MOG. En effet, une déplétion effectuée précocement (J-7) chez les souris immunisés par de la MOG, entraîne le développement d'une maladie plus sévère (phase précoce, pic mais aussi rémission) une expansion de LT pathogènes infiltrants (Matsushita et al., 2010), mais également un retard en l'émergence de LT régulateurs Foxp3⁺ (Mann et al., 2007). Le transfert adoptif, à ce moment là, de B10 CD5⁺CD1d^{hi} permet une normalisation de l'évolution de l'EAE. Ces résultats suggèrent le rôle majeur immunorégulateur des LB IL-10⁺ au moment de l'induction de la maladie (Matsushita et al., 2008; Matsushita et al., 2010). De manière opposée, la déplétion des LB durant l'évolution de

l'EAE permet une réduction importante des symptômes de la maladie, mais également de l'infiltrat de LT pathogènes au sein du SNC. Les LB, au moment du développement de l'EAE agiraient donc plutôt soit comme des CPA pour les LT CD4⁺ anti MOG, soit en fournissant un microenvironnement approprié par la sécrétion de cytokines pro inflammatoires.

Il existe donc dans l'évolution de l'EAE une balance entre deux fonctions opposées des LB : une régulatrice et une pro inflammatoire, qui se chevauchent probablement durant l'évolution de la maladie. Ce délicat équilibre illustre la complexité qui réside dans cette maladie et qui doit être prise en compte pour le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques.

1.2 Implication des LB régulateurs dans la SEP

De même que pour l'EAE, la SEP a longtemps été considérée comme principalement médiée par les LT, en particulier les LT CD4⁺. Cependant, de nombreux arguments, directs ou indirects, ont permis de souligner l'importance des LB, dans la pathogénie de la maladie. Ainsi, la présence de follicules lymphoïdes au sein des méninges de patients atteints de forme SP de SEP (Magliozzi et al., 2007), ou la sécrétion intra thécale d'IgG oligoclonales sont autant de témoignages du rôle joué par ces cellules dans la maladie. De plus, la déplétion périphérique des LB par des anticorps monoclonaux anti-CD20 (Rituximab ou Ocrelizumab) est corrélé à une amélioration significative, clinique et radiologique, des patients atteints de SEP de forme rémittente (Hauser et al., 2008; Kappos et al., 2011). Cette amélioration s'associe d'ailleurs à une modification de l'homéostasie des LB favorisant une repopulation par des cellules B présentant des propriétés régulatrices 6 à 12 mois après la déplétion (Duddy et al., 2007). La même observation a été faite dans un modèle de souris NOD traité par anti-CD20, mais également chez des patients atteints de polyarthrite rhumatoïde et traités par anti-CD20, avec une expansion significative des LB transitionnels 4 à 6 mois après traitement (Hu et al., 2007; Leandro et al., 2006).

Alors que les publications sur le rôle des LB régulateurs dans l'EAE continuent de fleurir, à ce jour peu d'études se sont intéressées à la fonction et la fréquence de ces cellules B régulatrices IL-10⁺ chez les patients atteints de SEP. De plus, les résultats des études actuelles restent controversés. En effet, plusieurs études ont retrouvé une diminution significative de la production d'IL-10 par les LB des patients atteints de SEP (Correale et al., 2008; Duddy et al., 2007; Knippenberg et al., 2011), alors que l'équipe de T. Tedder démontre au contraire

une augmentation de la sécrétion d'IL-10 par les B10pro dans cette maladie (Iwata et al., 2011).

Ainsi en 2007, Duddy *et al* s'est intéressé à la production d'IL-10 des LB périphériques, et cela en ELISA après stimulation de 48h par du CD40. Il a retrouvé une diminution significative de la sécrétion d'IL-10 chez les patients SEP non traités par rapport aux témoins. De façon intéressante, cette sécrétion retourne à la normale chez les patients infectés par helminthe, une infection parasitaire intestinale qui est associée à une maladie moins sévère (Correale et al., 2008). En utilisant un autre mode de stimulation par de l'ODN (Oligodeoxynucléotide activant la voie du TLR-9), Knippenberg a retrouvé les mêmes résultats, mais chez des patients traités par immunomodulateurs. Cependant, ces résultats sont peu concluants et les modalités de stimulation discutables, car les taux de sécrétion d'IL-10 obtenus dans cette étude sont très faibles (de l'ordre de 1.4%). De plus, les patients présentaient une réduction significative de leur proportion de LB mémoires (Knippenberg et al., 2011), cellules justement impliquées dans la régulation et la production d'IL-10 (Iwata et al., 2011).

Des résultats opposés ont été décrits par l'équipe de T. Tedder en 2011 (Iwata et al., 2011). Leur étude s'est attachée à caractériser les modes d'activation de la sécrétion d'IL-10 par les LB chez l'homme, mais également le phénotype de ces cellules. Ils ont étudié la fréquence des B10 (5h de stimulation) et des B10pro (48h de stimulation) dans différentes maladies auto-immunes dont la sclérose en plaques. Les huit patients inclus dans leur étude étaient tous (sauf un) sous traitement immunomodulateur ou immunosuppresseur. La fréquence des B10 chez ces patients était comparable aux témoins sains, alors que la fréquence des B10pro était significativement plus élevée.

Ainsi, à ce jour, peu de choses sont encore connues concernant les propriétés fonctionnelles mais également le phénotype de ces cellules sécrétant de l'IL-10 que ce soit chez les témoins sains ou chez les patients atteints de SEP. La meilleure compréhension de l'implication de ces cellules dans la maladie et leur éventuelle modulation pourrait représenter une innovation thérapeutique dans le traitement des maladies auto immunes.

1.3 Traitements et LB régulateurs dans la SEP

Aucun traitement visant directement l'expansion de cellules B régulatrices chez l'homme n'existe à ce jour. Cependant, il y a quelques années, deux essais cliniques ont

démontré que la déplétion des LB en périphérie à l'aide d'un anticorps monoclonal anti-CD20 entraîne une amélioration clinique et radiologique significative chez les patients atteints de SEP rémittente (Hauser et al., 2008; Kappos et al., 2011). De manière intéressante, cette amélioration s'associe à une modification de l'homéostasie des LB, favorisant l'émergence de LB avec des fonctions régulatrices (Duddy et al., 2007). De la même manière, chez les patients atteints de polyarthrite rhumatoïde, une expansion des LB transitionnels/immatures a été observée après 6 mois de traitement (Leandro et al., 2006). Et ces cellules ont été impliquées dans les phénomènes de régulation (Blair et al., 2010; Lemoine et al., 2011).

Chez la souris, BAFF, molécule clé de la maturation et de la fonction des LB, induit une augmentation du nombre de LB $CD5^+CD1d^{high} IL-10^+$. Cette augmentation est inhibée par l'ajout d'Atacicept (protéine recombinante bloquant la liaison de BAFF et APRIL sur leur récepteur TACI). Chez l'homme, les taux de BAFF augmentent après déplétion des LB (Heidt et al., 2012; Kreuzaler et al., 2012; Lavie et al., 2007) suggérant qu'une partie de l'efficacité de l'anti-CD20 pourrait être due à une augmentation du niveau de BAFF, favorisant l'expansion de LB régulateurs. Cependant, chez l'homme, les effets de ces cytokines de survie sur les LB régulateurs restent indéterminés. Et dans la SEP, une étude de phase II testant l'Atacicept s'est interrompue prématurément du fait de l'aggravation de la maladie (www.clinical-trials.gov). Cet effet négatif pourrait ainsi être dû à une inhibition du développement de LB régulateurs, mais ceci reste à démontrer. L'expansion de Bregs par l'intermédiaire de ces cytokines de survie pourrait ainsi représenter une thérapeutique intéressante pour traiter les maladies auto-immunes.

2- Lymphocytes T régulateurs et SEP

La dérégulation de la réponse inflammatoire et de la rupture de la tolérance au “soi” sont considérées comme des éléments clés dans la physiopathologie de la SEP. Suite à la découverte du rôle majeur des LT régulateurs naturels dans le déclenchement de maladies auto-immunes chez la souris, de nombreuses équipes se sont intéressées au rôle de ces cellules T régulatrices dans l'EAE mais aussi chez l'homme dans la SEP. En effet, il pourrait exister un déséquilibre entre les LT auto-réactifs effecteurs à l'origine des lésions démyélinisantes et les LT régulateurs. Ainsi, la déplétion ciblée des nTregs aggrave la maladie chez la souris, alors que le transfert de LT régulateurs permet de prévenir le développement de l'EAE (Zozulya and Wiendl, 2008). Cependant, chez l'Homme, la situation apparaît plus complexe et reste controversée (Lowther and Hafler, 2012).

2.1 Implication des LT régulateurs naturels CD4⁺ Foxp3⁺ dans l' EAE

La théorie selon laquelle les nTregs jouent un rôle clé dans la prévention de l'agression du SNC par des LT auto-réactifs provient essentiellement d'études réalisées chez l'animal.

1. Rôle des nTregs dans le développement et la rémission de l'EAE

Des premiers travaux, réalisés en 1994, ont identifié un rôle protecteur des LT dans le développement de l'EAE. Des souris transgéniques (Tg) ayant un TCR anti-MBP croisées avec des souris Rag1^{-/-} développent ainsi spontanément une EAE alors que les souris Tg MBP/Rag1^{+/+} sont protégées (Lafaille et al., 1994). Cette protection a été reliée, à l'époque, à la présence de LT régulateurs CD4⁺ chez les souris Rag1^{+/+} contrairement aux souris Rag1^{-/-} (Olivares-Villagomez et al., 1998). Hori *et al* ont par la suite confirmé le rôle fondamental de ces cellules dans la protection contre l'EAE. En effet, le transfert adoptif de LT CD4⁺CD25⁺ de souris Tg MBP/Rag1^{+/+} à des souris Tg MBP/Rag1^{-/-} permet de prévenir le développement de la maladie (Hori et al., 2002).

Par la suite, plusieurs études ont montré que le transfert adoptif de LT CD4⁺CD25⁺ isolés à partir des ganglions lymphatiques de souris naïves permettait de réduire l'incidence ou la sévérité de la maladie dans des modèles d'EAE actives induits par la MOG ou la PLP (Proteolipid Protein). Cette amélioration s'accompagne de plus d'une diminution de l'infiltrat

de LT au sein du SNC (Kohm et al., 2002; Zhang et al., 2004). De même, dans une étude conduite par Matsumoto en 2007, le transfert de LT CD4⁺CD25⁺ périphériques inhibe le développement d'une EAE, cette fois chronique, chez des rats receveurs (Matsumoto et al., 2007).

Une autre manière de démontrer l'importance de ces cellules régulatrices dans les phénomènes d'induction et de rémission de l'EAE peut passer par la déplétion spécifique de ces cellules. Ainsi, l'utilisation d'un anticorps monoclonal anti-CD25 avant l'immunisation augmente la sévérité de la maladie (McGeachy et al., 2005; Stephens et al., 2005), diminue le seuil d'antigène requis pour déclencher la maladie (Stephens et al., 2005) et retarde la rémission de l'EAE (Gartner et al., 2006; Zhang et al., 2006).

Plusieurs études se sont aussi intéressées à l'implication des nTregs dans les phénomènes de rémission spontanée de la maladie. Ainsi, Mc Geachy *et al* ont démontré qu'il existait une accumulation de LT CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ dans le SNC corrélée à l'apparition de la rémission de la maladie dans un modèle d'EAE induit par la MOG (McGeachy et al., 2005). Une augmentation périphérique des nTregs a également été retrouvée durant le premier épisode de rémission de l'EAE (Zhang et al., 2006). De plus, la déplétion de ces cellules pendant la phase de rémission entraînait une inhibition de l'entrée en rémission. De manière opposée, Gartner *et al* ont montré que la déplétion des nTregs n'influçait pas la première rémission mais raccourcissait l'apparition de la seconde poussée de la maladie (Gartner et al., 2006). Une étude plus récente s'est intéressée aux rôles complémentaires des LB régulateurs et des LT régulateurs dans l'évolution de l'EAE (Matsushita et al., 2010). L'hypothèse était que les LB régulateurs interviennent essentiellement dans le contrôle de l'induction initiale de la maladie, alors que les LT régulateurs favorisent l'entrée en rémission.

2. Activation Ag-spécifique des nTregs dans l'EAE

L'activation Ag-spécifique des nTregs a par la suite été testée chez des souris SJL. En effet, des nTregs spécifiques de la PLP transférés passivement à des souris sont capables de les protéger d'une EAE induite par la PLP, mais pas par la MOG ou la MBP (Yu et al., 2005). Au contraire, l'activation préalable de ces cellules par leur antigène (PLP) permet d'inhiber l'EAE induite par l'injection de la MOG ou de la MBP. De la même manière, Mc Geachy *et al* ont montré que la sévérité d'une EAE induite par la MOG était significativement diminuée par le transfert passif de faibles quantités de nTregs isolés à partir du SNC de souris en rémission, alors que la même quantité de nTregs périphériques n'avait aucun effet

(McGeachy et al., 2005). Ces cellules régulatrices localisées au sein du SNC apparaissent phénotypiquement plus activées que leurs homologues périphériques. Les nTregs ont donc besoin d'être préalablement activé par leur antigène pour exercer leurs effets suppressifs de manière optimale.

3. Mécanismes d'actions des nTregs dans l'EAE

Concernant le mode d'action des LT CD4⁺CD25⁺ dans ces modèles animaux, plusieurs études ont démontré *in vitro* que les LT CD4⁺CD25⁺ issus de souris EAE (ganglions lymphatiques et SNC) inhibent la prolifération et la sécrétion de cytokines Th1 par les LT CD4⁺CD25⁻. Ces expériences ont été réalisées après une stimulation polyclonale par un anti-CD3 (Beyersdorf et al., 2005; McGeachy et al., 2005), ou avec les antigènes MBP et MOG (Hori et al., 2002; Kohm et al., 2002; Korn et al., 2007). *In vivo*, ces cellules régulatrices inhibent l'accumulation des LT CD4⁺ au sein du SNC (Kohm et al., 2002) et la prolifération des LT CD4⁺ Th1 et Th2 anti-PLP (Zhang et al., 2006). Cela est confirmé car la déplétion des LT CD4⁺CD25⁺ entraîne également *in vivo* une forte réponse Th1 (Gartner et al., 2006).

Plusieurs études ont démontré que l'IL-10 et le TGFβ pouvaient être en partie à l'origine de ces mécanismes de régulation. En effet, les LT CD4⁺CD25⁺ de souris naïves stimulés par un anti-CD3 sécrètent de l'IL-10 et leurs capacités suppressives sont reversées avec un anti-IL-10R (Zhang et al., 2004). Les souris déficientes en IL-10 présentent également une forme exacerbée de la maladie (Samoilova et al., 1998). De plus, une augmentation de la production d'IL-10 par les nTregs Foxp3⁺ est corrélée avec la phase de rémission de la maladie, et le transfert de nTregs purifiées permet de prévenir l'induction de l'EAE par l'intermédiaire de la production d'IL-10 (McGeachy et al., 2005; Zhang et al., 2004). Le TGFβ a également été impliqué dans la régulation de l'EAE. Ainsi, la neutralisation *in vivo* du TGFβ inhibe la rémission de la maladie et augmente la sévérité de la maladie dans un modèle de souris EAE/PLP (Zhang et al., 2006).

4. nTregs et environnement inflammatoire du SNC

Chez la souris, les nTregs spécifiques de la myéline sont capables de migrer et de s'accumuler au sein du SNC (Lowther and Hafler, 2012; Zozulya and Wiendl, 2008). Leur présence au sein du SNC provient de leur prolifération et non de la conversion de LT naïfs en Tregs (Korn et al., 2007; O'Connor et al., 2007b). Cette accumulation est corrélée avec la

rémission de la maladie (Korn et al., 2007; McGeachy et al., 2005). Cependant, cet infiltrat de cellules régulatrices n'est pas suffisant pour réduire l'activité des LT effecteurs pendant le pic de la maladie. Les LT auto-réactifs « résistent » en effet à la régulation exercée par les nTregs grâce à la sécrétion d'IL-6 et de TNF α (Korn et al., 2007; O'Connor et al., 2007b). De plus, dans le SNC de souris EAE, le TGF β secrété par les nTregs peut s'associer à l'IL-6 pour induire la différenciation de LT proinflammatoires de type Th17. Les cellules Th17 induites ont la particularité d'être plus résistantes à la suppression exercée par les nTregs (Stummvoll et al., 2008). Au contraire, en l'absence de sécrétion d'IL-6 par les LT CD4⁺, il existe au sein du SNC une génération *de novo* de Tregs Foxp3⁺ et une résistance complète à l'EAE (Bettelli et al., 2006; Korn et al., 2008; Veldhoen et al., 2006). Il est donc possible que la fonction des cellules T régulatrices soit normale dans l'EAE et la SEP, mais que l'environnement inflammatoire tissulaire inhibe leur activité suppressive. Les traitements visant donc à expandre ces populations régulatrices représentent toujours un intérêt afin de rétablir une homéostasie immunitaire en faveur des populations régulatrices au sein du SNC inflammé.

5. Expansion des nTregs *in vivo*

Plusieurs tentatives ont été faites pour augmenter le pool de nTregs *in vivo* dans les modèles d'EAE (Beyersdorf et al., 2005; Ding et al., 2006; Ochoa-Reparaz et al., 2007). Ainsi, l'utilisation d'un super agoniste de CD28, injecté à faible dose à des rats Lewis, permet l'expansion et l'activation des nTregs et une diminution de la sévérité de la maladie (Beyersdorf et al., 2005). D'autres protocoles d'expansion des nTregs *in vivo* ont été rapportés : utilisation de dexaméthasone associée à de l'IL-2, ou injection de VIP (Vasoactive Intestinal Peptide), un neuropeptide immunosuppresseur (Chen et al., 2006; Fernandez-Martin et al., 2006). En effet, ces deux traitements permettent une expansion des nTregs et inhibent le développement de la maladie dans des modèles d'EAE. Un autre protocole s'est lui intéressé à l'expansion *in vitro* de Tregs Tr1 par l'intermédiaire d'une stimulation par PD-L1 Ig. Le transfert de ces cellules permettait la suppression de la démyélinisation et des symptômes de l'EAE (Ding et al., 2006). Ochoa Reparaz a également montré que la vaccination contre un Ag bactérien permettait une expansion de nTregs et une diminution de la fréquence du développement de la maladie (Ochoa-Reparaz et al., 2007).

L'étude du rôle potentiel des nTregs dans le développement de la maladie chez l'animal, et surtout dans le phénomène de rémission ont été à l'origine de nombreuses études chez l'homme. Le développement de stratégies thérapeutiques chez l'animal visant l'expansion de population de cellules T régulatrices pourrait ainsi, dans un avenir proche, s'appliquer aux patients atteints de SEP.

2-2 Implication des LT régulateurs naturels CD4⁺ Foxp3⁺ dans la SEP

Dans les années 2000, suite à la caractérisation des nTregs, mais aussi du « boom » de l'étude de ces cellules dans l'EAE, on a observé un intérêt grandissant concernant l'étude des nTregs dans la SEP. Ces études ont porté principalement sur l'évaluation de la fréquence de ces cellules en périphérie mais aussi dans le LCR des patients. Leur activité suppressive en fonction de l'activité de la maladie, des traitements et des formes de maladie a aussi été particulièrement étudiée.

1. Etudes génomiques

La SEP est une maladie complexe, l'identification d'allèles à risque a été rendue possible ces dernières années par le séquençage complet du génome humain et l'établissement de la « Hapmap » (Frazer et al., 2007). Depuis, de nombreuses études sur la génétique de la SEP ont établi une analyse complète des allèles à risque (ANZgene, 2009; Baranzini et al., 2009; De Jager et al., 2009; Hafler et al., 2007; Sawcer et al., 2011). Ainsi CD25 (IL-2R α), CD127 (IL-7R α), et CD58 (LFA3), identifiés comme loci à risque, sont des molécules essentielles à l'activation et l'homéostasie des LB et des LT. Deux de ces molécules (CD25 et CD127) ont aussi été identifiées comme des marqueurs des nTregs, soulignant le rôle probable des cellules régulatrices dans le développement de la maladie.

Deux études ont démontré l'importance particulière du gène de l'IL-7R α comme marqueur de susceptibilité (Hafler et al., 2007; Lundmark et al., 2007b). Un polymorphisme fonctionnel localisé au niveau du 6^{ème} exon augmente ainsi le risque de la maladie avec un Odds Ratio de 1.2. De plus, une autre étude a démontré que la présence de certains polymorphismes de CD127 influençait la fréquence des Tregs naïves chez les patients atteints de SEP (Broux et al., 2010).

Un autre groupe s'est particulièrement intéressé au locus CD58 dans la SEP (De Jager et al., 2009). Cette molécule augmente la signalisation par le TCR en se fixant au CD2. Un effet protecteur a été conféré à un variant allélique de CD58, qui augmente l'expression de cette molécule au sein des PBMC. Cette augmentation de CD58 aurait pour effet de sur réguler l'expression de Foxp3 sur les nTregs (De Jager et al., 2009). De manière intéressante, l'ARNm de CD58 est augmenté chez les patients pendant les phases de rémission.

2. Homéostasie des nTregs dans la SEP

Dans l'ensemble, toutes les études s'accordent pour retrouver une fréquence identique des LT CD4⁺CD25^{high} en périphérie entre les patients et les témoins avec des taux variants de 1.2 à 2.3% des LT CD4⁺ (Feger et al., 2007; Haas et al., 2005; Putheti et al., 2004; Viglietta et al., 2004).

Un défaut de génération de Tregs au niveau du thymus a cependant été rapporté chez les patients atteints de SEP. Les auteurs ont ainsi utilisé CD31 (PECAM-1) et CD45RA pour identifier les Tregs naïves « récentes émigrantes thymiques » (RTE) (Haas et al., 2007). Cette réduction de génération de Tregs RTE est compensée en périphérie par une augmentation de Tregs mémoires, expliquant la fréquence normale de LT CD4⁺CD25^{high} Foxp3⁺ retrouvée en périphérie. A noter cependant que la fréquence des LT CD4⁺CD25^{hi}Foxp3⁺ dans la SEP reste controversée puisqu'une étude publiée en 2008 a rapporté une diminution de la fréquence de ces cellules chez les patients atteints de forme rémittente (Venken et al., 2008b).

Plusieurs groupes se sont intéressés à la présence des cellules régulatrices dans le LCR des patients SEP (Feger et al., 2007; Haas et al., 2005; Venken et al., 2008b). Leurs études sont contradictoires puisque la première trouve une distribution identique de nTregs dans le sang et le LCR alors que les deux autres ont mis en évidence une fréquence plus élevée de LT CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ dans le LCR des patients atteints de SEP de forme rémittente par rapport au sang périphérique. Cela suggère que ces cellules pourraient être recrutées sur le site de l'inflammation ou induites *de novo* dans le SNC. Ainsi, Venken *et al* ont décrit une augmentation de l'expression de CD103 et VLA4 sur les Tregs des patients, en comparaison aux témoins. Ces molécules d'adhésion sont impliquées dans le recrutement et la migration des LT vers les sites inflammatoires (Venken et al., 2008b).

Cependant, malgré la présence de ces cellules dans le LCR, il existe dans le parenchyme cérébral un très faible infiltrat de nTregs chez 70% des patients et aucune cellule Foxp3⁺ chez 30% des patients (Fritsching et al., 2011; Tzartos et al., 2008). En parallèle, dans cette étude,

le nombre de nTregs dans le LCR est significativement augmenté chez ces patients par rapport au sang périphérique (Fritzsching et al., 2011). Une des hypothèses formulées par les auteurs est que les nTregs des patients sont activées en périphérie, migrent au sein du parenchyme cérébral, où elles subissent plusieurs restimulations qui les rendent sensibles à l'apoptose. En effet, les nTregs du LCR des patients présentent une augmentation de l'expression de CD95. L'élimination constante des nTregs au sein du parenchyme cérébral pourrait expliquer la faible fréquence de ces cellules retrouvée dans cette étude.

3. Fonction des nTregs dans la SEP

Bien que les taux sanguins de LT $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ soient normaux, plusieurs auteurs ont pu mettre en évidence des fonctions suppressives altérées de cette sous population régulatrice d'origine thymique. En effet, Viglietta *et al* ont montré dans une étude regroupant 15 patients atteints de SEP rémittente et non traités, une perte de la suppression des $CD4^+CD25^{high}$ sur la prolifération des cellules $CD4^+CD25^-$ (inhibition de la prolifération à 20% contre 80% chez les sujets sains) (Viglietta et al., 2004). Par la suite, plusieurs autres équipes ont rapporté ce défaut de suppression des LT $CD4^+CD25^{high}$ dans le cadre de stimulation polyclonale ou envers des réponses dirigées contre des protéines de la myéline (MOG et MBP) (Haas et al., 2005; Kumar et al., 2006). Dans ces études, le défaut de suppression était dû à un défaut intrinsèque de régulation des nTregs et non à une résistance des LT effecteurs (Kumar et al., 2006; Viglietta et al., 2004). De plus, Venken *et al* ont retrouvé, en plus du défaut de suppression des LT $CD4^+CD25^+$, une diminution d'expression de l'ARNm de *foxp3* au sein des LT $CD4^+CD25^+$ chez les patients atteints de SEP de forme rémittente. Dans cette étude, la diminution du nombre de transcrits en PCR serait due à une diminution d'expression de Foxp3 par les cellules (Analyse de la MFI (Mean Fluorescence Intensity) en cytométrie) mais également à une diminution de la fréquence de LT $CD4^+CD25^{high}Foxp3^+$ chez les patients atteints de forme rémittente (Venken et al., 2008b). A noter qu'au contraire, la fonction suppressive des nTregs apparaît conservée chez les patients présentant une forme secondairement progressive de maladie (Venken et al., 2006; Venken et al., 2008b).

Un défaut de suppression par les nTregs pourrait expliquer le développement de LT auto-réactifs pathogènes et donc le développement de la maladie. Mais est-ce que ce défaut de suppression a un véritable rôle dans la physiopathologie de la maladie, ou est-il la conséquence d'une perturbation plus générale du système immunitaire ?

Haas *et al* ont rapporté un défaut de génération de Tregs RTE au niveau du thymus de patients atteints de SEP (Haas et al., 2007). Ils ont montré que ces cellules contribuaient pleinement à la fonction suppressive des Tregs totales. Dans cette étude cette réduction ne concernait que les patients jeunes de moins de 30 ans. Les auteurs supposent ici qu'un déséquilibre dans l'homéostasie des Tregs serait à l'origine du défaut de fonction observé dans les précédentes études.

Cependant, tous les auteurs ayant décrit ce défaut de suppression l'ont étudié à l'aide du marqueur CD25, peu discriminant et peu reproductible. En 2006, Seddiki *et al* ont montré que la faible expression du marqueur CD127 (chaîne α du récepteur à l'IL-7) combiné à la forte expression du CD25 permettait de mieux différencier les cellules régulatrices des LT activées, que ce soit dans le sang périphérique, le cordon ombilical ou les organes lymphoïdes (Seddiki et al., 2006). Ainsi, les cellules CD4⁺ exprimant fortement CD25, mais étant CD127⁻, sont hautement suppressives dans les essais fonctionnels réalisés. Ce nouveau biomarqueur CD127 est de plus corrélé négativement avec l'expression de Foxp3. Cette corrélation négative entre les deux molécules s'explique par le fait que Foxp3 interagit avec le promoteur de CD127 et contribue ainsi à la faible expression de cette molécule au niveau des cellules régulatrices (Liu et al., 2006).

La combinaison de marqueurs nécessaires pour identifier les nTregs humaines souligne la difficulté qui existe à déterminer de manière fiable la fonction de ces cellules. Les études fonctionnelles des nTregs doivent donc sans cesse prendre en compte la description des nouveaux marqueurs afin d'éviter une contamination par des cellules potentiellement activées.

2-3 Traitements et LT régulateurs naturels CD4⁺Foxp3⁺ dans la SEP

Le rôle et les caractéristiques des Tregs en font une cible privilégiée dans le traitement des maladies auto-immunes de manière globale et dans la SEP plus spécifiquement. En effet, qu'elles soient déficientes ou pas, l'expansion de ces cellules peut représenter une stratégie thérapeutique intéressante afin de restaurer une tolérance immunitaire déficiente dans cette maladie.

Des traitements immunomodulateurs déjà connus et utilisés en pratique quotidienne ont un effet sur les Tregs. Ainsi, dans une étude ayant recruté 22 patients atteints de SEP de forme rémittente traités par IFN β 1-a, De Andres *et al* ont observé une augmentation significative de la fréquence des Tregs CD4⁺CD25⁺, accompagnée d'une amélioration de leur fonction

suppressives après 6 mois de traitement (de Andres et al., 2007). Des résultats similaires ont confirmé cette étude (Venken et al., 2008a; Venken et al., 2008b). Cette amélioration s'accompagne d'une augmentation de la fréquence des Tregs naïves RTE⁺ (Korporal et al., 2008; Venken et al., 2008a). Dans deux autres études, il a été montré que l'acétate de glatiramère, autre traitement immunomodulateur utilisé dans la SEP, augmentait la fréquence et la fonction suppressive des LT CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ *in vitro* et *ex vivo* (Haas et al., 2009; Hong et al., 2005).

De manière intéressante, le traitement par anti-CD25, a un effet bénéfique dans la maladie. Ainsi, un essai randomisé de phase II a évalué l'efficacité du Daclizumab (anti-CD25) en « add on therapy » dans la SEP de forme rémittente. Ils ont retrouvé une diminution significative de l'activité inflammatoire radiologique chez les patients traités après 6 mois (Wynn et al., 2010). Un des effets directs de ce traitement est de diminuer la fréquence et la fonction suppressive des nTregs (Oh et al., 2009). Cette altération n'a cependant pas d'impact sur l'évolution de la maladie, et est compensée par une augmentation de l'activité des NK CD56^{bright} et une diminution des LT CD4⁺CD25⁺ activés (Martin, 2012).

Des thérapeutiques plus récentes se développent actuellement visant, cette fois à expandre des LT régulateurs naturels.

Une étude a ainsi testé chez 23 patients naïfs de traitement un vaccin par un TCR trivalent. Ce vaccin induit une augmentation de l'expression de Foxp3 et de la fréquence des LT IL-10⁺, mais sans franche amélioration clinique des patients (Vandenbark et al., 2008).

L'IL-2 a aussi été utilisé afin de booster les réponses immunitaires chez les patients atteints de cancers ou d'infections sévères (Ahmadzadeh and Rosenberg, 2006; Giedlin and Zimmerman, 1993; Lemoine et al., 2009). Ainsi, chez les patients atteints de cancers métastatiques du rein ou de mélanome, il a été identifié une augmentation des nTregs sous traitement par IL-2 (Ahmadzadeh and Rosenberg, 2006; Lemoine et al., 2009). Très récemment, une équipe a testée de faibles doses d'IL-2 dans le traitement des vascularites induites par l'hépatite C (Saadoun et al., 2011). Chez les 10 patients traités, 8 ont présenté une amélioration clinique significative. Sur le plan biologique, une augmentation de la fréquence de nTregs suppressives a été démontrée (de 3.6% à 11.8% de LT CD4⁺CD25^{hi}Foxp3⁺ au sein des LT CD4⁺). Cette nouvelle stratégie thérapeutique pourrait être prometteuse dans le cadre du traitement de pathologies auto-immunes. Dans ce cadre, un patient atteint de SEP agressive, et n'ayant pas répondu aux traitements de première et deuxième intention, est actuellement en cours de traitement par de l'IL-2 dans le service de Neurologie de Nantes.

OBJECTIFS

La SEP est classiquement considérée comme une maladie auto-immune démyélinisante du SNC, dépendante des LT CD4⁺ auto-réactifs. De nombreux antigènes candidats ont été proposés, mais aucune preuve directe n'a été apportée de leur réelle implication dans ces mécanismes d'auto-réactivité. La fréquence des ces LT auto-réactifs CD4⁺ et CD8⁺ a été abondamment étudiée dans la littérature mais leur augmentation par rapport aux individus sains reste controversée (Elong Ngonu A., 2012). Cependant, que la fréquence de ces cellules soit ou non augmentée, une question reste en suspens :

Comment ces cellules auto-réactives, chez les patients atteints de SEP, s'activent et échappent aux mécanismes de tolérance périphérique ?

Un des mécanismes proposés permettant l'activation puis la migration de ces cellules dans le SNC serait ainsi un défaut de régulation en périphérie. Plusieurs populations régulatrices ont été décrites dans la littérature. Nous avons choisis d'explorer la fréquence et la fonction des LT régulateurs naturels Foxp3⁺. En effet, ces cellules ont été précédemment impliquées dans la physiopathologie de la SEP mais de nouveaux marqueurs, permettant une meilleure caractérisation nous ont poussé à étudier la fonction de ces cellules chez des patients atteints de SEP rémittente. Dans un second temps, la « re découverte » de l'implication des LB dans la SEP, et la mise en évidence de LB régulateurs chez l'homme, nous a conduit à explorer la fréquence et la fonction de ces cellules dans la SEP.

RESULTATS

I- Article 1: Patients with relapsing-remitting multiple sclerosis have normal Treg function when cells expressing IL-7 receptor α -chain are excluded from the analysis

II- Article 2: Patients with multiple sclerosis present an unaltered regulatory B cell frequency, phenotype and function

Patients with Multiple Sclerosis present an unaltered regulatory B cell frequency, phenotype and function

Laure Michel^{1,2,5}, Mélanie Chesneau^{1,5,6}, Philippe Manceau¹, Alexandra Garcia¹, Marion Salou¹, Annie Elong Ngono¹, Annaïck Pallier^{1,5,6}, Marylène Jacq-Foucher^{2,3}, Fabienne Lefrère^{2,3}, Sandrine Wiertlewski², Jean-Paul Soullillou^{1,5,6}, Nicolas Degauque^{1,5,6}, David-Axel Laplaud^{1,2,3,5,*} and Sophie Brouard^{1,5,6*}.

¹ INSERM, UMR 1064, Nantes, F-44093, France

² CHU Nord Laennec, Service de Neurologie, Nantes, F-44093, France

³ INSERM, CIC 004, Nantes, F-44093, France

⁴ CHU de Nantes, CIC biotherapy, Nantes, F-44093, France

⁵ Université de Nantes, Faculté de Médecine, Nantes, F-44035, France

⁶ CHU de Nantes, ITUN, Nantes, F-44093, France

*both senior authors equally contributed to this study

Corresponding author: Sophie Brouard, INSERM 1064, CHU Hôtel Dieu, 30 Bd Jean Monnet, 44093 Nantes, France.

E-mail: Sophie.brouard@univ-nantes.fr

Fax: + 33 240087411

Tel: + 33 240087410

Word count:

Abstract: 327

Text: 4599

Key words: Multiple sclerosis – B cells – Regulation

Running title: Unaltered regulatory B cells in MS

This work was funded by the ARSEP and LM received a salary from the INSERM (Poste d'accueil).

Abbreviations used in the text:

- MS: Multiple Sclerosis
- CNS: Central Nervous System
- EAE: Experimental Autoimmune Encephalomyelitis
- HV: Healthy Volunteers
- RR-MS: Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis
- PP-MS: Primary-Progressive Multiple Sclerosis
- SP-MS: Secondary-Progressive Multiple Sclerosis
- BFA: Brefeldin-A

Abstract:

Multiple Sclerosis (MS) is an inflammatory demyelinating disease of the Central Nervous System (CNS) classically characterized by the recruitment of activated T cells and macrophages into the CNS. However, some data, particularly the beneficial effect of anti-CD20, support a prominent role for B cells in the physiopathology of MS. Recently it has emerged that specific subsets of B cells secreting IL-10 negatively regulate disease symptoms in mouse models of inflammation, such as Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE). However, the involvement of such regulatory B cells in MS remains unclear. We aimed to study the regulatory B cell frequency, phenotype and function in MS patients as compared to Healthy Volunteers (HV). Sixty-three MS patients, untreated for at least 3 months, and 58 age-matched HV were included in this study. IL-10 secretion by B cells and the phenotype of IL-10⁺ B cells were studied after 5h (B10 cells) and 48h of stimulation (B10pro cells) with CD40L and ODN. The suppressive property of B cells on CD4⁺CD25⁻ T cell proliferation in MS and HV was measured after 3 days of culture. We report on an absence of significant differences in the frequencies of the different B cell subsets in MS compared to HV. No significant difference was found either for the ability of B cells to secrete IL-10 after 5h (B10 cells) or 48h (B10pro cells) of stimulation (Mean B10pro cells 7.8±0.9 % in MS, compared to 7.7±0.64 % in HV, NS). Analysis of the B10pro cell phenotype revealed mainly a memory CD24⁺CD27⁺ phenotype in MS and HV, even though both naïve and immature subsets were also able to secrete IL-10. Prestimulated B cells from MS and HV inhibited autologous CD4⁺CD25⁻ T cell proliferation with a similar efficiency by a contact-dependent mechanism, independently of IL-10 and TGF-β secretion. Altogether, our data show that regulatory B cells have a conserved frequency and function in the blood of patients with MS, suggesting that they do not contribute to the physiopathology of the disease.

Introduction:

Multiple Sclerosis (MS) is an inflammatory demyelinating disease of the Central Nervous System (CNS) classically characterized by the recruitment of activated T cells and macrophages into the CNS. This disorder is thought to be initiated by autoreactive T cells recognizing peptides from myelin sheath proteins (Hohlfeld and Wekerle, 2004; Sospedra and Martin, 2005). However, there is no compelling evidence that the frequency of autoreactive cells is increased in MS vs. age-matched controls in the periphery and this hypothesis remains controversial (Elong Ngono A., 2012). Another hypothesis that may explain the disease is a reduced suppressive function of regulatory T cells in MS, as reported by some authors (Lowther and Hafler, 2012; Viglietta et al., 2004). However, we have recently shown that the suppressive function of CD4⁺CD25^{high} regulatory T cells was actually similar between MS patients and healthy individuals when adding the CD127 marker (Michel et al., 2008). Taken together, the concept of MS as a disease mainly mediated by T cells has been challenged and some lines of evidence support a prominent role of B cells in the disease physiopathology.

Indeed, while the intrathecal synthesis of immunoglobulins in the CSF of patients is a well-known feature of the disease, Serafini et al identified the additional presence of B cell follicles in the brain meninges of patients, which correlated with disease severity (Magliozzi et al., 2007; Serafini et al., 2004). Furthermore, peripheral B cell depletion using anti-CD20 monoclonal antibodies resulted in a significant improvement in the clinical and radiological inflammatory criteria of MS patients (Hauser et al., 2008; Kappos et al., 2011). However, interestingly, the improvement of clinical and radiological symptoms observed with the use of anti-CD20 seemed to be associated with the homeostasis of B cells after depletion, favoring a repopulation by B cells with regulatory properties (Duddy et al., 2007).

It has recently emerged that specific subsets of B cells may negatively regulate disease symptoms in mouse models of inflammation, cancer, infections and autoimmunity (Mauri 2012). The hallmark of these B cell subsets is the secretion of IL-10. In Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE), the animal model of MS, B cell μ MT-deficient mice have increased EAE severity during the late phase of the disease and do not fully recover when compared to wild-type mice (Wolf et al., 1996). Adoptively transferred wild-type B cells, but not IL-10^{-/-} B cells, normalized EAE severity in μ MT mice, suggesting the existence of a regulatory B cell sub-population that is able to produce IL-10 (Fillatreau et al., 2002).

In humans, regulatory B cells have recently been identified. However, the study of these cells is still in its infancy and their phenotype and mechanisms of action need to be more comprehensively described. In MS, several studies have reported a decreased secretion of IL-

10 by B cells (Correale et al., 2008; Duddy et al., 2007; Knippenberg et al., 2011), but these results remain controversial (Iwata et al., 2011). Moreover, the function of these IL10-producing regulatory B cells has never been explored. Thus, the aim of our study was to characterize the regulatory B cell frequency, phenotype and functional properties in the blood of MS patients by comparison with Healthy Volunteers (HV). We report no significant alteration in terms of IL-10-secreting B cell frequency and phenotype. Moreover we show that B cells from MS patients were able to inhibit CD4⁺CD25⁻ responding T cell proliferation in vitro in the same manner as B cells from HV. Altogether, our data do not suggest that a lack of B cell regulation contributes to the physiopathology of MS.

Patients, materials and methods:*Patients and Healthy volunteers:*

The 63 patients included in the study suffered from MS defined by the revised MacDonald criteria (Polman et al 2005). Different forms of MS were included in the study: Relapsing-Remitting (RR-MS, n=43), Primary Progressive (PP-MS, n=10) and Secondary Progressive (SP-MS, n=10). Fourteen patients were undergoing relapses during the study. The mean age was 43.4 ± 1.5 yrs (range: 18-73 yrs). All patients had been without treatment for at least three months (immunomodulatory treatments) or six months (immunosuppressant drugs). Fifty-eight healthy volunteers were studied in parallel as controls. The mean age was 39 ± 1.7 yrs (range: 18-68 yrs) and was not significantly different from that of MS patients. Patients and HV were recruited after obtaining informed consent. The University Hospital Ethical Committee and the Committee for the Protection of Patients from Biological Risks approved the study.

Human cell isolation and phenotype analysis:

One hundred ml blood samples were collected in EDTA vacutainers for all investigations. Patient and HV blood samples were always collected at the same time and used for parallel experiments. Fresh PBMCs were separated on a Ficoll (Eurobio®) gradient layer. 10^7 PBMCs were stained with anti-CD19-PC7 (clone SJ25C1), anti-CD24-PE (clone ML5), anti-CD38-FITC (clone HIT2), anti-CD5 APC (clone UCHT2), anti-CD27-alexa700 (clone M-T271) and anti-CD10-APC (clone HI10a) (BD Biosciences, San José USA). Viability staining was performed using the Live Dead cell aqua staining kit (Life Technologies, Invitrogen, Carlsbad, USA). Cells were analyzed using a LSR II flow cytometer (BD Immunocytometry Systems) and data were analyzed using FlowJo Version 9.0.1 (TreeStar).

Cell culture:

For the 5 hours of culture (B10 cells), PBMCs were stimulated at 10^6 /ml in complete RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, St Louis, USA) containing L-glutamine, non essential amino acids, Hepes, pyruvate sodium, 100 U/ μ g/ml penicillin/streptomycin (Life Technologies, Carlsbad, USA), and 10% FCS (Lonza) in 48-well plates (Nunc, Langensfeld, Germany). Stimulation was performed using CpG oligonucleotide (ODN 2006, 10 μ g/ml, Invivogen, San Diego, USA), PMA (250 ng/ml), Ionomycin (1 μ g/ml) and Brefeldin-A (BFA) (10 μ g/ml) (Sigma-Aldrich, St Louis, USA) for 5 hours at 37°C, 5% CO₂. As a control, PBMCs were cultured in resting conditions for 5 hours.

For the 48 hour culture (B10 pro cells), B cells were purified using the B cell isolation Kit II Human (Miltenyi, Bergisch Gladbach, Germany) according to the manufacturer's instructions. Purity was higher than 90%. B cells were then cultured in complete RPMI 1640, in 96-well U-bottom plates (Nunc, Langenselbold, Germany). B cells were cultured at a final concentration of 10^6 cells/ml. Stimulation was performed using CD40 Ligand (1 μ g/ml, RD systems, Minneapolis, USA) and CpG oligonucleotide (ODN 2006, 10 μ g/ml). Stimulated B lymphocytes were cultured for 48 hours at 37°C, 5% CO₂. PMA (250 ng/ml), Ionomycin (1 μ g/ml) and Brefeldin-A (10 μ g/ml) (Sigma-Aldrich, St Louis, USA) were added for the last 5 hours of culture. Culture supernatants were removed after 48 hours in a well where BFA had not been added. As a control, B cells were cultured for 48 hours without stimulation.

Analyses of proB10 cell IL-10 and other cytokine production and phenotype:

After 48 hours of culture, a viability staining was first performed using the Live Dead cell staining kit aqua (Invitrogen, Life technologies). B Lymphocytes were then stained with different combinations of extracellular antibodies: anti-CD19-PC7, anti-CD24 FITC (clone ML5), anti-CD27-alexa700, anti-CD38 PC5 (clone HIT2), anti-CD5-APC (BD Biosciences), and anti-TIM1-PE (clone 1D12). Cells were then washed, fixed and permeabilized using the Permeabilization/fixation Kit (BD Biosciences). Fc gamma receptor inhibitor (Ebiosciences, San Diego, USA) was used to avoid non-specific staining. For detection of intracellular IL-10, staining was performed using anti-IL10-APC (clone JES3-9D7) or anti-IL-10-PE (clone JES3-9D7). Appropriate PE or APC-conjugated isotype controls were used for gate setting for IL-10 expression. Unstimulated B cells were also stained and used as a control for the gating strategy. All antibodies were purchased from BD Biosciences except for IL-10 APC and TIM-1 APC (Biolegend).

Alternatively, different cytokines (IL-10, IL-2, IL-6, IFN γ , TNF α) were measured in the culture supernatants using the Th1/Th2 Human kit cytometric beads assays (CBA Human Th1/Th2 Cytokine Kit II, BD Biosciences) according to the manufacturer's instructions.

B Cell functional assays:

In order to explore the function of the Breg cells, coculture experiments were performed with prestimulated B cells and responding T cells using fresh blood samples from 11 HV and 10 MS patients. PBMCs were split into two batches. One batch was used to purify B cells using the B cell isolation Kit II Human. The B cells were then stimulated for 24 hours with CD40L (1 μ g/ml) and CpG ODN (10 μ g/ml), in a 96-well U-bottom plate at a concentration of 10^6

cells/ml. These B lymphocytes were called « prestimulated B cells ». The other batch of PBMCs was kept at 4 °C in complete medium for 24h. CD4⁺CD25⁻ responding T cells and unstimulated B cells were purified using specific MACS separation kits (CD4⁺ T cell human Isolation Kit, CD25⁺ microbeads II, B cell Isolation Kit II, Miltenyi). For the analysis of responding T cell proliferation, Cell Trace violet (Invitrogen, Life Technologies) was added to the T lymphocytes before coculture. Coculture assays were performed using 1x10⁵ prestimulated or unstimulated B cells and 0.5x10⁵ CD4⁺CD25⁻ responding T cells stimulated with anti-CD3 and anti-CD28.2 dynabeads (Invitrogen) for 72 hours. BFA was added for the last 4 hours at 10 µg/ml. Viability of T and B Lymphocytes was checked in half of the experiments by DAPI staining. Then, in order to explore the effect of prestimulated B cells on cytokine secretion by the responding T cells, cells were stained with anti-CD4-PE (clone, BD Biosciences), permeabilized, and stained with anti-IFN γ -APC (clone B27) and anti-TNF α -FITC (clone 6401.1111, BD Biosciences). These coculture assays were also performed using transwell polycarbonate inserts (0.4µm, Corning Incorporated, USA), and blocking experiments were performed using anti-IL-10 at 10 µg/ml (clone JES3-9D7), BD Biosciences) and anti-TGF β 1 at 10 µg/ml (Abcam, Cambridge, UK).

Statistics:

All values are expressed as mean \pm SEM. Analysis of significance was performed using Mann-Whitney (MW) or Wilcoxon paired tests with Prism software (Graphpad, La Jolia, USA). P-values below 0.05 were considered as statistically significant.

Results:*Frequencies of the B cell sub-populations in MS*

We first studied the frequencies of the different B cells subsets in 44 HV (mean age = 38.6 ± 1.9 yrs) and 50 MS patients (mean age = 43.3 ± 1.7 yrs) (NS, MW test). The association of CD38 and CD24 was used to distinguish CD24^{hi}CD38^{hi} immature/transitional B cells, CD24^{dim}CD38^{dim} mature naïve B cells, and CD24^{hi}CD38⁻ memory cells (Carsetti et al., 2004) that were also reported as being CD19⁺CD27⁺ cells. The use of CD10 enabled us to analyze the frequency of the CD24^{hi}CD38^{hi}CD10⁺ transitional T1 B cells. Last, we looked at CD5 expression by B cells, a marker for Bregs in mice (Yanaba et al., 2008).

No significant differences was found for the frequencies of CD24^{hi}CD38^{hi} immature/transitional B cells (6.4 ± 0.6 % in MS, 6 ± 0.5 % in HV, NS), CD24^{hi}CD38^{hi}CD10⁺ T1 cells (2.4 ± 1.6 % in MS, 2.3 ± 1.3 % in HV, NS) (Figure 1A, D), CD24^{dim}CD38^{dim} mature naïve B cells (57.2 ± 2.7 % in MS, 53.6 ± 2.4 % in HV, NS), CD24^{hi}CD38⁻ B cells (26 ± 2.8 in MS, 29.2 ± 2.3 in HV, NS) (Figure 1C), CD27⁺ memory B cells (24.7 ± 2.6 % in MS, 27.3 ± 2.1 % in HV, NS) and CD5⁺ B cells (12.5 ± 1.1 % in MS, 15.8 ± 1.3 % in HV, NS) (Figure 1F, 1E). A sub analysis was performed according to the different forms of MS and no difference was detected (data not shown).

Frequency and phenotype of B10 and B10pro cells in MS

Five hours stimulation with CpG ODN and PMA, Ionomycin and Brefeldin A (PIB) enables the analysis of the B10 pool, whereas 48 hours stimulation with CD40L, CpG ODN and PIB the last 5 hours enables the analysis of the B10pro pool (Iwata 2010). Thus, we analyzed the frequency of B10 and B10pro cells in 16 MS patients (mean age = 40.3 ± 2.0 yrs) and 21 HV (mean age = 40.4 ± 2.7 yrs, NS, MW test). No significant difference was observed for the frequency of B10 cells between MS and HV (1.3 ± 0.53 % in HV, 0.6 ± 0.3 % in MS patients $p=0.3$, MW test) (Figure 2A). Next, we analyzed the ability of maturation and differentiation of the B10pro cells into B10 cells by a 48-hour stimulation protocol. No difference was detected in the frequency of B10pro cells between the two groups (7.7 ± 0.64 % in HV, 7.8 ± 0.9 % in MS patients, $p=0.84$, MW test) (Figure 2 B, D). These results were confirmed when measuring IL-10 secretion by B cells in the 48h culture supernatants (without BFA), with a cytometric bead assay (Figure 2C). The quantity of IL-10 secretion was 557.5 ± 120.7 pg/ml in HV, compared to 671.4 ± 154.1 pg/ml in MS patients (NS, MW test). No significant difference was observed between the two groups for the other cytokines tested: IL-2, -4, -6, TNF- α and IFN- γ (data not shown).

Altogether, these data show that the capacity for IL-10 secretion by B cells (B10 and B10pro) is similar between MS patients and HV.

Phenotypic characterization of B10pro cells

Different combinations of cell staining were performed after the 48 hours of stimulation to characterize the phenotype of B10pro cells: anti-CD24 and anti-CD27 for the memory phenotype (CD24⁺CD27⁺), anti-CD24 and anti-CD38 for the different subsets of B cells (Immature/transitional: CD24^{hi}CD38^{hi}, mature naïve: CD24^{dim}CD38^{dim}, and memory: CD24^{hi}CD38⁻ B cells) and anti-CD5. We first report that, in HV, B10pro cells were mainly CD24⁺CD27⁺/CD24^{hi}CD38⁻ memory cells and CD24^{hi}CD38^{hi} immature/transitional B cells. Indeed, 54.7±4.8% of B10pro cells were CD24⁺CD27⁺ memory cells compared to only 36.4±4.1% of the global B cell population (p<0.0001; Figure 3A). Similarly, 44.5±4.5% of B10pro cells displayed a CD24^{hi}CD38⁻ memory phenotype compared to 34.8±4.3% of the global B cell population (p<0.05, Figure 3C) and 8.9±1.1% of B10pro cells displayed a CD24^{hi}CD38^{hi} transitional B cell phenotype compared to 3.7±0.5% only for the global B cell population (p<0.001; Figure 3C).

These results were confirmed when we analyzed IL-10 secretion by the CD24⁺CD27⁺ and CD24⁻CD27⁻ B cell subsets after 48 hours stimulation. In accordance with the CD24⁺CD27⁺ memory B10pro cells phenotype, we found a significant increase in IL-10 secretion by CD24⁺CD27⁺ memory cells compared to the CD24⁻CD27⁻ naïve B cells (12.6±1.4% vs. 5.6±0.8% respectively, p<0.001) (Figure 3B). Finally we found that more B10pro cells expressed CD5 as compared to the global B cell population (15.7±2.3% vs. 10.9±1.6% in the total B cell population, p<0.01). Interestingly, the same analysis performed in MS patients did not reveal any difference with HV (Figure 3A, B, D, E). Finally, no preferential TIM-1 expression was observed for B10pro cells (1.6±0.4%) and 13.9±3.1% of TIM1⁺ B cells were able to secrete IL-10 after 48 hours of stimulation (data not shown, n=5 HV).

Altogether, these data show that memory and transitional/immature B cells preferentially contained the majority of B10pro cells. No significant difference was observed between MS and HV in the frequency and the phenotype of the B cell subsets including the B10pro subset, suggesting that there is no defect in B cells with a potentially regulatory phenotype in the blood of MS patients.

Inhibition of autologous CD4⁺CD25⁻ T cell proliferation by prestimulated B cells

We developed a coculture assay to compare the suppressive properties of B cells in 10 MS patients (mean age=51±3.7 yrs) vs. 11 HV (mean age=44.5±4.1 yrs, NS, MW test). Unstimulated or prestimulated B cells (by CD40L and ODN for 24 hours) were cocultured with CD4⁺CD25⁻ responding T cells stimulated with anti-CD3/anti-CD28.2 dynabeads for 3 days. T cell proliferation was measured by loss of cell trace violet by flow cytometry at day 3. When prestimulated B cells were added to the responding CD4⁺CD25⁻ T cells at a ratio of 2:1, we observed a significant decrease in the CD4⁺CD25⁻ T cell proliferation (40.5±3.8% LT cell trace^{low}) compared to the stimulated CD4⁺CD25⁻ T cells alone (72±2.8% of LT cell trace^{low}, p<0.001) with a mean inhibition of 44.5±4.4 % in HV. Interestingly, the inhibition of CD4⁺CD25⁻ T cell proliferation was also observed when unstimulated B cells were added to the culture, but with a lower efficiency (inhibition of 25.3±4.7%, p<0.001; Figure 4A). The same coculture experiments were performed in 10 MS patients. As in HV, CD4⁺CD25⁻ T cell proliferation was significantly decreased when adding the prestimulated B cells (66.8±5.9% LT cell trace^{low} vs. 41.7±5.5%, p<0.05) with a mean inhibition of 39±4.9% (Figure 4B), but no difference was observed between MS and HV.

Thus, altogether these data suggest that B cells (prestimated or not) from MS patients are able to inhibit the proliferation of CD4⁺CD25⁻ T cells in a same manner as B cells from HV.

Pre-stimulated B cells do not alter the secretion of IFN- γ and TNF- α by CD4⁺CD25⁻ T cells

Using similar experimental settings, we analyzed the influence of B cells on the cytokine secretion by CD4⁺CD25⁻ T cells. In the absence of B cells, 11.45±2% IFN γ ⁺ and 9.5±5.8% TNF α ⁺ CD4⁺CD25⁻ T cells were found respectively. When prestimulated B cells were added (ratio 2:1), the percentage of IFN- γ ⁺ and TNF- α ⁺ CD4⁺CD25⁻ T cells remained stable (9.2±1.6% of IFN- γ ⁺CD4⁺CD25⁻ and 9.1±4.8% of TNF- α ⁺CD4⁺CD25⁻ in HV (Figure 4D). Similar results were observed for MS patients with 13.4±2.2% IFN- γ ⁺CD4⁺CD25⁻ T cells and 9.3±1.6% TNF- α ⁺CD4⁺CD25⁻ T cells before addition of prestimulated B cells. When prestimulated B cells were added to CD4⁺CD25⁻ T cells, the mean frequency of IFN- γ ⁺ and TNF- α ⁺ CD4⁺CD25⁻ T cells was 10.7±1.5% and 6.8±0.8% respectively, (NS).

Altogether, these data suggest that despite being able to decrease the proliferation of CD4⁺CD25⁻ T cells, prestimulated B cells have no effect on TNF- α and IFN- γ production, neither in MS nor in HV.

The inhibition of responding CD4⁺CD25⁻ T cell proliferation by prestimulated B cells is contact-dependent

To characterize the mechanisms of suppression of CD4⁺CD25⁻ responding T cell proliferation by prestimulated B cells, blocking experiments using blocking anti-IL10 and anti-TGFβ antibodies, and coculture using transwell inserts were performed. First, we found that the inhibition of CD4⁺CD25⁻ T cell proliferation by prestimulated B cells could be abrogated when the cells were physically separated by transwell inserts. Indeed, in the presence of transwells, the proliferation of responding T cells (63±2.6% of Cell Trace^{low} in HV and 69.2±7.3% in MS), was similar to that observed in the control setting (72±2.8% and 66.8±5.9% Cell Trace^{low} in HV and MS patients respectively; Figure 4A, 4B). In contrast, the addition of blocking anti-IL10 or anti-TGFβ antibodies had no effect on the regulatory property of the prestimulated B cells on the responding CD4⁺CD25⁻ T cell proliferation (Figure 4C) whatever the group of patients tested (40.5±3.8% and 42±8.3% LT Cell Trace^{low} with anti-IL-10mAb, and 31.6±6.5% and 31.7±5.7% with anti-TGF-β mAb for HV and MS respectively, as compared to 40.5±3.8% and 41.7±5.5% in HV and MS respectively without any blocking antibody).

Altogether these data suggest that the regulatory effect of prestimulated B cells on CD4⁺CD25⁻ T cell proliferation requires cell contact between B and T cells and is not mediated by an associated regulatory cytokine (IL-10 and/or TGF-β). Moreover, a similar effect is observed in HV and MS patients, again suggesting a lack of an inhibitory defect in the Breg cell population in MS.

Discussion

Despite being considered as a T cell-mediated disease, more and more data generated over recent years support a prominent role for B cells in the physiopathology of MS (Franciotta et al., 2008). In fact, the beneficial effect of anti-CD20 therapy in RR-MS may be due to the depletion of pathogenic B cells but also to the restoration of an immune B cell homeostasis with an increase in peripheral Bregs (Duddy et al., 2007; Hauser et al., 2008; Kappos et al., 2011; Leandro et al., 2006).

Regulatory mechanisms in MS have been extensively explored, especially those involving natural regulatory T cells (nTregs) (Lowther and Hafler, 2012). In this study, we challenged the regulatory properties of IL-10 secreting B cells, a “new” population recently described in humans. To our knowledge, this is the first analysis of the suppressive capacity of regulatory B cells in patients with MS. We showed that untreated patients with MS display the same IL-10 B10pro and B10 secreting cell frequency and phenotype as healthy volunteers. We showed that these cells are able to suppress CD4⁺CD25⁻ T cell proliferation, confirming their inhibitory properties, but without altering Th1 cytokine secretion. Hence, the amount of suppression observed was similar between MS patients and HV.

These results do not corroborate those of two other groups who reported that B cells from MS patients exhibited a decreased IL-10 production (Duddy et al., 2007; Knippenberg et al., 2011). However, these results are not consensual and contradictory results have also been reported, with even a significantly increased IL-10 secretion by B cells in patients with MS (Iwata et al., 2011). These discrepancies are surprising but may be explained by the different protocols used in these studies with different periods of culture and activation, but also, by the recruitment of treated MS patients in two of these studies (Iwata et al., 2011; Knippenberg et al., 2011). Indeed, in contrast with these two reports, we chose to only include MS patients that had been without treatment for at least 3 months. Moreover, we measured IL-10 secretion using two different methods (staining of IL-10⁺ B cells, and quantification of IL-10 production by CBA), confirming the absence of a defect in MS. Finally, Knippenberg’s group reported on a significant decrease in IL-10 secretion by B cells in treated MS patients, associated with a significant decrease in memory CD27⁺ B cells in MS patients compared to HV. As the authors stated, the decrease in memory B cells in their study was probably due to the treatment by Interferon (Niino et al., 2009). Interestingly, we showed that IL-10 secretion was mainly produced by memory B cells, which could explain this decreased IL-10 secretion in Knippenberg’s study. Moreover, their level of IL-10 secretion, even in HV, was low (4.4%

of IL-10⁺ B cells) compared to our work (7.7%), suggesting that their stimulation protocol may have been suboptimal.

Through our work, we also analyzed and compared the phenotype and the mechanisms of action of IL-10⁺ regulatory B cells in HV and MS patients. We provide new data on the different markers expressed by these cells. Particularly, we found a significant enrichment of B10pro cells within the CD24^{hi}CD27⁺ memory B cell compartment (with 54.7% of CD24^{hi}CD27⁺ B10pro), but we also observed that IL-10⁺ B cells are not restricted to this compartment and are present within the different subsets of B cells, such as transitional/immature B cells expressing the CD38 marker. Our results are in accordance with those from Bouaziz and colleagues and Iwata and colleagues (Bouaziz et al. 2010, Iwata et al. 2011). However, in contrast with Blair et al. (Blair et al. 2010), we did not find an exclusive CD19⁺CD38^{hi}CD24^{hi} immature/transitional B cell phenotype in our B10pro cells. Nevertheless, we cannot exclude the possibility that, as in mice models, different regulatory B cell populations may coexist, and that the different stimulation protocols used also recruit different kinds of suppressive B cells.

Recently, TIM-1, a costimulatory molecule that regulates immune responses by modulating CD4⁺ T cell effector differentiation, was reported as a specific marker of regulatory B cells in mice (Ding et al. 2011, Xiao et al. 2012). We looked at TIM-1 expression by B cells in 5 HV and we found that only 1.6% of B10pro cells expressed TIM-1 and that only 13.9 % of TIM-1⁺ B cells secreted IL-10, suggesting that this molecule is not a specific marker of B10 pro cells in humans.

We also looked at the suppressive capacity of B cells in MS as compared to HV. Suppressive experiments were designed to explore the regulatory function of B cells (prestimulation for 24 hours with CD40L and ODN) on CD4⁺CD25⁻ T cell proliferation and Th1 cytokine secretion. We reported a significant inhibition of proliferation of CD4⁺CD25⁻ T cells when prestimulated B cells were added, in a contact dependent manner. This effect seemed to be independent from IL10 and/or TGFβ secretion, since adding IL10/TGFβ blocking antibodies did not alter the suppressive activity of these cells. In animal models of autoimmune diseases, IL-10 secretion appears to be necessary for the regulatory effects of B cells (Evans et al., 2007; Fillatreau et al., 2002; Matsushita et al., 2008; Mauri et al., 2003; Yanaba et al., 2008). However, other cytokines have also been implicated in these suppressive effects. In fact, in an animal model of type I diabetes, the regulatory B cells secrete TGFβ but very little IL-10 (Tian et al., 2001). However, contact between regulatory B cells and T cells also seems to be required, as shown in various animal models of EAE or colitis (Mann et al., 2007; Mizoguchi

et al., 2000). In humans, Blair et al. described an inhibition of Th1 cytokine secretion in an IL-10 dependent manner (only for inhibition of TNF α secretion) and an CD80/86 dependent manner (for inhibition of TNF α and IFN γ secretion) (Blair et al., 2010). Lemoine et al confirmed an IL-10 and contact-dependent inhibition of Th1 cytokine secretion by B cells (Lemoine et al., 2011). Interestingly, as in our own study, the inhibition of CD4⁺ T cell proliferation was only contact-dependent.

In our study, we also observed a significant decrease in CD4⁺ T cell proliferation when adding unstimulated B cells, even though the level of inhibition was lower than when using prestimulated B cells. It seems likely that these “unstimulated” B cells contain B10 cells that regulate responding T cell proliferation. A complementary explanation would be a differentiation of some B10pro cells within these “unstimulated” B cells, favored by interactions with T cells during the 48-hour coculture.

In contrast with other studies (Blair et al., 2010; Lemoine et al., 2011), we did not find any inhibition of Th1 cytokine secretion after addition of prestimulated B cells. One explanation could be the relative shortness of the culture period (3 days) compared to these two studies, a duration that was preferentially chosen because of the significant increase in B cell death after 3 days of culture. No defect in suppression of CD4⁺CD25⁻ T cell proliferation by prestimulated B cells was observed in MS patients.

Of course, examining the peripheral compartment may be limiting and we cannot exclude the possibility that regulatory cells are defective in the context of an inflammatory CNS. In fact, in the mouse EAE model, Korn et al. showed that, during the peak of the disease, regulatory T cells could not suppress inflammation, due to the secretion of IL-6 and TNF α by pathogenic effector T cells (Korn et al., 2007). Thus, we could hypothesize that, like nTregs, regulatory B cells could be outweighed in an inflammatory context. Nevertheless, obtaining access to these central regulatory B cells is very difficult, because of the rarity of these cells in the CSF, the problem of limited accessibility of cerebral material and the lack of specific staining of these Breg cells.

On the other hand, we can also argue that regulatory B cells could have difficulties accessing the CNS and would not be able to regulate autoreactive cells inside the brain. Indeed, nTregs are rare or undetectable in MS brain lesions (Fritzsching et al., 2011; Tzartos et al., 2008). To our knowledge no studies have yet explored the presence of IL-10⁺ B cells inside the cerebral parenchyma in MS patients.

Finally, the presence of lymphoid follicles in the meninges of some patients (Magliozzi et al., 2007; Serafini et al., 2004) and the antigen specificity of CSF Igs reported in several studies (Lambracht-Washington et al., 2007; von Budingen et al., 2008), suggest an Ag-specific proliferation of B cells in the CNS of MS patients. Thus, a defect of an Ag-specific regulatory B cell subset in patients with MS that we could not detect using a polyclonal stimulation is fully possible.

In conclusion, for the first time we report a normal IL-10 secreting B cell frequency and phenotype in the blood of patients with MS. These cells are able to inhibit CD4⁺CD25⁻ responding T cell proliferation in vitro to the same extent as B cells from HV, suggesting that a lack of peripheral regulation by B cells does not contribute to the physiopathology of the disease. Further studies are necessary to better characterize these regulatory B cells and to determine the existence of several subsets according to the level of stimulation in a particular inflammatory context.

References:

- Blair, P.A., Norena, L.Y., Flores-Borja, F., Rawlings, D.J., Isenberg, D.A., Ehrenstein, M.R., Mauri, C., 2010. CD19(+)CD24(hi)CD38(hi) B cells exhibit regulatory capacity in healthy individuals but are functionally impaired in systemic Lupus Erythematosus patients. *Immunity*. 32, 129-40.
- Bouaziz, J.D., Calbo, S., Maho-Vaillant, M., Saussine, A., Bagot, M., Bensussan, A., Musette, P., 2010. IL-10 produced by activated human B cells regulates CD4(+) T-cell activation in vitro. *Eur J Immunol*. 40, 2686-91.
- Carsetti, R., Rosado, M.M., Wardmann, H., 2004. Peripheral development of B cells in mouse and man. *Immunol Rev*. 197, 179-91.
- Correale, J., Farez, M., Razzitte, G., 2008. Helminth infections associated with multiple sclerosis induce regulatory B cells. *Ann Neurol*. 64, 187-99.
- Ding, Q., Yeung, M., Camirand, G., Zeng, Q., Akiba, H., Yagita, H., Chalasani, G., Sayegh, M.H., Najafian, N., Rothstein, D.M., 2011. Regulatory B cells are identified by expression of TIM-1 and can be induced through TIM-1 ligation to promote tolerance in mice. *J Clin Invest*. 121, 3645-56.
- Duddy, M., Niino, M., Adatia, F., Hebert, S., Freedman, M., Atkins, H., Kim, H.J., Bar-Or, A., 2007. Distinct effector cytokine profiles of memory and naive human B cell subsets and implication in multiple sclerosis. *J Immunol*. 178, 6092-9.
- Elong Ngono A., P.S., Salou M., Bahbouhi B., Soullillou J-P., Brouard S., Laplaud D-A., 2012. Frequency of circulating autoreactive T cells committed to myelin determinants in relapsing-remitting Multiple Sclerosis patients. *Clin Immunol*. In press.
- Evans, J.G., Chavez-Rueda, K.A., Eddaoudi, A., Meyer-Bahlburg, A., Rawlings, D.J., Ehrenstein, M.R., Mauri, C., 2007. Novel suppressive function of transitional 2 B cells in experimental arthritis. *J Immunol*. 178, 7868-78.
- Fillatreau, S., Sweeney, C.H., McGeachy, M.J., Gray, D., Anderton, S.M., 2002. B cells regulate autoimmunity by provision of IL-10. *Nat Immunol*. 3, 944-50.
- Franciotta, D., Salvetti, M., Lolli, F., Serafini, B., Aloisi, F., 2008. B cells and multiple sclerosis. *Lancet Neurol*. 7, 852-8.
- Fritzsche, B., Haas, J., König, F., Kunz, P., Fritzsche, E., Poschl, J., Krammer, P.H., Brück, W., Suri-Payer, E., 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.
- Hauser, S.L., Waubant, E., Arnold, D.L., Vollmer, T., Antel, J., Fox, R.J., Bar-Or, A., Panzara, M., Sarkar, N., Agarwal, S., Langer-Gould, A., Smith, C.H., 2008. B-cell depletion with rituximab in relapsing-remitting multiple sclerosis. *N Engl J Med*. 358, 676-88.
- Hohlfeld, R., Wekerle, H., 2004. Autoimmune concepts of multiple sclerosis as a basis for selective immunotherapy: from pipe dreams to (therapeutic) pipelines. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101 Suppl 2, 14599-606.
- 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., Hall, R.P., St Clair, E.W., Tedder, T.F., 2011. Characterization of a rare IL-10-competent B-cell subset in humans that parallels mouse regulatory B10 cells. *Blood*. 117, 530-41.
- Kappos, L., Li, D., Calabresi, P.A., O'Connor, P., Bar-Or, A., Barkhof, F., Yin, M., Leppert, D., Glanzman, R., Tinbergen, J., Hauser, S.L., 2011. Ocrelizumab in relapsing-remitting multiple sclerosis: a phase 2, randomised, placebo-controlled, multicentre trial. *Lancet*. 378, 1779-87.
- Knippenberg, S., Peelen, E., Smolders, J., Thewissen, M., Menheere, P., Cohen Tervaert, J.W., Hupperts, R., Damoiseaux, J., 2011. 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*. 239, 80-6.
- Korn, T., Reddy, J., Gao, W., Bettelli, E., Awasthi, A., Petersen, T.R., Backstrom, B.T., Sobel, R.A., Wucherpfennig, K.W., Strom, T.B., Oukka, M., Kuchroo, V.K., 2007. Myelin-specific regulatory T cells accumulate in the CNS but fail to control autoimmune inflammation. *Nat Med*. 13, 423-31.

- Lambracht-Washington, D., O'Connor, K.C., Cameron, E.M., Jowdry, A., Ward, E.S., Frohman, E., Racke, M.K., Monson, N.L., 2007. Antigen specificity of clonally expanded and receptor edited cerebrospinal fluid B cells from patients with relapsing remitting MS. *J Neuroimmunol.* 186, 164-76.
- Leandro, M.J., Cambridge, G., Ehrenstein, M.R., Edwards, J.C., 2006. Reconstitution of peripheral blood B cells after depletion with rituximab in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 54, 613-20.
- Lemoine, S., Morva, A., Youinou, P., Jamin, C., 2011. Human T cells induce their own regulation through activation of B cells. *J Autoimmun.* 36, 228-38.
- Lowther, D.E., Hafler, D.A., 2012. Regulatory T cells in the central nervous system. *Immunol Rev.* 248, 156-69.
- Magliozzi, R., Howell, O., Vora, A., Serafini, B., Nicholas, R., Puopolo, M., Reynolds, R., Aloisi, F., 2007. Meningeal B-cell follicles in secondary progressive multiple sclerosis associate with early onset of disease and severe cortical pathology. *Brain.* 130, 1089-104.
- Mann, M.K., Maresz, K., Shriver, L.P., Tan, Y., Dittel, B.N., 2007. B cell regulation of CD4+CD25+ T regulatory cells and IL-10 via B7 is essential for recovery from experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol.* 178, 3447-56.
- Matsushita, T., Yanaba, K., Bouaziz, J.D., Fujimoto, M., Tedder, T.F., 2008. Regulatory B cells inhibit EAE initiation in mice while other B cells promote disease progression. *J Clin Invest.* 118, 3420-30.
- Mauri, C., Gray, D., Mushtaq, N., Londei, M., 2003. Prevention of arthritis by interleukin 10-producing B cells. *J Exp Med.* 197, 489-501.
- Michel, L., Berthelot, L., Pettre, S., Wiertlewski, S., Lefrere, F., Braudeau, C., Brouard, S., Soulillou, J.P., 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, 3411-9.
- Mizoguchi, E., Mizoguchi, A., Preffer, F.I., Bhan, A.K., 2000. Regulatory role of mature B cells in a murine model of inflammatory bowel disease. *Int Immunol.* 12, 597-605.
- Niino, M., Hirotsu, M., Miyazaki, Y., Sasaki, H., 2009. Memory and naive B-cell subsets in patients with multiple sclerosis. *Neurosci Lett.* 464, 74-8.
- Serafini, B., Rosicarelli, B., Magliozzi, R., Stigliano, E., Aloisi, F., 2004. Detection of ectopic B-cell follicles with germinal centers in the meninges of patients with secondary progressive multiple sclerosis. *Brain Pathol.* 14, 164-74.
- Sospedra, M., Martin, R., 2005. Immunology of multiple sclerosis. *Annu Rev Immunol.* 23, 683-747.
- Tian, J., Zekzer, D., Hanssen, L., Lu, Y., Olcott, A., Kaufman, D.L., 2001. Lipopolysaccharide-activated B cells down-regulate Th1 immunity and prevent autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice. *J Immunol.* 167, 1081-9.
- Tzartos, J.S., Friese, M.A., Craner, M.J., Palace, J., Newcombe, J., Esiri, M.M., 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, 146-55.
- Viglietta, V., Baecher-Allan, C., Weiner, H.L., Hafler, D.A., 2004. Loss of functional suppression by CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. *J Exp Med.* 199, 971-9.
- von Budingen, H.C., Harrer, M.D., Kuenzle, S., Meier, M., Goebels, N., 2008. Clonally expanded plasma cells in the cerebrospinal fluid of MS patients produce myelin-specific antibodies. *Eur J Immunol.* 38, 2014-23.
- Wolf, S.D., Dittel, B.N., Hardardottir, F., Janeway, C.A., Jr., 1996. Experimental autoimmune encephalomyelitis induction in genetically B cell-deficient mice. *J Exp Med.* 184, 2271-8.
- Xiao, S., Brooks, C.R., Zhu, C., Wu, C., Sweere, J.M., Petecka, S., Yeste, A., Quintana, F.J., Ichimura, T., Sobel, R.A., Bonventre, J.V., Kuchroo, V.K., 2012. Defect in regulatory B-cell function and development of systemic autoimmunity in T-cell Ig mucin 1 (Tim-1) mucin domain-mutant mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 109, 12105-10.
- Yanaba, K., Bouaziz, J.D., Haas, K.M., Poe, J.C., Fujimoto, M., Tedder, T.F., 2008. A regulatory B cell subset with a unique CD1dhiCD5+ phenotype controls T cell-dependent inflammatory responses. *Immunity.* 28, 639-50.

Legends:

Figure 1: Frequencies of the different subsets of B cells in HV and MS patients. The frequency of the various B cell subsets was analyzed in the blood of HV and MS patients and is expressed as a percentage of each B cell subset within the B cells. A- CD24^{hi}CD38^{hi} transitional and CD24^{hi}CD38^{hi}CD10⁺ transitional T1 B- CD24^{dim}CD38^{dim} mature naïve B cells. C-D CD24^{hi}CD38⁻ memory B cells (C) and CD27⁺ B cells (D). E- CD5⁺ B cells. All the tests performed are MW tests (* p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001).

Figure 2: B cells from HV and MS patients exhibit similar IL-10 production. A- Identification of the B10 cells in HV and MS patients after 5 hours of stimulation with CpG ODN and PIB. B- Identification of the B10pro cells in HV and MS patients after 48 hours of stimulation with CD40L, CpG ODN and PIB for the last 5 hours. C- Measurement of IL-10 in the 48h culture supernatants of B cells after stimulation by CD40L, CpG ODN, and PI for the last 5 hours. D- Representative experiment of IL-10 secretion by flow cytometry in one HV. B cells were stimulated for 48 hours with CD40L and CpG ODN and PIB for the last 5 hours. IL-10 secretion was studied using anti-IL10-PE and anti-CD19-PC7. Then the phenotype of the IL-10⁺ B cells was analyzed using (i) anti-CD24-FITC, anti-CD27-a700, (ii) anti-CD24-FITC, anti-CD38-PC5, (iii) anti-CD5 APC combination. All the tests performed are MW tests (* p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001).

Figure 3: Analysis of the phenotype of B10pro cells in HV and MS patients by flow cytometry. A- Expression of CD24 and CD27 by B10pro and B cells. B- IL10 secretion by CD24⁺CD27⁺ memory cells compared to the CD24⁻CD27⁻ cells. C- D- phenotype of B10pro using the CD24/CD38 combination. E- CD5 expression by B10pro cells. All the tests performed are Wilcoxon paired tests (* p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001).

Figure 4: Prestimulated B cells are able to inhibit CD4⁺CD25⁻ T cell proliferation but not IFN- γ and TNF- α production. Coculture assays in HV (n=11) and MS patients (n=10) were performed by culturing prestimulated or unstimulated B cells with autologous CD4⁺CD25⁻T cells at a ratio of 2:1 for 3 days in the presence or absence of anti-CD3 and anti-CD28 coated beads (stimulated LT or unstimulated LT). Regulation of CD4⁺CD25⁻ T cell proliferation in HV (A, C), and MS (B) and secretion of TNF- α and IFN- γ in HV (D) and MS (E) were analyzed by flow cytometry. Blocking anti-IL-10 and anti-TGF- β antibodies were added for

some experiments (C). All the tests performed are Wilcoxon paired tests (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

Figure 1

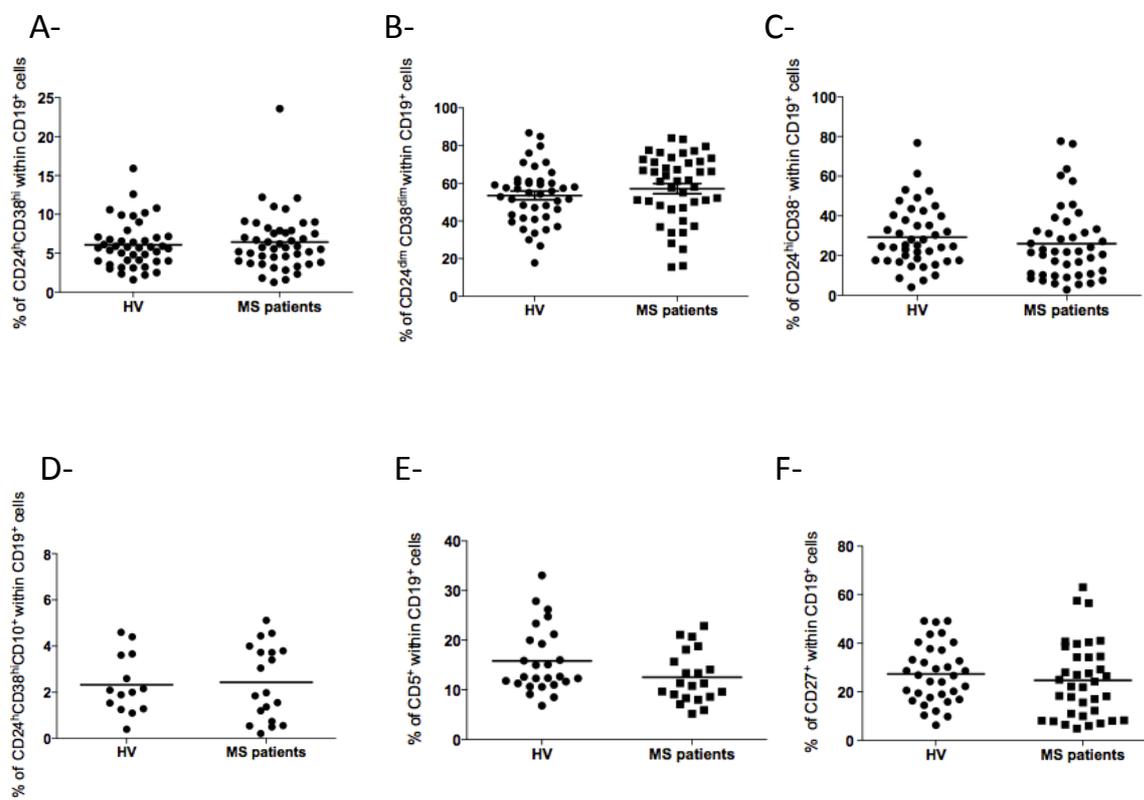


Figure 2 :

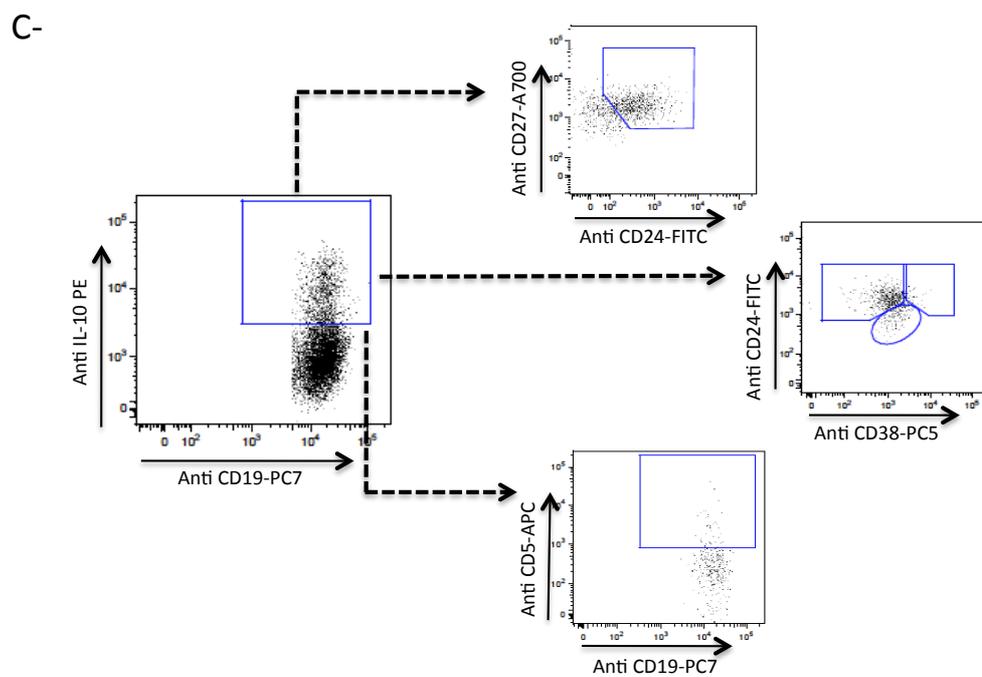
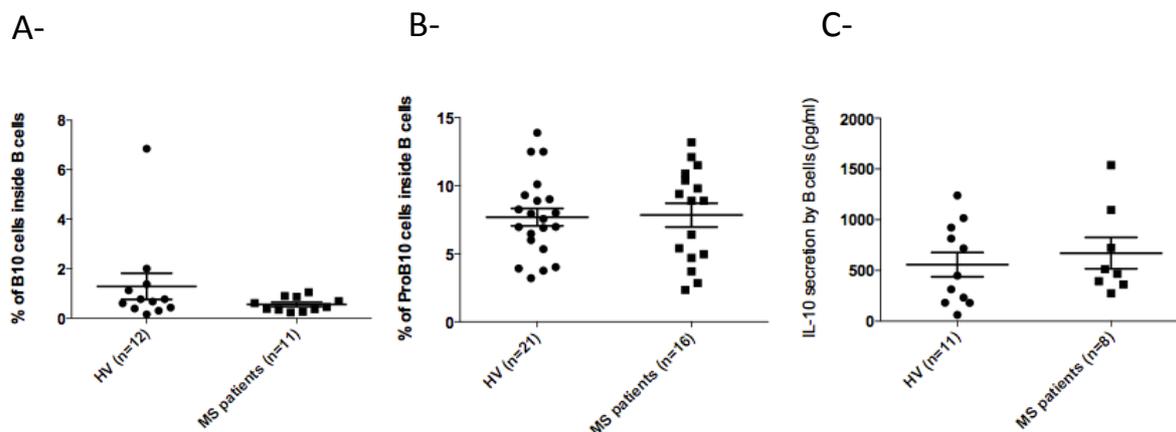


Figure 3 :

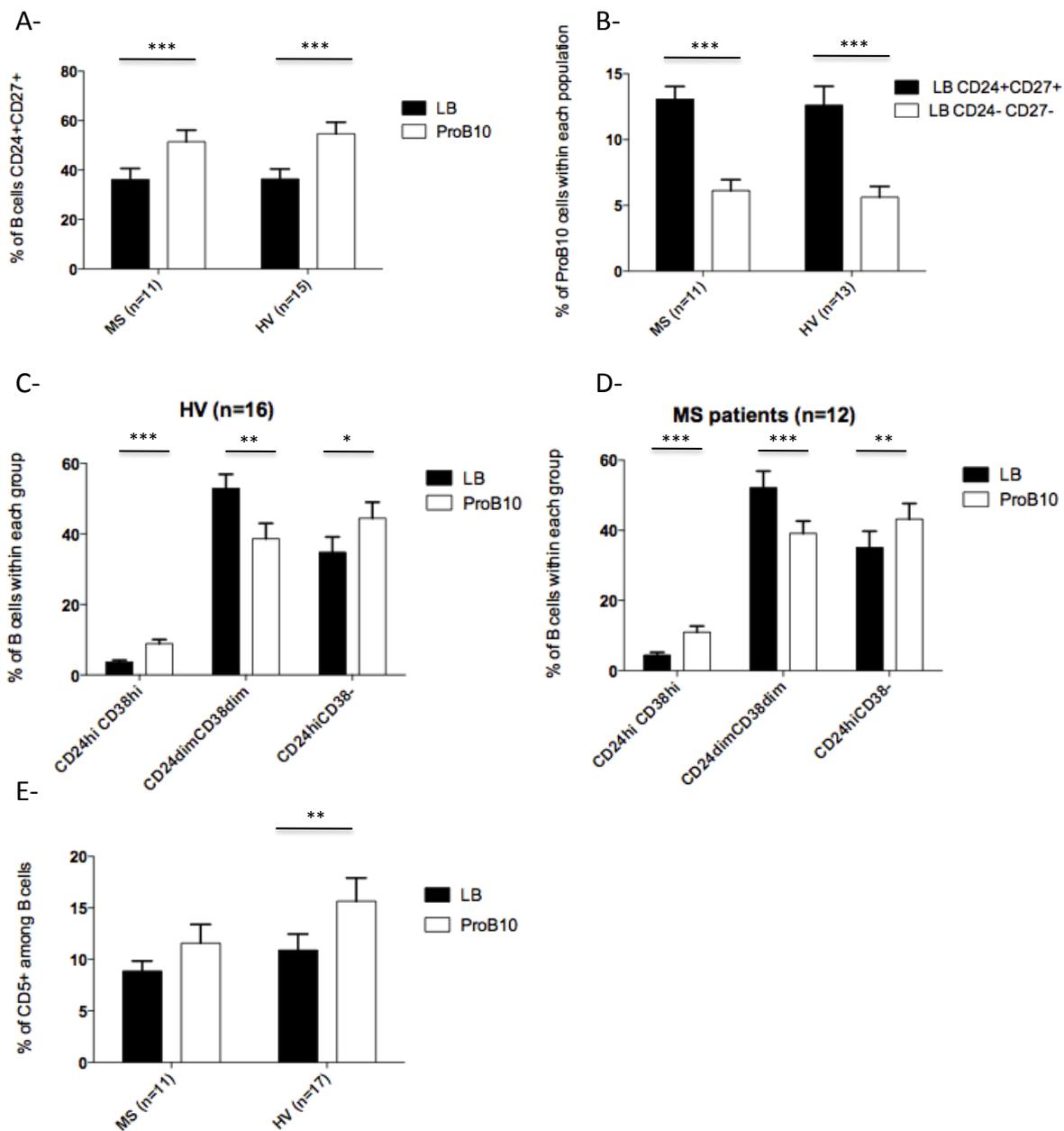
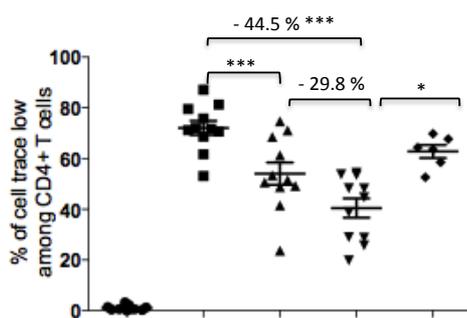


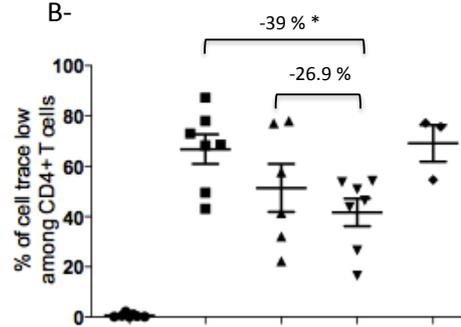
Figure 4 :

A-



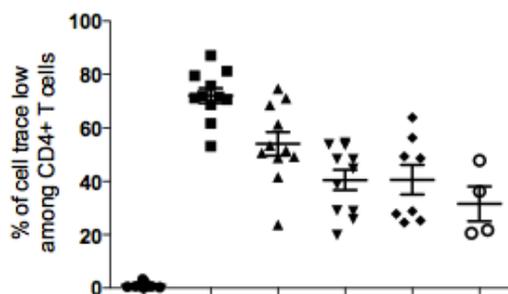
Unstimulated LT CD4+CD25-	+	-	-	-	-
Stimulated LT CD4+ CD25-	-	+	+	+	+
Unstimulated LB CD19+	-	-	+	-	-
Stimulated LB CD19+	-	-	-	+	+
Transwells	-	-	-	-	+

B-



Unstimulated LT CD4+CD25-	+	-	-	-	-
Stimulated LT CD4+ CD25-	-	+	+	+	+
Unstimulated LB CD19+	-	-	+	-	-
Stimulated LB CD19+	-	-	-	+	+
Transwells	-	-	-	-	+

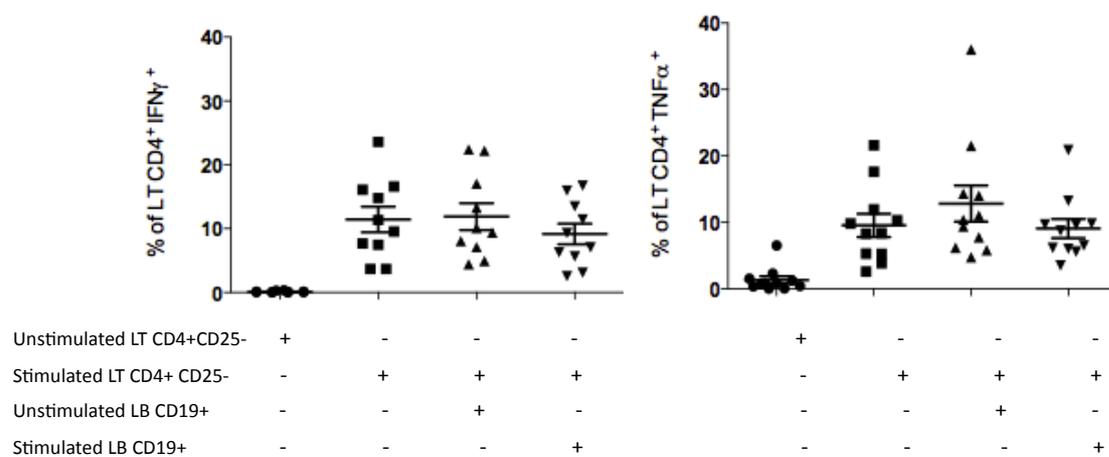
C-



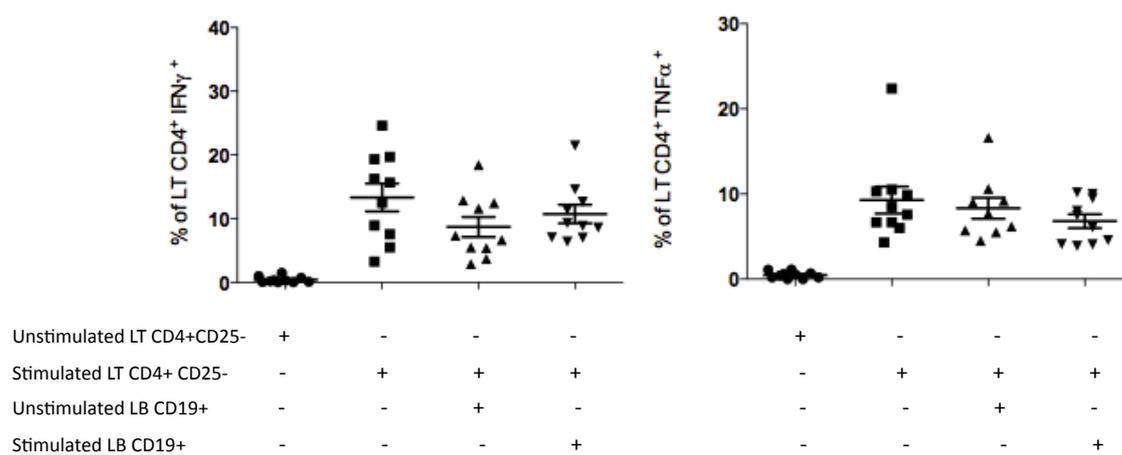
Unstimulated LT CD4+CD25-	+	-	-	-	-	-
Stimulated LT CD4+ CD25-	-	+	+	+	+	+
Unstimulated LB CD19+	-	-	+	-	-	-
Stimulated LB CD19+	-	-	-	+	+	+
Anti-IL10	-	-	-	-	+	-
Anti TGFb	-	-	-	-	-	+

Figure 4 :

D-



E-



III- Revue : Multiple sclerosis and immune regulation

Multiple sclerosis and immune regulation

Laure Michel^{1,2}, Jean-Paul Soulillou¹, David-Axel Laplaud^{1,2,*}, Sophie Brouard^{1,*}

¹: Institut de Transplantation Et de Recherche en Transplantation, Inserm UMR1064, Nantes

²: Service de Neurologie, CHU Nord Laennec, 44093 Nantes, France

*: Both authors contribute equally to the work

Corresponding author: Sophie Brouard, INSERM 1064, CHU Hôtel Dieu, 30 Bd Jean Monnet, 44093 Nantes, France.

E-mail: Sophie.brouard@univ-nantes.fr

Fax: + 33 240087411

Tel: + 33 240087410

Words count:

Text: 4992

Key words: Multiple sclerosis - B cells - T cells - Regulation

Introduction

Multiple Sclerosis (MS) is an inflammatory demyelinating disease of the Central Nervous System (CNS) classically characterized by the recruitment of activated T cells and macrophages into the CNS. In the past few years, the concept of MS as a disease mainly mediated by autoreactive T cells has been challenged. In fact, this disorder is thought to be initiated by autoreactive T cells recognizing peptides from myelin sheath proteins (Hohlfeld and Wekerle, 2004; Sospedra and Martin, 2005). However, using different methods (Quantitative PCR, cytometry, elispot or tetramers) numerous teams have studied the frequency of autoreactive CD4⁺ or CD8⁺ T lymphocytes recognizing MBP, -MOG or -PLP in the blood of MS patients. Some studies described a similar frequency of T cells recognizing myelin peptides compared to Healthy Volunteers (Berthelot et al., 2008; Hellings et al., 2001; Jingwu et al., 1992), whereas others suggested a significant increase of these autoreactive T cells in MS patients (Bahbouhi et al., 2010; Chou et al., 1992; Olsson et al., 1992; Pender et al., 2000; Wallstrom et al., 1998). To conclude, despite the presence of autoreactive T cells in the periphery of MS patients, their increased frequency remains controversial (Elong Ngonu A., 2012).

But how and why autoreactive cells activate and escape to the mechanisms of tolerance in patients with MS?

Loss of peripheral tolerance has been considered as a possible mechanism leading to activation and migration of autoreactive cells in the CNS. A major step in the mechanisms of peripheral tolerance came in the 1990s with the discovery of a specific regulatory T cells subset CD4⁺CD25⁺ in mice (Sakaguchi et al., 1995) (Box 1). Since that, these natural regulatory T cells (nTregs) have been extensively studied, especially in MS (Lowther and Hafler, 2012). However, a loss of their function remains controversial in this disease, probably due to the different markers used for their characterization, but also because of the existence of different subsets of nTregs (Lowther and Hafler, 2012; Sakaguchi et al., 2010). Interestingly, other regulatory populations have been identified, one of the most recent and the less explored being the regulatory B cells (Bregs). In fact, even if they are known in animal models of inflammation, cancer and transplantation since the 1970's (Mauri and Bosma, 2012; Neta and Salvin, 1974), these cells have only recently been reported in Human (Blair et al., 2010). In this review, we focus on the role and mechanisms of action of nTregs and Bregs in the animal model of Experimental Acute Encephalomyelitis (EAE), in MS patients and on the resulting therapeutic implications.

Natural regulatory T lymphocytes

One of the major issues in studying nTregs is the absence of specific extracellular marker (Box1). Consequently, the studies performed on the frequency and function of nTregs can be difficult to compare. Many studies were performed to determine the possible implication of nTregs first in EAE, and then in MS patients.

In EAE, the majority of the studies agree to support a prominent role for nTregs in modulating the neuroinflammatory response, especially during the remission and the induction of the disease. However, in MS patients, the homeostasis and function of the different subsets of nTregs in the development and the maintenance of the disease appear to be more complex.

Natural regulatory T lymphocytes and EAE

- Implication of nTregs in the different phases of EAE

A protective role of T lymphocytes in EAE induction was demonstrated in 1994 in a transgenic (Tg) mouse model with a specific anti-MBP TCR crossed with Rag1^{-/-} mice (Lafaille et al., 1994). These mice developed a spontaneous EAE whereas the same Tg mice performed on a Rag1^{+/+} background were protected. The development of EAE in mice MBP/Rag1^{-/-} could be prevented by the early transfer of purified CD4⁺ T cells from normal donors (Olivares-Villagomez et al., 1998). The regulatory role of these CD4⁺ T cells in EAE was confirmed later (Hori et al., 2002).

Then, several studies showed that the adoptive transfer of CD4⁺CD25⁺ T cells from naive mice conferred significant protection or reduced the disease severity in mice with MOG- or PLP-induced EAE (Kohm et al., 2002; Zhang et al., 2004). This clinical improvement was associated with a decreased infiltration of T lymphocytes in the CNS (Kohm et al., 2002; Zhang et al., 2004). In the same way, Matsumoto *et al* demonstrated in a chronic model of EAE that the adoptive transfer of CD4⁺CD25⁺ T cells suppressed the development of chronic EAE in rats (Matsumoto et al., 2007). These findings demonstrated that CD4⁺CD25⁺ Tregs play an essential role in regulating the induction phase of acute and chronic EAE.

Another approach used to demonstrate the importance of these regulatory T cells in the development and remission of EAE was the specific cell depletion using anti-CD25 antibodies. This treatment, before immunization, increases the severity of the disease in mice (McGeachy et al., 2005; Stephens et al., 2005), decreases the antigen threshold necessary to

trigger the disease (Stephens et al., 2005) and delays the remission (Gartner et al., 2006; Zhang et al., 2006).

Several studies suggested also a role of nTregs in the remission phase of EAE. Mc Geachy *et al* reported on an accumulation of CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T cells inside the CNS of MOG/EAE mice during the disease. This emergence of nTregs in the CNS was concomitant to the apparition of the remission phase (McGeachy et al., 2005). These results were confirmed later in a study describing a nTregs expansion within the CNS during the resolution phase in a passive transfer model of EAE (O'Connor et al., 2007b). A peripheral increase of nTregs was also described during the recovery phase of PLP/EAE mice (Zhang et al., 2006). Moreover, depletion of CD4⁺CD25⁺ T cells during the recovery phase exacerbated the disease. On the contrary, Gartner *et al* showed that the first remission occurred even after depletion of CD4⁺CD25⁺ Tregs cells, whereas secondary remissions after relapses did not (Gartner et al., 2006), suggesting that nTregs play a role in long term disease progression. More recently, Matsushita *et al* demonstrated a predominant role of nTregs during the late phase of the disease and the recovery of EAE (Matsushita et al., 2010). Indeed, the specific depletion of Tregs before EAE onset in MOG/EAE mice, delayed the development of the disease but without altering its severity. On the contrary, the depletion of these cells after EAE onset worsened the disease significantly.

Altogether, these reports show that CD4⁺CD25⁺ Tregs play a role in EAE, but it remains unclear if their predominant role is rather at the induction phase of the disease, during recovery or both.

- *Antigen specificity for nTregs during EAE*

In 2005, two different studies demonstrated the specificity of nTregs in EAE. Adoptive transfer of anti-PLP nTregs into naive mice protected them from developing PLP-induced EAE, but not from MOG- or MBP-induced EAE (Yu et al., 2005). On the contrary if these specific Tregs were first activated by PLP, they inhibit MOG- or MBP- induced EAE. In the same way, Mc Geachy *et al* showed that adoptive transfer of low quantities of CNS Tregs (isolated from mice in recovery) could dramatically decrease the symptoms of MOG-induced EAE whereas the same quantity of peripheral nTregs had no effect (McGeachy et al., 2005). These reports show that nTregs need to be activated first by their antigen to fulfill their suppressive effects.

- *Mechanisms of action of nTregs during EAE*

Several studies demonstrated that, after a polyclonal (Beyersdorf et al., 2005; McGeachy et al., 2005) or Ag-specific activation (MBP, MOG) (Hori et al., 2002; Kohm et al., 2002; Korn et al., 2007), CD4⁺CD25⁺ Tregs from EAE mice could inhibit, *in vitro*, the proliferation and the Th1 cytokine secretion of CD4⁺CD25⁻ T cells. *In vivo*, it has been shown that CD4⁺CD25⁺ T cells inhibited the accumulation of CD4⁺ T cells inside the CNS (Kohm et al., 2002) and the proliferation of CD4⁺ Th1 and Th2 anti-PLP cells (Zhang et al., 2006). These results were confirmed by the specific depletion of CD4⁺CD25⁺ T cells *in vivo* that causes a strong Th1 response (Gartner et al., 2006).

IL-10 can, partly, mediate these mechanisms of actions. In fact, CD4⁺CD25⁺ T cells from naive mice secreted IL-10 under anti-CD3 stimulation and their suppressive effects were reversed by anti-IL-10R (Zhang et al., 2004). Moreover, IL-10 deficient mice presented an accelerated EAE following immunization with MOG, without spontaneous recovery (Samoilova et al., 1998). Other studies showed that the increase of IL-10 production by nTregs was correlated with the recovery phase, and that adoptive transfer of nTregs prevented the development of the disease in an IL-10 dependent way (McGeachy et al., 2005; Zhang et al., 2004). TGFβ has also been implicated in EAE regulation. Its neutralization *in vivo* prevents the remission and increases the severity of PLP-induced EAE (Zhang et al., 2006).

- *nTregs and CNS*

In animals, specific nTregs are able to migrate and accumulate inside the CNS during the disease (Lowther and Hafler, 2012; Zozulya and Wiendl, 2008). This accumulation of nTregs inside the parenchyma seems to be due to their *in situ* proliferation, but not to the conversion of naive Foxp3⁻ T cells into regulatory Foxp3⁺ T cells (Korn et al., 2007; O'Connor et al., 2007b). This gathering of nTregs is correlated with the remission of EAE (Korn et al., 2007; McGeachy et al., 2005; O'Connor et al., 2007b). However, during the peak of the disease, Foxp3⁺ T cells isolated from the CNS failed to control CNS-derived encephalitogenic T cells. The pathogenic effector T cells are indeed resistant to their suppression partly due to their ability to produce IL-6 and TNFα (Korn et al., 2007; O'Connor et al., 2007b). Furthermore, in the CNS of EAE mice, TGFβ (produced by nTregs) combined to IL-6 can induce the differentiation of Th17 cells that are more resistant to the suppressive effects of nTregs (Stummvoll et al., 2008).

These data suggest that, even in an absence of functional defect of regulatory T cells in EAE, the inflammatory environment inside the CNS may counteract their suppressive activities,

suggesting that restoring immune homeostasis inside the CNS by expanding the regulatory populations remains a controversial challenge in the treatment of MS.

Regulatory T lymphocytes and MS (Table 1)

There has been a growing interest for the study of nTregs in MS in the 2000's, following the characterization of nTregs but also because of the extensive literature concerning these cells in EAE. These different works have focused on the frequencies and suppressive properties of peripheral nTregs in MS patients. However, the different markers used to discriminate these cells, the description of new subsets of nTregs and the different protocols of stimulation used, make difficult to conclude formally about the involvement of these cells in MS patients.

- Genomic studies

MS is a complex disease. Identification of risk alleles was made possible in recent years by the complete sequencing of human genome and the establishment of the "HapMap" (Frazer 2007). Multiple Genome-Wide Association Studies (GWAS) have identified numerous risk loci (ANZgene, 2009; Baranzini et al., 2009; De Jager et al., 2009; Hafler et al., 2007; Sawcer et al., 2011). Among them, CD25 (IL-2R α), CD127 (IL-7R α) and CD58 (LFA3), are essential in T and B cell activation and homeostasis. And two of these molecules (CD25 and CD127) have also been identified as markers of Tregs, underlying their possible role in the physiopathology of the disease.

Two studies have demonstrated the importance of the gene coding for IL-7R α as a marker of susceptibility in MS (Hafler et al., 2007; Lundmark et al., 2007b). A functional polymorphism located at the sixth exon increases the risk of the disease with an odds ratio of 1.2. Moreover, another study found that the presence of certain IL-7R α polymorphisms influences the frequency of blood circulating Recent Thymic Emigrants (RTE)-Tregs in MS patients (Broux et al., 2010).

Another study specifically looked at the CD58 locus in MS (De Jager et al., 2009). A protective effect was conferred to an allelic variant of CD58, which increases its expression in PBMC. This increases of CD58 results in an up-regulation of the Foxp3 expression (De Jager et al., 2009). Interestingly, CD58 mRNA is increased in MS patients during phases of remission (De Jager et al., 2009).

- Homeostasis of nTregs in MS

Overall, all studies agree to find a similar frequency of CD4⁺CD25^{hi} T cells in the periphery of MS patients and controls with rates varying from 1.2 to 2.3% of CD4⁺ T cells (Feger et al., 2007; Haas et al., 2005; Putheti et al., 2004; Viglietta et al., 2004). And, using CD127, we also reported a normal frequency of CD4⁺CD25^{hi}CD127^{lo} T cells in RR-MS patients (Michel et al., 2008).

However, even if the number of total nTregs seems to be conserved, a defective generation of nTregs in the thymus of MS patients has subsequently been reported by several groups. The authors reported that the reduced *de novo* generation of CD31⁺ CD45RA⁺ recent thymic emigrant-Treg is compensated by higher proportions of memory Tregs, resulting in a stable count of the total population (Haas et al., 2007). Venken *et al* have later confirmed this thymic generation defect of Treg in MS patients with a short disease duration (< 10 yrs), but not in “chronic” MS patients (Venken et al., 2008a; Venken et al., 2010).

Several studies have looked at regulatory T cells in the CSF of MS patients (Feger et al., 2007; Haas et al., 2005; Venken et al., 2008b). Haas reported on an identical distribution of nTregs in the blood and CSF from patients with MS, while Feger and Venken reported on a higher frequency of CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T cells in the CSF compared to peripheral blood of RR-MS patients. In parallel one study described the expression of adhesion molecules involved in the recruitment and migration of T cells to inflammatory sites on CSF T cells. They observed an increased expression of CD103 and VLA-4 on Tregs from CSF of patients compared to healthy volunteers (Venken et al., 2008b). Taken together, these data suggest that regulatory T cells are either recruited to the site of inflammation, or directly induced *de novo* in the CNS.

But, to date, we know that in the brain parenchyma, contrary to the CSF, there is a low infiltration of nTregs in 70% of patients, and no Foxp3⁺ T cells in 30% of patients (Fritzsching et al., 2011; Tzartos et al., 2008). In parallel, the number of nTregs in the CSF was significantly increased in these patients compared to peripheral blood. One of the assumptions made by the authors is that nTregs of MS patients are activated in the periphery, migrate within the brain parenchyma, where they undergo several stimulations rendering them susceptible to apoptosis. This is sustained by the fact that nTregs in the CSF of patients have an increased expression of CD95 (Fritzsching et al., 2011). The constant elimination of nTregs in the brain parenchyma could explain the low frequency of these cells found in this study.

- *Suppressive properties of nTregs in MS*

Although blood levels of CD4⁺CD25⁺T cells are normal, several authors have shown an altered suppressive function of this regulatory subpopulation under polyclonal stimulation or myelin-proteins-specific stimulation in RR-MS patients (Kumar et al., 2006). On the contrary, in SP-MS patients, these cells present a normal suppressive function and, it was possible to establish a correlation between the suppressive function and the disease duration (Venken et al., 2006).

However, all the authors describing a suppressive defect of CD4⁺CD25^{hi} Treg used the CD25 marker, which is now known to be poorly discriminative of the Treg population and not reproducible. In 2006, Seddiki *et al* showed that the low expression of the marker CD127 (IL-7-R α) combined with the strong expression of CD25 allowed better discrimination between Tregs and activated cells (Seddiki et al., 2006).

In our study, we also demonstrated an alteration of the suppressive function of CD4⁺CD25^{high} T cells but this alteration, due to a contamination by activated T cells was not found anymore when the marker CD127 was used (Michel et al., 2008). This marker allowed us to differentiate CD4⁺CD25^{high}CD127^{low} Tregs from CD4⁺CD25^{high}CD127⁺ activated T cells. The same year, Venken *et al* reported a suppressive defect of naive (CD4⁺CD25^{high}CD127^{low}CD45RA⁺) and memory Tregs (CD4⁺CD25^{high}CD127^{low}CD45RO⁺) in « early » MS patients (disease duration < 10 yrs) whereas « chronic » patients (disease duration > 10 yrs) presented a normal suppressive function of memory Tregs (Venken et al., 2008a). The defect observed in the first group of patients was explained by a decreased thymic generation of nTregs (Venken et al., 2008a). However, this clear cut-off after a 10-year progression of the disease does not rely on any clinical or epidemiologic difference of the disease.

Recently, Baecher-Allan *et al* reported also that the mode of stimulation of Tregs may modify their suppressive properties (Baecher-Allan et al., 2011). They reported that, in MS patients, both CD127^{low}HLA-DR⁺ and CD127^{low}HLA-DR⁻ populations had a normal suppressive function after classical CD3 stimulation, confirming our previous results. On the other hand, they demonstrated an altered suppressive function of these Tregs following the CD2 stimulation (Baecher-Allan et al., 2011). The same year, this team described a CD4⁺CD25^{high}CD127^{low}Foxp3⁺ (Th1 like) T cell population able to secrete IFN γ *ex vivo* in the presence of IL-12, with reduced suppressive activity *in vitro* (Dominguez-Villar et al., 2011). In this study, patients with relapsing-remitting MS showed a higher frequency of these

Foxp3⁺-Th1-like cells. As a result, in a context of inflammation, the generation of Th1-like Tregs may, at least in part, contribute to an impaired regulation by nTreg.

Taken together, these different works do not allow to delineate a specific involvement of Tregs cells in MS but rather, show the complexity of these subsets of cells and their behavior in a chronic inflammatory context. In the future other studies are needed to know the contribution of each of these subsets of Tregs cells to the physiopathology of the disease.

Regulatory B lymphocytes

Even if MS has always been considered as a T-cell mediated disease, several reports, these last years, support a prominent role for B cells in MS physiopathology. More than 90% of MS patients present an intrathecal synthesis of immunoglobulins in their CSF (Archelos et al., 2000; Freedman et al., 2005) and Magliozzi *et al* identified the additional presence of B cell follicles in the brain meninges of 40% of SP-MS patients (Magliozzi et al., 2007). Last, several years ago, two clinical trials demonstrated that peripheral B cell depletion using anti-CD20 monoclonal antibodies resulted in a significant improvement in the inflammatory criteria of RR-MS patients (Hauser 2008, Kappos 2011).

It has emerged recently that specific subsets of B cells may negatively regulate disease symptoms in mouse models of inflammation, especially in EAE (Mauri and Bosma, 2012). These cells secrete IL-10 and are contained within precursors of Marginal Zone (MZ) B cells (Evans et al., 2007), and CD5⁺CD1d^{hi} B cells (Yanaba et al., 2008) (Box2). Multiple suppressive mechanisms have been described and are summarized in Figure 1. Regulatory B cells have more recently been identified in human, and have been suggested defective in the lupus, another autoimmune disease (Blair et al., 2010). Concerning MS, several studies have investigated the IL-10 secretion ability of B cells; but none has explored, to our knowledge, the function of these cells.

Regulatory B lymphocytes and EAE

A dual role of B cells in EAE is now best known:

- A pathogenic role, where B cells are directly involved in demyelination by the production of autoantibodies and the antigen presentation to CD4⁺ T cells (Franciotta et al., 2008).
- A protective role essentially in disease remission (Mauri and Bosma, 2012).

This second function was demonstrated in EAE in 1996: μ MT mice deficient in B cells exhibited more severe EAE in the late phase of the disease and did not recover in contrast to wild type mice (Wolf et al., 1996). Adoptive transfer of B cells from WT mice rescued this defect, suggesting the existence of regulatory B cell populations (Fillatreau et al., 2002). Interestingly, the transfer of IL-10^{-/-} B cells failed to rescue this defect, indicating that the effect of this regulatory population was mediated by IL-10 (Fillatreau et al., 2002). Moreover, the remission of EAE in mice depended on the presence of Ag-specific B cells, CD40 agonist stimulation and on the activation by TLR molecules (mainly TLR2/4) (Fillatreau et al., 2002; Lampropoulou et al., 2008). In the absence of IL-10⁺ B cells, a pro-inflammatory Th1

response persisted and mice did not enter into remission. Thus, IL-10⁺ B cells appear to regulate the late phase of EAE in this model (Fillatreau et al., 2002).

A protective role of B cells in EAE has subsequently been confirmed by Matsushita *et al* in a CD19^{-/-} mouse model immunized with MOG. These mice exhibited more severe clinical disease than wild type mice, associated with a Th1 polarization in the CNS. These results suggested a critical role of CD19 as a suppressive molecule in the development of EAE (Matsushita et al., 2006).

Interestingly, depletion of B cells with anti-CD20 monoclonal antibody had opposite effects on the progression of the disease in naive mice immunized with MOG. Indeed, early depletion (D-7) led to the development of a more severe disease concomitant to an expansion of infiltrating pathogenic T cells (Matsushita et al., 2010) and a delayed emergence of Foxp3⁺ Tregs (Mann et al., 2007). Adoptive transfer of CD5⁺CD1d^{hi} B cells rescued the course of EAE.

These results suggest a regulatory role of IL-10⁺ B cells for disease induction (Matsushita et al., 2008; Matsushita et al., 2010). In contrast, B-cell depletion during the course of EAE results in a significant reduction of the disease symptoms and of the T cells infiltrate within the CNS. During the evolution of EAE, B cells would rather act as Antigen Presenting Cells for CD4⁺ T cells or by providing an appropriate proinflammatory cytokines microenvironment.

In conclusion, during the course of EAE, there seems to be a balance between two dual regulatory and inflammatory functions of B cells. This frail balance illustrates the complexity that underlies this disease and must be considered for the development of new therapeutic strategies.

Regulatory B lymphocytes and MS

While the literature is flourishing regarding the role of Bregs in EAE, only few studies have investigated the frequency of regulatory IL-10⁺ B cells in MS patients and the results remain controversial. Indeed, several studies described a significant decrease in the production of IL-10 by B cells of MS patients (Correale et al., 2008; Duddy et al., 2007; Knippenberg et al., 2011), while other demonstrated an increased secretion of IL-10 by B cells after 48h of stimulation (Iwata et al., 2011).

Thus, in 2007, Duddy *et al* were interested in the production of IL-10 by B cells in untreated MS patients. B cells were stimulated by CD40 pathway and the secretion analyzed by ELISA 48 hours after (Duddy et al., 2007). The authors report on a significant decrease in the frequency of IL-10 producing B cells in patients compared to healthy volunteers. Interestingly, this decreased frequency is rescued in patients infected with helminth, an intestinal parasite (Correale et al., 2008). Using a stimulation with ODN (activation of the TLR-9 pathway), Knippenberg reported equivalent results in patients treated with immunomodulators with very low frequencies of IL-10⁺ B cells (about 1.4% in MS patients) and a significant decrease of memory CD27⁺ B cells in MS patients compared to healthy volunteers. As the authors stated, the decrease of memory B cells, in their study, was probably due to the treatment by Interferon (Niino et al., 2009). Interestingly, Tedder's team showed that IL-10 secretion was mainly produced by memory B cells that could explain this decreased IL-10 secretion in Knippenberg's study (Iwata et al., 2011).

In 2011, Iwata *et al* sought to characterize IL-10 secreting B cells phenotypically and to determine the better stimulation protocol for the optimal IL-10 secretion by B cells in humans (Iwata et al., 2011). Eight MS patients were included in their study, they were all (except one) treated by immunomodulatory or immunosuppressive drugs. The frequency of B10 cells in these patients was comparable to healthy controls (about 0.7%), whereas the frequency of B10pro cells was significantly higher (about 7%). These data show that the stimulation protocol used to induce Bregs is probably of major importance to recruit the majority of Bregs. This stimulation protocol has, in the future, to be standardized to better compare the studies.

Thus, to date, little is known about the functional properties but also the phenotype of these IL-10 secreting B cells either in healthy controls or in patients with MS. A better understanding of the involvement of Bregs in MS and the knowledge of their possible modulation would represent a therapeutic innovation in the treatment of autoimmune diseases.

Therapeutic applications

Regulatory T cells and MS

Several studies demonstrated an increased frequency and function of nTregs in patients with MS treated with immunomodulatory drugs (de Andres et al., 2007; Haas et al., 2009; Hong et al., 2005; Korporal et al., 2008; Venken et al., 2008a; Venken et al., 2008b). Currently, new therapies are being developed that aim to expand more specifically natural regulatory T cells, with more or less promising results on the clinical state of the patients. The group of Vanderbark reported that, in 23 treatment-naïve patients, a trivalent TCR vaccine induces an increased expression of Foxp3 and frequency of IL-10⁺ T cells, but without a significant clinical improvement of patients (Vandenbark et al., 2008).

IL-2 was also used to boost immune responses in patients with serious infections (Giedlin and Zimmerman, 1993) or cancers (Ahmadzadeh and Rosenberg, 2006; Lemoine et al., 2009). In fact, in patients with renal cancer or melanoma two different teams observed a massive increase of nTregs following IL-2 treatment (Ahmadzadeh and Rosenberg, 2006; Lemoine et al., 2009). Recently, Saadoun *et al* reported that among 10 patients with vasculitis induced by hepatitis C, eight showed significant clinical improvement after administration of low doses of IL-2 (Saadoun et al., 2011) and this is concomitant of an increased frequency of suppressive nTregs in treated patients (from 3.6% to 11.8% of CD4⁺CD25^{hi}Foxp3⁺ T cells inside the CD4⁺ T cells). This new therapeutic strategy could be promising in the treatment of autoimmune diseases.

In the future, adoptive Treg cell therapy could be an attractive alternative to harness the immune suppressive activity of Tregs (Riley et al., 2009). In this approach, Tregs would be isolated from a patient, expanded *ex vivo* and reinfused. But, to date, although promising, this therapy is yet in development.

Regulatory B cells and MS

No therapy is currently being developed to expand specifically Breg cells. However, several years ago, two clinical trials demonstrated that peripheral B-cell depletion using anti-CD20 monoclonal antibody resulted in a significant improvement in the inflammatory criteria of RR-MS patients (Hauser et al., 2008; Kappos et al., 2011). Interestingly, the improvement of clinical and radiological symptoms has been associated with the homeostatic recovery of B cells after depletion, favoring a repopulation with B cells with regulatory properties (Duddy et

al., 2007). In the same way, in patients suffering from rheumatoid arthritis, an expansion of transitional B cells was observed after 6 months of treatment (Leandro et al., 2006).

Moreover, in mice, BAFF (a member of TNF family cytokines), that is a key regulator for B cell maturation and function, induced an increase number of CD5⁺CD1d^{high} IL-10-secreting B cells. This effect was abrogated by neutralization of BAFF with Atacicept (a recombinant protein blocking BAFF and APRIL binding on TACI). Interestingly, in human, BAFF is largely increased after B cell depletion suggesting that part of the anti CD20 efficiency would be due to an increase of BAFF, favoring repopulation of regulatory B cells (Heidt et al., 2012; Kreuzaler et al., 2012; Lavie et al., 2007).

But, in human, the effects of these survival cytokines and their reciprocal inhibition of regulatory B cell expansion remain undetermined. In MS, a phase II study of Atacicept had to be terminated because of disease worsening (www.clinical-trials.gov), but whether this negative effect was due to a specific effect on IL-10-secreting-regulatory B cells has not been determined. So, expansion of Bregs using survival cytokines could represent an interesting target to treat autoimmune diseases.

Conclusion

To date, the involvement of regulatory T and B populations remains unclear in the pathophysiology of MS. Indeed, several arguments, especially in animal models, suggest that nTregs may have a role in the induction and remission of the disease. An interesting two-step model of disease for MS has been developed by D. Hafler in a recent review (Lowther and Hafler, 2012). This hypothesis implicates Th17 autoreactive T cells as major actors in the initiation of the disease. These T cells have been found to infiltrate the brain lesions of MS patients (Tzartos et al., 2008). So, in a context of defective regulation, peripherally activated autoreactive Th17 cells could migrate across the blood-CSF brain barrier. They can also enter the CNS via the choroid plexus through a CCR6-CCL20-dependent axis, as demonstrated in a EAE model (Reboldi et al., 2009). Once they have invaded the CNS, they can increase the BBB permeability by cytokine release and recruit others immune cells (Kebir et al., 2007). This autoimmune cascade could be amplified in case of regulatory B cells defect. In fact, in two animal models (EAE and arthritis), the depletion of B IL-10⁺ cells increases the infiltration of Th17 cells (Carter et al., 2011; Matsushita et al., 2008).

However, how to explain that blocking IL-17 pathway by using anti-p40 antibody has no beneficial effect in MS patients (Segal et al., 2008)? Moreover, at the beginning of the disease, how to explain that autoreactive Th17 cells escaping peripheral tolerance are attracted to the still non inflamed CNS? Future studies are needed to explore more precisely the initiation of the autoimmune cascade in MS. The limited knowledge of Bregs in humans and the paucity of the studies performed in MS, as well as the controversial data on Treg do not allow today to conclude about their role in MS development.

Box 1: Discovery and markers of nTregs in Human

In 1980's, several teams reported on the induction of autoimmune diseases after T cells depletion in rodents (McKeever et al., 1990; Sakaguchi et al., 1985; Sugihara et al., 1988). These first studies, in animal, demonstrated that autoreactive T cells are controlled in periphery by others regulatory T cells populations. A second step in the characterization of these cells was overcome with the discovery of CD25 (IL-2R α) as a marker of regulatory T cells in mice (Sakaguchi et al., 1995). These CD4⁺CD25⁺ T cells are anergic *in vitro* and can suppress the proliferation of CD4⁺CD25⁻ and CD8⁺ T cells in a contact dependent way (Thornton and Shevach, 1998). In 2001, this regulatory population was first identified in human (Baecher-Allan et al., 2001; Dieckmann et al., 2001; Jonuleit et al., 2001; Levings et al., 2001; Stephens et al., 2001). A major advance in the study of Tregs was made by the description the same year of a specific transcription factor of Tregs: Foxp3 (Forkhead-winged-helix family transcription factor P3) (Bennett et al., 2001; Brunkow et al., 2001; Fontenot et al., 2003; Khattri et al., 2003). In human, mutations of Foxp3 result in a severe autoimmune disorder name IPEX (Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X linked). This factor plays a major role in the development and function of nTregs CD4⁺CD25^{hi} (Fontenot et al., 2003; Fontenot et al., 2005; Khattri et al., 2003). However, things are more complex. We currently know that Foxp3 is expressed by induced Tregs (Apostolou and von Boehmer, 2004; Chen et al., 2003; Kretschmer et al., 2005) but is also transiently induced in effector T cells (Allan et al., 2007; Gavin et al., 2006; Wang et al., 2007). Moreover, Foxp3 is intracellular and its identification requires a permeabilization of T cells. So, one of the major issues in the characterization of nTregs is the absence of specific extra cellular marker. In fact, CD4⁺CD25⁺ T cells contain activated T cells, and Tregs are also included in the CD4⁺CD25^{int} fraction (Roncador et al., 2005). In 2006, two different teams described that the absence of the CD127 marker was characteristic of nTregs (Liu et al., 2006; Seddiki et al., 2006). Finally, Helios, a transcription factor, was described as specific of nTregs of thymic origin (Getnet et al., 2010; Thornton et al., 2010). But, currently, these results remain controversial (Zabransky et al., 2012). So, to date, no real specific marker exists to discriminate nTregs from activated or induced Tregs. Intensive research in this area is necessary to explore more precisely the Treg physiology.

Box 2: Discovery and markers of regulatory B cells in animals and Human

If a suppressive role for B cells was already suspected in the mid-70's in a model of delayed hypersensitivity in guinea pigs (Katz et al., 1974; Neta and Salvin, 1974), it is only in 1996 that Wolf *et al* point on the existence of regulatory B cells (Wolf et al., 1996). Unlike wild type mice, B-cell deficient mice (uMT) were unable to recover from EAE and this was later attributed to the presence of B cells producing IL-10 (Fillatreau et al., 2002). Since this first report, the major role of these cells has been reported in numerous models of autoimmune diseases. As it was the case for Treg in the 1980's, there are no yet validated phenotypic markers of regulatory B cells and it remains very likely that different regulatory B cell subsets exist.

Two main B cell populations have been reported in mice. The precursor B cells of the marginal zone (T2-MZP B cells) have been described by Evans *et al* in 2007 in a collagen-induced arthritis (CIA) mouse model (Evans et al., 2007). These cells produce IL-10 and their adoptive transfer from naïve mice to immunized mice suppresses CIA development in an IL-10 dependent manner. Tedder and colleagues identified another subset of regulatory B cells in mice based on IL-10 expression, called B10 cells. This rare B cell subset (1-2%) is found predominantly in the spleen CD1d^{high}CD5⁺ B cell subset of naïve wild type mice and is defined by its unique capacity to produce IL-10 in response to specific activation signals (Yanaba et al., 2008). Even if there are significant phenotypic differences between these two subsets of B cells, it is currently not excluded that they could share a common progenitor.

In humans, these regulatory B cells have recently been identified and described. However, their study is still in its infancy and their phenotype needs to be better described. Blair *et al*, demonstrated in 2010 that human transitional CD19⁺CD38^{hi}CD24^{hi} B cells possessed regulatory capacities (Blair et al., 2010), a phenotype that was confirmed a year after (Lemoine et al., 2011). In 2011, Tedder et al. characterized the IL-10 competent B cells in humans. They described a B10 subset defined by its capacity to secrete IL-10 after 5 hours of ex vivo stimulation, whereas progenitor B10 (B10pro) cells required 48 hours of in vitro stimulation before they acquired the ability to secrete IL-10 (Iwata et al., 2011). Both subsets were predominantly found within the memory CD24^{hi}CD27⁺ B cell subpopulation.

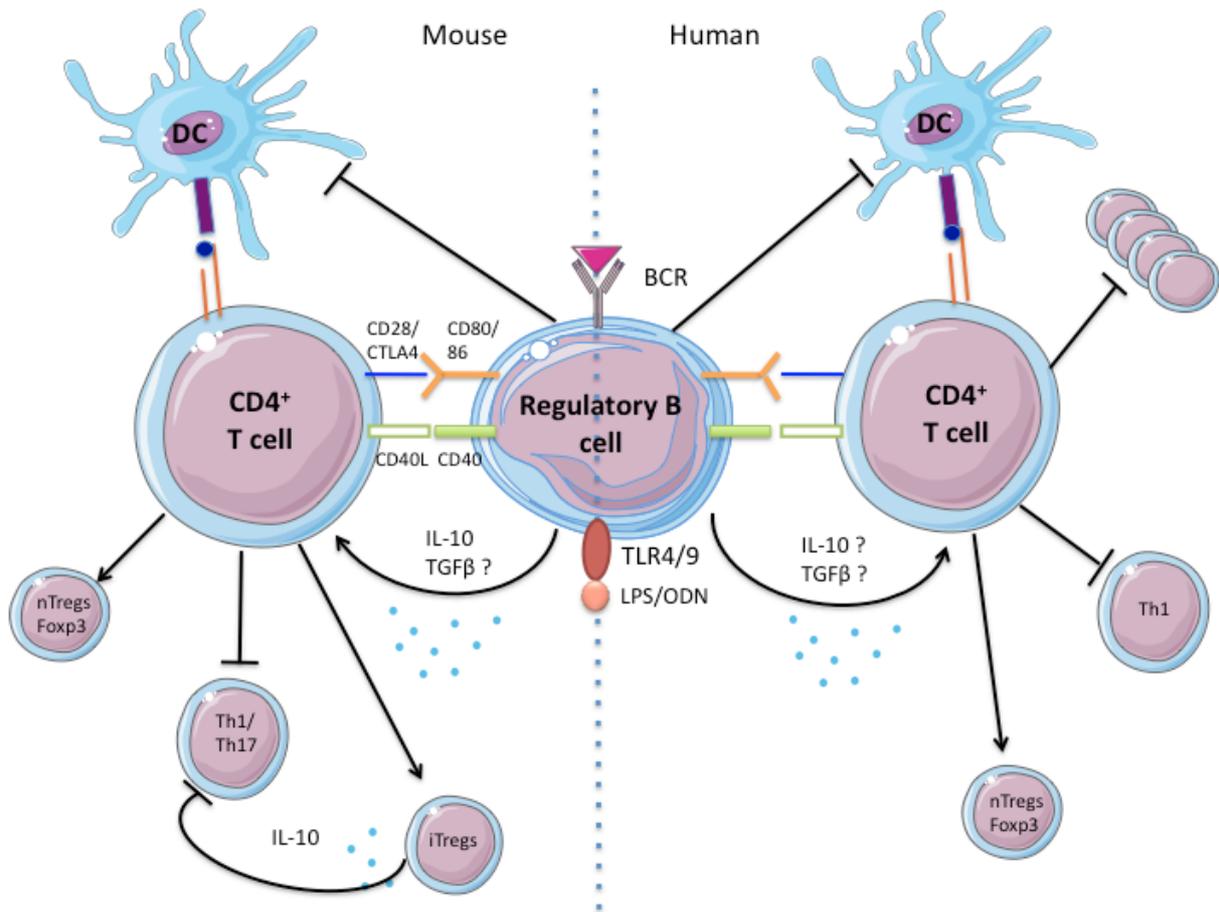
Table 1: Summary of the main studies reporting on the frequency and function of natural regulatory T cells in MS. (Abbreviations: nTregs=naïve Tregs, mTregs=memory Tregs, DD= Disease Duration, RTE=Recent Thymic Emigrants, RR-MS= Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis, SP-MS= Secondary Progressive Multiple Sclerosis, OND= Others Neurological Diseases, HV= Healthy Volunteers)

First author/year	Patients	Markers used for nTregs	Results
Viglietta, 2004	- 15 untreated RR-MS - 21 HV	CD4 ⁺ CD25 ^{hi}	- Normal frequency in blood - Defective regulation
Putheti, 2004	- Untreated RR-MS - Treated RR-MS by IFN or GA - HV	CD4 ⁺ CD25 ^{hi}	- Normal frequency in blood
Haas, 2005	- 73 untreated RR-MS - 73 HV	CD4 ⁺ CD25 ^{hi}	- Normal frequency in blood and CSF - Defective regulation (MOG or polyclonal stimulation)
Venken, 2006	- Untreated RR-MS - Untreated SP-MS	CD4 ⁺ CD25 ⁺	- Normal frequency but decreased Foxp3 expression in RR-MS patients - Defective regulation in RR-MS but not in SP-MS patients - Function correlated with Disease Duration (DD)
Feger, 2007	- 36 MS - 9 OND - 40 HV	CD4 ⁺ CD25 ^{hi}	- Normal frequency in blood (n=36), defective regulation (n=3) - Increased frequency of Tregs Foxp3 ⁺ in CSF vs blood (n=14)
Haas, 2007	- 40 untreated RR-MS - 49 HV	RTE-Tregs (CD4 ⁺ CD25 ⁺ CD45RA ⁺ CD31 ⁺) mTregs (CD4 ⁺ CD25 ⁺ CD45RO ⁺)	- Decreased frequency of RTE-Tregs - Increased frequency of mTregs
Venken, 2008	- 70 RR-MS and SP-MS patients - 40 HV/ 18 OND	CD4 ⁺ CD25 ^{hi}	- Decreased frequency of Tregs Foxp3 ⁺ in RR-MS - Decreased expression of Foxp3 in RR-MS - Increased frequency of Tregs in CSF vs blood (n=11)
Michel, 2008	- 34 Untreated RR-MS patients - 25 HV	CD4 ⁺ CD25 ^{hi} CD127 ^{lo}	- Normal frequency in blood - Normal regulatory function
Venken, 2008	- 40 Untreated RR-MS and SP-MS - 30 HV	CD4 ⁺ CD25 ^{hi} CD127 ^{lo} CD45RA ⁺ : nTregs CD4 ⁺ CD25 ^{hi} CD127 ^{lo} CD45RO ⁺ : mTregs	- Defective regulation of nTregs in MS patients - Defective regulation of mTregs in "early" (DD < 10yrs) MS but not "chronic" MS patients (DD > 10 yrs) - Increased mTregs in "chronic" MS patients vs "early"MS
Baecher-allan, 2011	-20 untreated RR-MS - HV	mTregs CD127 ^{lo} HLA-DR ⁺ mTregs CD127 ^{lo} HLA-DR ⁻	- Normal regulation under anti CD3 stimulation - Defective regulation under anti CD2 stimulation
Fritsching, 2011	- 16 MS patients (brain biopsies) - 17 untreated RR-MS (blood/CSF)	CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺	- Low numbers of Tregs Foxp3 ⁺ in brain lesions - Increased Tregs in the CSF vs blood
Dominguez-villar, 2011	- Untreated RR-MS - HV	Tregs Foxp3 ⁺ IFN γ ⁺ (Th1 like)	- Increased frequency of Th1-like Tregs

Legends:

Figure 1: Suppressive mechanisms of regulatory B cells identified in animal and human. In mice (left), regulatory B cells exert their suppressive mechanisms by IL-10 secretion, through the CD40 pathway and probably through contact with effector T cells (Mauri and Bosma, 2012). Their effects are multiple: (1) Inhibition of Th1 and Th17 differentiation (Carter et al., 2011; Evans et al., 2007; Matsushita et al., 2010; Mauri et al., 2003), (2) Inhibition of antigen presentation by DCs (Byrne and Halliday, 2005; Matsushita et al., 2010; Moulin et al., 2000), and (3) Induction of natural regulatory T cells (Carter et al., 2011; Evans et al., 2007; Mann et al., 2007; Scapini et al., 2011; Sun et al., 2008; Watanabe et al., 2010). In human, the mechanisms of action of these cells are less clear and are still to be confirmed: (1) Inhibition of proliferation of CD4⁺ T cells (Lemoine et al., 2011), (2) inhibition of Th1 differentiation (Blair et al., 2010; Lemoine et al., 2011), (3) expansion of nTregs (Kessel et al., 2012; Lemoine et al., 2011; Tu et al., 2008; Zheng et al., 2010) and (4) inhibition of maturation and activation of CD4⁺ T cells by DCs (Morva et al., 2012).

Figure 1:



References:

- Ahmadzadeh, M., Rosenberg, S.A., 2006. IL-2 administration increases CD4⁺ CD25(hi) Foxp3⁺ regulatory T cells in cancer patients. *Blood*. 107, 2409-14.
- Allan, S.E., Crome, S.Q., Crellin, N.K., Passerini, L., Steiner, T.S., Bacchetta, R., Roncarolo, M.G., Levings, M.K., 2007. Activation-induced FOXP3 in human T effector cells does not suppress proliferation or cytokine production. *Int Immunol*. 19, 345-54.
- ANZgene, 2009. Genome-wide association study identifies new multiple sclerosis susceptibility loci on chromosomes 12 and 20. *Nat Genet*. 41, 824-8.
- Apostolou, I., von Boehmer, H., 2004. In vivo instruction of suppressor commitment in naive T cells. *J Exp Med*. 199, 1401-8.
- Archelos, J.J., Storch, M.K., Hartung, H.P., 2000. The role of B cells and autoantibodies in multiple sclerosis. *Ann Neurol*. 47, 694-706.
- Baecher-Allan, C., Brown, J.A., Freeman, G.J., Hafler, D.A., 2001. CD4⁺CD25^{high} regulatory cells in human peripheral blood. *J Immunol*. 167, 1245-53.
- Baecher-Allan, C.M., Costantino, C.M., Cvetanovich, G.L., Ashley, C.W., Beriou, G., Dominguez-Villar, M., Hafler, D.A., 2011. CD2 costimulation reveals defective activity by human CD4⁺CD25(hi) regulatory cells in patients with multiple sclerosis. *J Immunol*. 186, 3317-26.
- Bahbouhi, B., Pettre, S., Berthelot, L., Garcia, A., Elong Ngono, A., Degauque, N., Michel, L., Wiertlewski, S., Lefrere, F., Meyniel, C., Delcroix, C., Brouard, S., Laplaud, D.A., Soullillou, J.P., 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, 1622-36.
- Baranzini, S.E., Wang, J., Gibson, R.A., Galwey, N., Naegelin, Y., Barkhof, F., Radue, E.W., Lindberg, R.L., Uitdehaag, B.M., Johnson, M.R., Angelakopoulou, A., Hall, L., Richardson, J.C., Prinjha, R.K., Gass, A., Geurts, J.J., Kragt, J., Sombekke, M., Vrenken, H., Qualley, P., Lincoln, R.R., Gomez, R., Caillier, S.J., George, M.F., Mousavi, H., Guerrero, R., Okuda, D.T., Cree, B.A., Green, A.J., Waubant, E., Goodin, D.S., Pelletier, D., Matthews, P.M., Hauser, S.L., Kappos, L., Polman, C.H., Oksenberg, J.R., 2009. Genome-wide association analysis of susceptibility and clinical phenotype in multiple sclerosis. *Hum Mol Genet*. 18, 767-78.
- Bennett, C.L., Christie, J., Ramsdell, F., Brunkow, M.E., Ferguson, P.J., Whitesell, L., Kelly, T.E., Saulsbury, F.T., Chance, P.F., Ochs, H.D., 2001. The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat Genet*. 27, 20-1.
- Berthelot, L., Laplaud, D.A., Pettre, S., Ballet, C., Michel, L., Hillion, S., Braudeau, C., Connan, F., Lefrere, F., Wiertlewski, S., Guillet, J.G., Brouard, S., Choppin, J., Soullillou, J.P., 2008. Blood CD8⁺ T cell responses against myelin determinants in multiple sclerosis and healthy individuals. *Eur J Immunol*. 38, 1889-99.
- Beyersdorf, N., Gaupp, S., Balbach, K., Schmidt, J., Toyka, K.V., Lin, C.H., Hanke, T., Hunig, T., Kerkau, T., Gold, R., 2005. Selective targeting of regulatory T cells with CD28 superagonists allows effective therapy of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med*. 202, 445-55.
- Blair, P.A., Norena, L.Y., Flores-Borja, F., Rawlings, D.J., Isenberg, D.A., Ehrenstein, M.R., Mauri, C., 2010. CD19(+)CD24(hi)CD38(hi) B cells exhibit regulatory capacity in healthy individuals but are functionally impaired in systemic Lupus Erythematosus patients. *Immunity*. 32, 129-40.
- Broux, B., Hellings, N., Venken, K., Rummens, J.L., Hensen, K., Van Wijmeersch, B., Stinissen, P., 2010. Haplotype 4 of the multiple sclerosis-associated interleukin-7 receptor alpha gene influences the frequency of recent thymic emigrants. *Genes Immun*. 11, 326-33.
- Brunkow, M.E., Jeffery, E.W., Hjerrild, K.A., Paepfer, B., Clark, L.B., Yasayko, S.A., Wilkinson, J.E., Galas, D., Ziegler, S.F., Ramsdell, F., 2001. Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfy, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat Genet*. 27, 68-73.

- Byrne, S.N., Halliday, G.M., 2005. B cells activated in lymph nodes in response to ultraviolet irradiation or by interleukin-10 inhibit dendritic cell induction of immunity. *J Invest Dermatol.* 124, 570-8.
- Carter, N.A., Vasconcellos, R., Rosser, E.C., Tulone, C., Munoz-Suano, A., Kamanaka, M., Ehrenstein, M.R., Flavell, R.A., Mauri, C., 2011. Mice lacking endogenous IL-10-producing regulatory B cells develop exacerbated disease and present with an increased frequency of Th1/Th17 but a decrease in regulatory T cells. *J Immunol.* 186, 5569-79.
- Chen, W., Jin, W., Hardegen, N., Lei, K.J., Li, L., Marinos, N., McGrady, G., Wahl, S.M., 2003. Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med.* 198, 1875-86.
- Chou, Y.K., Bourdette, D.N., Offner, H., Whitham, R., Wang, R.Y., Hashim, G.A., Vandenbark, A.A., 1992. Frequency of T cells specific for myelin basic protein and myelin proteolipid protein in blood and cerebrospinal fluid in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 38, 105-13.
- Correale, J., Farez, M., Razzitte, G., 2008. Helminth infections associated with multiple sclerosis induce regulatory B cells. *Ann Neurol.* 64, 187-99.
- de Andres, C., Aristimuno, C., de Las Heras, V., Martinez-Gines, M.L., Bartolome, M., Arroyo, R., Navarro, J., Gimenez-Roldan, S., Fernandez-Cruz, E., Sanchez-Ramon, S., 2007. Interferon beta-1a therapy enhances CD4+ regulatory T-cell function: an ex vivo and in vitro longitudinal study in relapsing-remitting multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 182, 204-11.
- 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., Yelensky, R., Price, A., Leppa, V., Patterson, N., de Bakker, P.I., Tran, D., Aubin, C., Pobywajlo, S., Rossin, E., Hu, X., Ashley, C.W., Choy, E., Rioux, J.D., Pericak-Vance, M.A., Ivinson, A., Booth, D.R., Stewart, G.J., Palotie, A., Peltonen, L., Dubois, B., Haines, J.L., Weiner, H.L., Compston, A., Hauser, S.L., Daly, M.J., Reich, D., Oksenberg, J.R., Hafler, D.A., 2009. The role of the CD58 locus in multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106, 5264-9.
- Dieckmann, D., Plottner, H., Berchtold, S., Berger, T., Schuler, G., 2001. Ex vivo isolation and characterization of CD4(+)/CD25(+) T cells with regulatory properties from human blood. *J Exp Med.* 193, 1303-10.
- Dominguez-Villar, M., Baecher-Allan, C.M., Hafler, D.A., 2011. Identification of T helper type 1-like, Foxp3+ regulatory T cells in human autoimmune disease. *Nat Med.* 17, 673-5.
- Duddy, M., Niino, M., Adatia, F., Hebert, S., Freedman, M., Atkins, H., Kim, H.J., Bar-Or, A., 2007. Distinct effector cytokine profiles of memory and naive human B cell subsets and implication in multiple sclerosis. *J Immunol.* 178, 6092-9.
- Elong Ngono A., P.S., Salou M., Bahbouhi B., Soullillou J-P., Brouard S., Laplaud D-A., 2012. Frequency of circulating autoreactive T cells committed to myelin determinants in relapsing-remitting Multiple Sclerosis patients. *Clin Immunol.*
- Evans, J.G., Chavez-Rueda, K.A., Eddaoudi, A., Meyer-Bahlburg, A., Rawlings, D.J., Ehrenstein, M.R., Mauri, C., 2007. Novel suppressive function of transitional 2 B cells in experimental arthritis. *J Immunol.* 178, 7868-78.
- Feger, U., Luther, C., Poeschel, S., Melms, A., Tolosa, E., Wiendl, H., 2007. Increased frequency of CD4+ CD25+ regulatory T cells in the cerebrospinal fluid but not in the blood of multiple sclerosis patients. *Clin Exp Immunol.* 147, 412-8.
- Fillatreau, S., Sweeney, C.H., McGeachy, M.J., Gray, D., Anderton, S.M., 2002. B cells regulate autoimmunity by provision of IL-10. *Nat Immunol.* 3, 944-50.
- Fontenot, J.D., Gavin, M.A., Rudensky, A.Y., 2003. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol.* 4, 330-6.
- Fontenot, J.D., Dooley, J.L., Farr, A.G., Rudensky, A.Y., 2005. Developmental regulation of Foxp3 expression during ontogeny. *J Exp Med.* 202, 901-6.
- Franciotta, D., Salvetti, M., Lolli, F., Serafini, B., Aloisi, F., 2008. B cells and multiple sclerosis. *Lancet Neurol.* 7, 852-8.
- Freedman, M.S., Thompson, E.J., Deisenhammer, F., Giovannoni, G., Grimsley, G., Keir, G., Ohman, S., Racke, M.K., Sharief, M., Sindic, C.J., Sellebjerg, F., Tourtellotte, W.W., 2005. Recommended standard of cerebrospinal fluid analysis in the diagnosis of multiple sclerosis: a consensus statement. *Arch Neurol.* 62, 865-70.

- Fritzsching, B., Haas, J., Konig, F., Kunz, P., Fritzsching, E., Poschl, J., Krammer, P.H., Bruck, W., Suri-Payer, E., 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.
- Gartner, D., Hoff, H., Gimsa, U., Burmester, G.R., Brunner-Weinzierl, M.C., 2006. CD25 regulatory T cells determine secondary but not primary remission in EAE: impact on long-term disease progression. *J Neuroimmunol*. 172, 73-84.
- Gavin, M.A., Torgerson, T.R., Houston, E., DeRoos, P., Ho, W.Y., Stray-Pedersen, A., Ocheltree, E.L., Greenberg, P.D., Ochs, H.D., Rudensky, A.Y., 2006. Single-cell analysis of normal and FOXP3-mutant human T cells: FOXP3 expression without regulatory T cell development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 103, 6659-64.
- Getnet, D., Grosso, J.F., Goldberg, M.V., Harris, T.J., Yen, H.R., Bruno, T.C., Durham, N.M., Hipkiss, E.L., Pyle, K.J., Wada, S., Pan, F., Pardoll, D.M., Drake, C.G., 2010. A role for the transcription factor Helios in human CD4(+)CD25(+) regulatory T cells. *Mol Immunol*. 47, 1595-600.
- Giedlin, M.A., Zimmerman, R.J., 1993. The use of recombinant human interleukin-2 in treating infectious diseases. *Curr Opin Biotechnol*. 4, 722-6.
- Haas, J., Hug, A., Viehover, A., Fritzsching, B., Falk, C.S., Filser, A., Vetter, T., Milkova, L., Korporal, M., Fritz, B., Storch-Hagenlocher, B., Krammer, P.H., Suri-Payer, E., Wildemann, B., 2005. Reduced suppressive effect of CD4+CD25high regulatory T cells on the T cell immune response against myelin oligodendrocyte glycoprotein in patients with multiple sclerosis. *Eur J Immunol*. 35, 3343-52.
- Haas, J., Fritzsching, B., Trubswetter, P., Korporal, M., Milkova, L., Fritz, B., Vobis, D., Krammer, P.H., Suri-Payer, E., Wildemann, B., 2007. Prevalence of newly generated naive regulatory T cells (Treg) is critical for Treg suppressive function and determines Treg dysfunction in multiple sclerosis. *J Immunol*. 179, 1322-30.
- Haas, J., Korporal, M., Balint, B., Fritzsching, B., Schwarz, A., Wildemann, B., 2009. Glatiramer acetate improves regulatory T-cell function by expansion of naive CD4(+)CD25(+)FOXP3(+)CD31(+) T-cells in patients with multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*. 216, 113-7.
- Hafler, D.A., Compston, A., Sawcer, S., Lander, E.S., Daly, M.J., De Jager, P.L., de Bakker, P.I., Gabriel, S.B., Mirel, D.B., Ivinson, A.J., Pericak-Vance, M.A., Gregory, S.G., Rioux, J.D., McCauley, J.L., Haines, J.L., Barcellos, L.F., Cree, B., Oksenberg, J.R., Hauser, S.L., 2007. Risk alleles for multiple sclerosis identified by a genomewide study. *N Engl J Med*. 357, 851-62.
- Hauser, S.L., Waubant, E., Arnold, D.L., Vollmer, T., Antel, J., Fox, R.J., Bar-Or, A., Panzara, M., Sarkar, N., Agarwal, S., Langer-Gould, A., Smith, C.H., 2008. B-cell depletion with rituximab in relapsing-remitting multiple sclerosis. *N Engl J Med*. 358, 676-88.
- Heidt, S., Hester, J., Shankar, S., Friend, P.J., Wood, K.J., 2012. B cell repopulation after alemtuzumab induction-transient increase in transitional B cells and long-term dominance of naive B cells. *Am J Transplant*. 12, 1784-92.
- Hellings, N., Barea, M., Verhoeven, C., D'Hooghe M, B., Medaer, R., Bernard, C.C., Raus, J., Stinissen, P., 2001. T-cell reactivity to multiple myelin antigens in multiple sclerosis patients and healthy controls. *J Neurosci Res*. 63, 290-302.
- Hohlfeld, R., Wekerle, H., 2004. Autoimmune concepts of multiple sclerosis as a basis for selective immunotherapy: from pipe dreams to (therapeutic) pipelines. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101 Suppl 2, 14599-606.
- Hong, J., Li, N., Zhang, X., Zheng, B., Zhang, J.Z., 2005. Induction of CD4+CD25+ regulatory T cells by copolymer-I through activation of transcription factor Foxp3. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 102, 6449-54.
- Hori, S., Haury, M., Coutinho, A., Demengeot, J., 2002. Specificity requirements for selection and effector functions of CD25+4+ regulatory T cells in anti-myelin basic protein T cell receptor transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99, 8213-8.
- 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., Hall, R.P., St Clair, E.W., Tedder, T.F., 2011.

- Characterization of a rare IL-10-competent B-cell subset in humans that parallels mouse regulatory B10 cells. *Blood*. 117, 530-41.
- Jingwu, Z., Medaer, R., Hashim, G.A., Chin, Y., van den Berg-Loonen, E., Raus, J.C., 1992. Myelin basic protein-specific T lymphocytes in multiple sclerosis and controls: precursor frequency, fine specificity, and cytotoxicity. *Ann Neurol*. 32, 330-8.
- Jonuleit, H., Schmitt, E., Stassen, M., Tuettenberg, A., Knop, J., Enk, A.H., 2001. Identification and functional characterization of human CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties isolated from peripheral blood. *J Exp Med*. 193, 1285-94.
- Kappos, L., Li, D., Calabresi, P.A., O'Connor, P., Bar-Or, A., Barkhof, F., Yin, M., Leppert, D., Glanzman, R., Tinbergen, J., Hauser, S.L., 2011. Ocrelizumab in relapsing-remitting multiple sclerosis: a phase 2, randomised, placebo-controlled, multicentre trial. *Lancet*. 378, 1779-87.
- Katz, S.I., Parker, D., Turk, J.L., 1974. Suppressor cells in delayed hypersensitivity reactions. *Mayo Clin Proc*. 49, 537-40.
- Kebir, H., Kreymborg, K., Ifergan, I., Dodelet-Devillers, A., Cayrol, R., Bernard, M., Giuliani, F., Arbour, N., Becher, B., Prat, A., 2007. Human TH17 lymphocytes promote blood-brain barrier disruption and central nervous system inflammation. *Nat Med*. 13, 1173-5.
- Kessel, A., Haj, T., Peri, R., Snir, A., Melamed, D., Sabo, E., Toubi, E., 2012. Human CD19(+)CD25(high) B regulatory cells suppress proliferation of CD4(+) T cells and enhance Foxp3 and CTLA-4 expression in T-regulatory cells. *Autoimmun Rev*. 11, 670-7.
- Khattari, R., Cox, T., Yasayko, S.A., Ramsdell, F., 2003. An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells. *Nat Immunol*. 4, 337-42.
- Knippenberg, S., Peelen, E., Smolders, J., Thewissen, M., Menheere, P., Cohen Tervaert, J.W., Hupperts, R., Damoiseaux, J., 2011. 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*. 239, 80-6.
- Kohm, A.P., Carpentier, P.A., Anger, H.A., Miller, S.D., 2002. Cutting edge: CD4+CD25+ regulatory T cells suppress antigen-specific autoreactive immune responses and central nervous system inflammation during active experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol*. 169, 4712-6.
- Korn, T., Reddy, J., Gao, W., Bettelli, E., Awasthi, A., Petersen, T.R., Backstrom, B.T., Sobel, R.A., Wucherpfennig, K.W., Strom, T.B., Oukka, M., Kuchroo, V.K., 2007. Myelin-specific regulatory T cells accumulate in the CNS but fail to control autoimmune inflammation. *Nat Med*. 13, 423-31.
- Korporal, M., Haas, J., Balint, B., Fritzsching, B., Schwarz, A., Moeller, S., Fritz, B., Suri-Payer, E., Wildemann, B., 2008. Interferon beta-induced restoration of regulatory T-cell function in multiple sclerosis is prompted by an increase in newly generated naive regulatory T cells. *Arch Neurol*. 65, 1434-9.
- Kretschmer, K., Apostolou, I., Hawiger, D., Khazaie, K., Nussenzweig, M.C., von Boehmer, H., 2005. Inducing and expanding regulatory T cell populations by foreign antigen. *Nat Immunol*. 6, 1219-27.
- Kreuzaler, M., Rauch, M., Salzer, U., Birmelin, J., Rizzi, M., Grimbacher, B., Plebani, A., Lougaris, V., Quinti, I., Thon, V., Litzman, J., Schlesier, M., Warnatz, K., Thiel, J., Rolink, A.G., Eibel, H., 2012. Soluble BAFF levels inversely correlate with peripheral B cell numbers and the expression of BAFF receptors. *J Immunol*. 188, 497-503.
- Kumar, M., Putzki, N., Limmroth, V., Remus, R., Lindemann, M., Knop, D., Mueller, N., Hardt, C., Kreuzfelder, E., Grosse-Wilde, H., 2006. CD4+CD25+FoxP3+ T lymphocytes fail to suppress myelin basic protein-induced proliferation in patients with multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*. 180, 178-84.
- Lafaille, J.J., Nagashima, K., Katsuki, M., Tonegawa, S., 1994. High incidence of spontaneous autoimmune encephalomyelitis in immunodeficient anti-myelin basic protein T cell receptor transgenic mice. *Cell*. 78, 399-408.
- Lampropoulou, V., Hoehlig, K., Roch, T., Neves, P., Calderon Gomez, E., Sweenie, C.H., Hao, Y., Freitas, A.A., Steinhoff, U., Anderton, S.M., Fillatreau, S., 2008. TLR-activated B cells suppress T cell-mediated autoimmunity. *J Immunol*. 180, 4763-73.

- Lavie, F., Miceli-Richard, C., Ittah, M., Sellam, J., Gottenberg, J.E., Mariette, X., 2007. Increase of B cell-activating factor of the TNF family (BAFF) after rituximab treatment: insights into a new regulating system of BAFF production. *Ann Rheum Dis.* 66, 700-3.
- Leandro, M.J., Cambridge, G., Ehrenstein, M.R., Edwards, J.C., 2006. Reconstitution of peripheral blood B cells after depletion with rituximab in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 54, 613-20.
- Lemoine, F.M., Cherai, M., Giverne, C., Dimitri, D., Rosenzweig, M., Trebeden-Negre, H., Chaput, N., Barrou, B., Thioun, N., Gattegnio, B., Selles, F., Six, A., Azar, N., Lotz, J.P., Buzyn, A., Sibony, M., Delcourt, A., Boyer, O., Herson, S., Klatzmann, D., Lacave, R., 2009. Massive expansion of regulatory T-cells following interleukin 2 treatment during a phase I-II dendritic cell-based immunotherapy of metastatic renal cancer. *Int J Oncol.* 35, 569-81.
- Lemoine, S., Morva, A., Youinou, P., Jamin, C., 2011. Human T cells induce their own regulation through activation of B cells. *J Autoimmun.* 36, 228-38.
- Levings, M.K., Sangregorio, R., Roncarolo, M.G., 2001. Human cd25(+)cd4(+) t regulatory cells suppress naive and memory T cell proliferation and can be expanded in vitro without loss of function. *J Exp Med.* 193, 1295-302.
- Liu, W., Putnam, A.L., Xu-Yu, Z., Szot, G.L., Lee, M.R., Zhu, S., Gottlieb, P.A., Kapranov, P., Gingeras, T.R., Fazekas de St Groth, B., Clayberger, C., Soper, D.M., Ziegler, S.F., Bluestone, J.A., 2006. CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells. *J Exp Med.* 203, 1701-11.
- Lowther, D.E., Hafler, D.A., 2012. Regulatory T cells in the central nervous system. *Immunol Rev.* 248, 156-69.
- Lundmark, F., Duvefelt, K., Jacobaeus, E., Kockum, I., Wallstrom, E., Khademi, M., Oturai, A., Ryder, L.P., Saarela, J., Harbo, H.F., Celius, E.G., Salter, H., Olsson, T., Hillert, J., 2007. Variation in interleukin 7 receptor alpha chain (IL7R) influences risk of multiple sclerosis. *Nat Genet.* 39, 1108-13.
- Magliozzi, R., Howell, O., Vora, A., Serafini, B., Nicholas, R., Puopolo, M., Reynolds, R., Aloisi, F., 2007. Meningeal B-cell follicles in secondary progressive multiple sclerosis associate with early onset of disease and severe cortical pathology. *Brain.* 130, 1089-104.
- Mann, M.K., Maresz, K., Shriver, L.P., Tan, Y., Dittel, B.N., 2007. B cell regulation of CD4+CD25+ T regulatory cells and IL-10 via B7 is essential for recovery from experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol.* 178, 3447-56.
- Matsumoto, Y., Sakuma, H., Kohyama, K., Park, I.K., 2007. Paralysis of CD4(+)CD25(+) regulatory T cell response in chronic autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol.* 187, 44-54.
- Matsushita, T., Fujimoto, M., Hasegawa, M., Komura, K., Takehara, K., Tedder, T.F., Sato, S., 2006. Inhibitory role of CD19 in the progression of experimental autoimmune encephalomyelitis by regulating cytokine response. *Am J Pathol.* 168, 812-21.
- Matsushita, T., Yanaba, K., Bouaziz, J.D., Fujimoto, M., Tedder, T.F., 2008. Regulatory B cells inhibit EAE initiation in mice while other B cells promote disease progression. *J Clin Invest.* 118, 3420-30.
- Matsushita, T., Horikawa, M., Iwata, Y., 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.* 185, 2240-52.
- Mauri, C., Gray, D., Mushtaq, N., Londei, M., 2003. Prevention of arthritis by interleukin 10-producing B cells. *J Exp Med.* 197, 489-501.
- Mauri, C., Bosma, A., 2012. Immune regulatory function of B cells. *Annu Rev Immunol.* 30, 221-41.
- McGeachy, M.J., Stephens, L.A., Anderson, S.M., 2005. Natural recovery and protection from autoimmune encephalomyelitis: contribution of CD4+CD25+ regulatory cells within the central nervous system. *J Immunol.* 175, 3025-32.
- McKeever, U., Mordes, J.P., Greiner, D.L., Appel, M.C., Rozing, J., Handler, E.S., Rossini, A.A., 1990. Adoptive transfer of autoimmune diabetes and thyroiditis to athymic rats. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 87, 7618-22.
- Michel, L., Berthelot, L., Pettre, S., Wiertlewski, S., Lefrere, F., Braudeau, C., Brouard, S., Soullillou, J.P., 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, 3411-9.
- Morva, A., Lemoine, S., Achour, A., Pers, J.O., Youinou, P., Jamin, C., 2012. Maturation and function of human dendritic cells are regulated by B lymphocytes. *Blood.* 119, 106-14.
- Moulin, V., Andris, F., Thielemans, K., Maliszewski, C., Urbain, J., Moser, M., 2000. B lymphocytes regulate dendritic cell (DC) function in vivo: increased interleukin 12 production by DCs from B cell-deficient mice results in T helper cell type 1 deviation. *J Exp Med.* 192, 475-82.
- Neta, R., Salvin, S.B., 1974. Specific suppression of delayed hypersensitivity: the possible presence of a suppressor B cell in the regulation of delayed hypersensitivity. *J Immunol.* 113, 1716-25.
- Niino, M., Hirotsu, M., Miyazaki, Y., Sasaki, H., 2009. Memory and naive B-cell subsets in patients with multiple sclerosis. *Neurosci Lett.* 464, 74-8.
- O'Connor, R.A., Malpass, K.H., Anderton, S.M., 2007. The inflamed central nervous system drives the activation and rapid proliferation of Foxp3⁺ regulatory T cells. *J Immunol.* 179, 958-66.
- Olivares-Villagomez, D., Wang, Y., Lafaille, J.J., 1998. Regulatory CD4(+) T cells expressing endogenous T cell receptor chains protect myelin basic protein-specific transgenic mice from spontaneous autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med.* 188, 1883-94.
- Olsson, T., Sun, J., Hillert, J., Hojberg, B., Ekre, H.P., Andersson, G., Olerup, O., Link, H., 1992. Increased numbers of T cells recognizing multiple myelin basic protein epitopes in multiple sclerosis. *Eur J Immunol.* 22, 1083-7.
- Pender, M.P., Csurhes, P.A., Greer, J.M., Mowat, P.D., Henderson, R.D., Cameron, K.D., Purdie, D.M., McCombe, P.A., 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.* 165, 5322-31.
- Putheti, P., Pettersson, A., Soderstrom, M., Link, H., Huang, Y.M., 2004. Circulating CD4+CD25+ T regulatory cells are not altered in multiple sclerosis and unaffected by disease-modulating drugs. *J Clin Immunol.* 24, 155-61.
- Reboldi, A., Coisne, C., Baumjohann, D., Benvenuto, F., Bottinelli, D., Lira, S., Uccelli, A., Lanzavecchia, A., Engelhardt, B., 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, 514-23.
- Riley, J.L., June, C.H., Blazar, B.R., 2009. Human T regulatory cell therapy: take a billion or so and call me in the morning. *Immunity.* 30, 656-65.
- Roncador, G., Brown, P.J., Maestre, L., Hue, S., Martinez-Torrecuadrada, J.L., Ling, K.L., Pratap, S., Toms, C., Fox, B.C., Cerundolo, V., Powrie, F., Banham, A.H., 2005. Analysis of FOXP3 protein expression in human CD4+CD25+ regulatory T cells at the single-cell level. *Eur J Immunol.* 35, 1681-91.
- Saadoun, D., Rosenzweig, M., Joly, F., Six, A., Carrat, F., Thibault, V., Sene, D., Cacoub, P., Klatzmann, D., 2011. Regulatory T-cell responses to low-dose interleukin-2 in HCV-induced vasculitis. *N Engl J Med.* 365, 2067-77.
- Sakaguchi, S., Fukuma, K., Kuribayashi, K., Masuda, T., 1985. Organ-specific autoimmune diseases induced in mice by elimination of T cell subset. I. Evidence for the active participation of T cells in natural self-tolerance; deficit of a T cell subset as a possible cause of autoimmune disease. *J Exp Med.* 161, 72-87.
- Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M., Toda, M., 1995. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol.* 155, 1151-64.
- Sakaguchi, S., Miyara, M., Costantino, C.M., Hafler, D.A., 2010. FOXP3⁺ regulatory T cells in the human immune system. *Nat Rev Immunol.* 10, 490-500.
- Samoilova, E.B., Horton, J.L., Chen, Y., 1998. Acceleration of experimental autoimmune encephalomyelitis in interleukin-10-deficient mice: roles of interleukin-10 in disease progression and recovery. *Cell Immunol.* 188, 118-24.
- Sawcer, S., Hellenthal, G., Pirinen, M., Spencer, C.C., Patsopoulos, N.A., Moutsianas, L., Dilthey, A., Su, Z., Freeman, C., Hunt, S.E., Edkins, S., Gray, E., Booth, D.R., Potter, S.C., Goris, A., Band, G., Oturai, A.B., Strange, A., Saarela, J., Bellenguez, C., Fontaine, B., Gillman, M.,

- Hemmer, B., Gwilliam, R., Zipp, F., Jayakumar, A., Martin, R., Leslie, S., Hawkins, S., Giannoulatou, E., D'Alfonso, S., Blackburn, H., Martinelli Boneschi, F., Liddle, J., Harbo, H.F., Perez, M.L., Spurkland, A., Waller, M.J., Mycko, M.P., Ricketts, M., Comabella, M., Hammond, N., Kockum, I., McCann, O.T., Ban, M., Whittaker, P., Kempainen, A., Weston, P., Hawkins, C., Widaa, S., Zajicek, J., Dronov, S., Robertson, N., Bumpstead, S.J., Barcellos, L.F., Ravindrarajah, R., Abraham, R., Alfredsson, L., Ardlie, K., Aubin, C., Baker, A., Baker, K., Baranzini, S.E., Bergamaschi, L., Bergamaschi, R., Bernstein, A., Berthele, A., Boggild, M., Bradfield, J.P., Brassat, D., Broadley, S.A., Buck, D., Butzkueven, H., Capra, R., Carroll, W.M., Cavalla, P., Celius, E.G., Cepok, S., Chiavacci, R., Clerget-Darpoux, F., Clysters, K., Comi, G., Cossburn, M., Cournu-Rebeix, I., Cox, M.B., Cozen, W., Cree, B.A., Cross, A.H., Cusi, D., Daly, M.J., Davis, E., de Bakker, P.I., Debouverie, M., D'Hooghe M, B., Dixon, K., Dobosi, R., Dubois, B., Ellinghaus, D., Elovaara, I., Esposito, F., Fontenille, C., Foote, S., Franke, A., Galimberti, D., Ghezzi, A., Glessner, J., Gomez, R., Gout, O., Graham, C., Grant, S.F., Guerini, F.R., Hakonarson, H., Hall, P., Hamsten, A., Hartung, H.P., Heard, R.N., Heath, S., Hobart, J., Hoshi, M., Infante-Duarte, C., Ingram, G., Ingram, W., Islam, T., Jagodic, M., Kabesch, M., Kermodé, A.G., Kilpatrick, T.J., Kim, C., Klopp, N., Koivisto, K., Larsson, M., Lathrop, M., Lechner-Scott, J.S., Leone, M.A., Leppa, V., Liljedahl, U., Bomfim, I.L., Lincoln, R.R., Link, J., Liu, J., Lorentzen, A.R., Lupoli, S., Macchiardi, F., Mack, T., Marriott, M., Martinelli, V., Mason, D., McCauley, J.L., Mentch, F., Mero, I.L., Mihalova, T., Montalban, X., Mottershead, J., Myhr, K.M., Naldi, P., Ollier, W., Page, A., Palotie, A., Pelletier, J., Piccio, L., Pickersgill, T., Piehl, F., Pobywajlo, S., Quach, H.L., Ramsay, P.P., Reunanen, M., Reynolds, R., Rioux, J.D., Rodegher, M., Roesner, S., Rubio, J.P., Ruckert, I.M., Salvetti, M., Salvi, E., Santaniello, A., Schaefer, C.A., Schreiber, S., Schulze, C., Scott, R.J., Sellebjerg, F., Selmaj, K.W., Sexton, D., Shen, L., Simms-Acuna, B., Skidmore, S., Sleiman, P.M., Smestad, C., Sorensen, P.S., Sondergaard, H.B., Stankovich, J., Strange, R.C., Sulonen, A.M., Sundqvist, E., Syvanen, A.C., Taddeo, F., Taylor, B., Blackwell, J.M., Tienari, P., Bramon, E., Tourbah, A., Brown, M.A., Tronczynska, E., Casas, J.P., Tubridy, N., Corvin, A., Vickery, J., Jankowski, J., Villoslada, P., Markus, H.S., Wang, K., Mathew, C.G., Wason, J., Palmer, C.N., Wichmann, H.E., Plomin, R., Willoughby, E., Rautanen, A., Winkelmann, J., Wittig, M., Trembath, R.C., Yaouanq, J., Viswanathan, A.C., Zhang, H., Wood, N.W., Zuvich, R., Deloukas, P., Langford, C., Duncanson, A., Oksenberg, J.R., Pericak-Vance, M.A., Haines, J.L., Olsson, T., Hillert, J., Ivinson, A.J., De Jager, P.L., Peltonen, L., Stewart, G.J., Hafler, D.A., Hauser, S.L., McVean, G., Donnelly, P., Compston, A., 2011. Genetic risk and a primary role for cell-mediated immune mechanisms in multiple sclerosis. *Nature*. 476, 214-9.
- Scapini, P., Lamagna, C., Hu, Y., Lee, K., Tang, Q., DeFranco, A.L., Lowell, C.A., 2011. B cell-derived IL-10 suppresses inflammatory disease in Lyn-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 108, E823-32.
- Seddiki, N., Santner-Nanan, B., Martinson, J., Zaunders, J., Sasson, S., Landay, A., Solomon, M., Selby, W., Alexander, S.I., Nanan, R., Kelleher, A., Fazekas de St Groth, B., 2006. Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells. *J Exp Med*. 203, 1693-700.
- Segal, B.M., Constantinescu, C.S., Raychaudhuri, A., Kim, L., Fidelus-Gort, R., Kasper, L.H., 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.
- Sospedra, M., Martin, R., 2005. Immunology of multiple sclerosis. *Annu Rev Immunol*. 23, 683-747.
- Stephens, L.A., Mottet, C., Mason, D., Powrie, F., 2001. Human CD4(+)CD25(+) thymocytes and peripheral T cells have immune suppressive activity in vitro. *Eur J Immunol*. 31, 1247-54.
- Stephens, L.A., Gray, D., Anderton, S.M., 2005. CD4+CD25+ regulatory T cells limit the risk of autoimmune disease arising from T cell receptor crossreactivity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 102, 17418-23.
- Stummvoll, G.H., DiPaolo, R.J., Huter, E.N., Davidson, T.S., Glass, D., Ward, J.M., Shevach, E.M., 2008. Th1, Th2, and Th17 effector T cell-induced autoimmune gastritis differs in pathological pattern and in susceptibility to suppression by regulatory T cells. *J Immunol*. 181, 1908-16.

- Sugihara, S., Izumi, Y., Yoshioka, T., Yagi, H., Tsujimura, T., Tarutani, O., Kohno, Y., Murakami, S., Hamaoka, T., Fujiwara, H., 1988. Autoimmune thyroiditis induced in mice depleted of particular T cell subsets. I. Requirement of Lyt-1 dull L3T4 bright normal T cells for the induction of thyroiditis. *J Immunol.* 141, 105-13.
- Sun, C.M., Deriaud, E., Leclerc C., Lo-Man R., 2005. Upon TLR9 signaling, CD5+ B cells control the IL-12-dependent TH1-priming capacity of neonatal DCs. *Immunity.* 4, 467-77.
- Sun, J.B., Flach, C.F., Czerkinsky, C., Holmgren, J., 2008. B lymphocytes promote expansion of regulatory T cells in oral tolerance: powerful induction by antigen coupled to cholera toxin B subunit. *J Immunol.* 181, 8278-87.
- Thornton, A.M., Shevach, E.M., 1998. CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J Exp Med.* 188, 287-96.
- Thornton, A.M., Korty, P.E., Tran, D.Q., Wohlfert, E.A., Murray, P.E., Belkaid, Y., Shevach, E.M., 2010. Expression of Helios, an Ikaros transcription factor family member, differentiates thymic-derived from peripherally induced Foxp3+ T regulatory cells. *J Immunol.* 184, 3433-41.
- Tu, W., Lau, Y.L., Zheng, J., Liu, Y., Chan, P.L., Mao, H., Dionis, K., Schneider, P., Lewis, D.B., 2008. Efficient generation of human alloantigen-specific CD4+ regulatory T cells from naive precursors by CD40-activated B cells. *Blood.* 112, 2554-62.
- Tzartos, J.S., Friese, M.A., Craner, M.J., Palace, J., Newcombe, J., Esiri, M.M., 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, 146-55.
- Vandenbark, A.A., Culbertson, N.E., Bartholomew, R.M., Huan, J., Agotsch, M., LaTocha, D., Yadav, V., Mass, M., Whitham, R., Lovera, J., Milano, J., Theofan, G., Chou, Y.K., Offner, H., Bourdette, D.N., 2008. Therapeutic vaccination with a trivalent T-cell receptor (TCR) peptide vaccine restores deficient FoxP3 expression and TCR recognition in subjects with multiple sclerosis. *Immunology.* 123, 66-78.
- Venken, K., Hellings, N., Hensen, K., Rummens, J.L., Medaer, R., D'Hooghe M, B., Dubois, B., Raus, J., Stinissen, P., 2006. Secondary progressive in contrast to relapsing-remitting multiple sclerosis patients show a normal CD4+CD25+ regulatory T-cell function and FOXP3 expression. *J Neurosci Res.* 83, 1432-46.
- Venken, K., Hellings, N., Broekmans, T., Hensen, K., Rummens, J.L., Stinissen, P., 2008a. Natural naive CD4+CD25+CD127low regulatory T cell (Treg) development and function are disturbed in multiple sclerosis patients: recovery of memory Treg homeostasis during disease progression. *J Immunol.* 180, 6411-20.
- Venken, K., Hellings, N., Thewissen, M., Somers, V., Hensen, K., Rummens, J.L., Medaer, R., Hupperts, R., Stinissen, P., 2008b. Compromised CD4+ CD25(high) regulatory T-cell function in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis is correlated with a reduced frequency of FOXP3-positive cells and reduced FOXP3 expression at the single-cell level. *Immunology.* 123, 79-89.
- Venken, K., Hellings, N., Hensen, K., Rummens, J.L., Stinissen, P., 2010. Memory CD4+CD127high T cells from patients with multiple sclerosis produce IL-17 in response to myelin antigens. *J Neuroimmunol.* 226, 185-91.
- Viglietta, V., Baecher-Allan, C., Weiner, H.L., Hafler, D.A., 2004. Loss of functional suppression by CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. *J Exp Med.* 199, 971-9.
- Wallstrom, E., Khademi, M., Andersson, M., Weissert, R., Linington, C., Olsson, T., 1998. Increased reactivity to myelin oligodendrocyte glycoprotein peptides and epitope mapping in HLA DR2(15)+ multiple sclerosis. *Eur J Immunol.* 28, 3329-35.
- Wang, J., Ioan-Facsinay, A., van der Voort, E.I., Huizinga, T.W., Toes, R.E., 2007. Transient expression of FOXP3 in human activated nonregulatory CD4+ T cells. *Eur J Immunol.* 37, 129-38.
- Watanabe, R., Ishiura, N., Nakashima, H., Kuwano, Y., Okochi, H., Tamaki, K., Sato, S., Tedder, T.F., Fujimoto, M., 2010. Regulatory B cells (B10 cells) have a suppressive role in murine lupus: CD19 and B10 cell deficiency exacerbates systemic autoimmunity. *J Immunol.* 184, 4801-9.

-
- Wolf, S.D., Dittel, B.N., Hardardottir, F., Janeway, C.A., Jr., 1996. Experimental autoimmune encephalomyelitis induction in genetically B cell-deficient mice. *J Exp Med.* 184, 2271-8.
- Yanaba, K., Bouaziz, J.D., Haas, K.M., Poe, J.C., Fujimoto, M., Tedder, T.F., 2008. A regulatory B cell subset with a unique CD1dhiCD5⁺ phenotype controls T cell-dependent inflammatory responses. *Immunity.* 28, 639-50.
- Yu, P., Gregg, R.K., Bell, J.J., Ellis, J.S., Divekar, R., Lee, H.H., Jain, R., Waldner, H., Hardaway, J.C., Collins, M., Kuchroo, V.K., Zaghoulani, H., 2005. Specific T regulatory cells display broad suppressive functions against experimental allergic encephalomyelitis upon activation with cognate antigen. *J Immunol.* 174, 6772-80.
- Zabransky, D.J., Nirschl, C.J., Durham, N.M., Park, B.V., Ceccato, C.M., Bruno, T.C., Tam, A.J., Getnet, D., Drake, C.G., 2012. Phenotypic and functional properties of Helios⁺ regulatory T cells. *PLoS One.* 7, e34547.
- Zhang, X., Koldzic, D.N., Izikson, L., Reddy, J., Nazareno, R.F., Sakaguchi, S., Kuchroo, V.K., Weiner, H.L., 2004. IL-10 is involved in the suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells. *Int Immunol.* 16, 249-56.
- Zhang, X., Reddy, J., Ochi, H., Frenkel, D., Kuchroo, V.K., Weiner, H.L., 2006. Recovery from experimental allergic encephalomyelitis is TGF-beta dependent and associated with increases in CD4⁺LAP⁺ and CD4⁺CD25⁺ T cells. *Int Immunol.* 18, 495-503.
- Zheng, J., Liu, Y., Lau, Y.L., Tu, W., 2010. CD40-activated B cells are more potent than immature dendritic cells to induce and expand CD4(+) regulatory T cells. *Cell Mol Immunol.* 7, 44-50.
- Zozulya, A.L., Wiendl, H., 2008. The role of regulatory T cells in multiple sclerosis. *Nat Clin Pract Neurol.* 4, 384-98.

***DISCUSSION ET
PERSPECTIVES***

I- Discussion

La SEP est considérée comme une maladie auto-immune démyélinisante du SNC, médiée par des LT CD4⁺ auto-réactifs. Ces LT, une fois activés en périphérie migrent à travers la Barrière Hémato Méningée (BHM) et gagnent le SNC où ils déclenchent une cascade auto-immune impliquant d'autres cellules du système immunitaire, à l'origine des lésions démyélinisantes (Bahbouhi et al., 2009; Prat et al., 1999).

De nombreux antigènes candidats (en particulier des peptides de la myéline) ont été proposés, mais aucune preuve directe n'a été apportée de leur réelle implication dans ces mécanismes d'auto-réactivité. La fréquence de LT auto-réactifs CD4⁺ et CD8⁺ a été abondamment étudiée dans la littérature (Elong Ngonu A., 2012). Ainsi, en utilisant différentes techniques (PCR quantitative, cytométrie en flux, tétramères), de nombreuses équipes ont essayé de retrouver une augmentation des LT CD4⁺/CD8⁺ auto-réactifs anti-MBP, -MOG ou -PLP dans le sang des patients. Plusieurs études ont retrouvé une fréquence de LT reconnaissant des peptides de la myéline similaire entre les patients et les témoins (Berthelot et al., 2008; Hellings et al., 2001; Jingwu et al., 1992), alors que d'autres ont suggéré une augmentation de ces LT chez les patients (Bahbouhi et al., 2010; Chou et al., 1992; Olsson et al., 1992; Pender et al., 2000; Wallstrom et al., 1998). En conclusion, malgré la présence de LT auto-réactifs dans le sang des patients et des témoins sains, l'augmentation de leur fréquence chez les patients par rapport aux individus sains reste donc controversée. Cependant, que la fréquence de ces cellules soit ou non augmentée, une autre question demeure :

Comment et pourquoi ces cellules auto-réactives, chez les patients atteints de SEP, s'activent et échappent aux mécanismes de tolérance périphérique ?

Au cours du XX^{ème} siècle, on a pu observer une explosion de l'incidence des maladies auto-immunes (dont le diabète de type 1 et la SEP) au sein des pays développés (Rook, 2012). Bien que les modifications génétiques, et la recrudescence des virus (avec les mécanismes de mimétisme moléculaire) sont probablement impliqués, d'autres explications environnementales contribuent probablement à ce « boom » de l'auto-immunité. En effet, dans notre environnement urbain moderne, de nombreux micro organismes, anciens commensaux, ont été éradiqués. Ces *Old Friends* cohabitaient il y a un siècle avec l'Homme, et permettaient probablement l'induction de mécanismes immunorégulateurs (Rook, 2012). Ces micros organismes comprennent les bactéries microbiotiques, mais aussi les helminthes. Ainsi, ces derniers ont été associés à une amélioration clinique des patients atteints de SEP mais également au développement de LT et B régulateurs (Correale and Farez, 2007; Correale

et al., 2008). Cette hypothèse basée sur la modification du mode de vie et l'apparition d'une hygiène plus importante dans nos pays industrialisés soutient ainsi un probable défaut de régulation du système immunitaire, nous rendant plus sensibles au développement de maladies auto-immunes.

Dans la SEP, un des dysfonctionnement proposés permettant l'activation puis la migration de ces cellules au sein du SNC serait ainsi un défaut de régulation en périphérie. De nombreuses populations régulatrices ont été identifiées, dont les LT régulateurs naturels Foxp3⁺ qui sont les mieux caractérisés mais aussi les plus étudiés dans la SEP. D'autres populations existent, dont les LB régulateurs, qui sont les plus récemment décrits chez l'homme et donc les moins bien connus. Au cours de ma thèse, nous avons étudié ces deux populations et nous avons trouvé qu'il n'existait pas de défaut de fréquence ou de fonction régulatrice de ces deux types cellulaires au sein de notre cohorte de patients SEP, non traités.

Les LT régulateurs naturels ont été abondamment étudiés dans la SEP. Bien que la vaste majorité des études sur le sujet retrouve une diminution de leur fonction régulatrice, ces résultats méritent d'être commentés. Les différences retrouvées entre les études s'expliquent en effet en partie par l'utilisation de différents marqueurs pour identifier ces cellules (Lowther and Hafler, 2012). Ainsi, plusieurs équipes ont rapporté un défaut de régulation des LT CD4⁺CD25^{high} chez les patients atteints de SEP rémittente (Haas et al., 2005; Venken et al., 2008b; Viglietta et al., 2004), alors que chez les patients atteints de forme SP, ces cellules ont une fonction régulatrice normale (Venken et al., 2006). Dans ce dernier travail, les auteurs ont mis en évidence une corrélation entre la fonction suppressive et la durée d'évolution de la maladie (mais pas avec l'âge).

Dans notre étude, nous avons également mis en évidence une apparente altération de la fonction suppressive des LT CD4⁺CD25^{high}, mais cette altération n'est pas retrouvée lorsque le marqueur CD127 est utilisé. L'utilisation de ce marqueur nous a en effet permis de différencier les LT régulateurs CD4⁺CD25^{high}CD127^{low}, des LT activés CD4⁺CD25^{high}CD127⁺. De plus, dans notre étude, l'étude de cette population nous a permis de mettre en évidence une hyperprolifération de ces dernières accompagnée d'une sécrétion augmentée d'IFN γ . Ainsi, bloquer les cellules CD127⁺ par un anticorps monoclonal pourrait permettre de bloquer les LT activés tout en préservant le pool de Tregs. De manière intéressante, plusieurs études ont mis en évidence un rôle bénéfique des anticorps anti-IL-7R α (CD127) dans des modèles de souris NOD (Lee et al., 2012; Penaranda et al., 2012). L'injection de cet anticorps a pour effet d'augmenter l'expression du récepteur inhibiteur PD-1 (Programmed Death 1) sur les LT effecteurs et de diminuer la production d'IFN γ . De plus,

une étude publiée en 2007 a retrouvé une infiltration importante des LT $CD4^+CD25^+CD127^+$ au sein de greffons de foie et de rein chez les patients en rejet chronique en comparaison aux patients stables. Ces cellules semblent donc avoir un rôle dans certaines conditions pathologiques chez l'homme (Codarri et al., 2007). Les dernières études de génétique ont également mis en évidence des associations entre CD25, CD127, et la SEP (Sawcer et al., 2011).

La même année, Venken *et al* ont ajouté deux marqueurs supplémentaires pour caractériser les LT régulateurs : CD45RA et CD45RO. Ils permettent de différencier les LT régulateurs naïfs $CD4^+CD25^{high}CD127^{low}CD45RA^+$ des LT régulateurs mémoires $CD4^+CD25^{high}CD127^{low}CD45RO^+$ (Venken et al., 2008a). En effet, Valmori *et al* en 2005 ont identifié une sous population de nTregs exprimant CD45RA, et présentant des caractéristiques de cellules naïves (Valmori et al., 2005). Dans l'étude de Venken, deux groupes de patients ont été formés : les patients ayant une SEP rémittente d'une durée d'évolution inférieure à 10 ans, et les patients ayant une SEP rémittente ou SP avec une durée d'évolution supérieure à 10 ans. Le premier groupe présentait un défaut de régulation des deux sous populations régulatrices naïves et mémoires, alors que le deuxième groupe de patients, présentant une forme « chronique » de maladie, ne présentait pas de défaut de suppression par la population des nTregs mémoires. Dans le premier groupe de patients, une diminution de la fréquence des nTregs mémoires et naïves a été identifiée, s'expliquant par une diminution de la génération thymique de ces nTregs (Venken et al., 2008a). Ces résultats sont en contradiction avec nos propres résultats. En effet, notre cohorte de patients regroupe des patients atteints de SEP rémittente, non traités, avec une durée d'évolution moyenne de 5 ans, donc peu différents du groupe 1 de Venken dont la durée d'évolution moyenne est de 3 ans. Et dans notre étude, contrairement à lui, nous n'avons pas mis en évidence de défaut de régulation.

Plus récemment, l'année dernière, D. Hafler et son équipe se sont intéressés à la fonction régulatrice de différentes sous populations de nTregs mémoires chez les patients atteints de SEP rémittente, en utilisant différentes modalités de stimulation (Baecher-Allan et al., 2011). Trois sous populations ont ainsi été étudiées : les LT régulateurs effecteurs $CD4^+CD25^{high}CD45RO^+CD127^{low}HLA-DR^+$, les LT régulateurs immatures $CD4^+CD25^{high}CD45RO^+CD127^{low}HLA-DR^-$, et les LT $CD4^+CD25^{high}CD45RO^+CD127^+HLA-DR^-$. Deux modalités de stimulation ont été testées : la voie classique du CD3 et la voie du CD2 (ligand de CD58 [LFA3] : gène impliqué dans la susceptibilité à la SEP). En effet, dans une étude précédente, les auteurs avaient montré que la

stimulation du CD2 était associée à une suppression « immédiate » des Tregs (Baecher allan 2006). De plus, Marson *et al* ont montré que Foxp3 se liait au locus CD2 et induisait sa transcription (Marson et al., 2007), et les études génétiques ont impliqué des variants alléliques de CD2 dans la susceptibilité de la SEP (De Jager et al., 2009).

L'analyse de ces 3 sous populations régulatrices a permis de mettre en évidence une régulation plus forte et rapide (dans les 48h) par les LT CD127^{low}HLA-DR⁺, alors que les LT CD127^{low}HLA-DR⁻ requièrent 96h pour atteindre leur capacité suppressive maximale. Au contraire, les LT CD127⁺HLA-DR⁻ n'exerçaient pas d'effet suppressif par la voie classique de stimulation (CD3) et sécrétaient de l'IL-17. Ces cellules pouvaient cependant exercer des effets suppressifs mais seulement en cas de stimulation par le CD2. Chez les patients atteints de SEP, les deux sous populations de LT CD127^{low} exerçaient une fonction suppressive normale dans le cadre d'une stimulation par la voie du CD3 confirmant ainsi nos résultats. En revanche, la stimulation par la voie du CD2 mettait en évidence un défaut de suppression (Baecher-Allan et al., 2011). L'hypothèse émise par l'équipe de D. Hafler est donc que les patients atteints de SEP présentent un défaut de régulation des nTregs, qui impliquerait l'activation par la voie du CD2. Cette étude souligne le fait que le mode de sélection des sous populations régulatrices mais aussi la modalité de stimulation peuvent avoir des conséquences significatives sur la fonction suppressive des nTregs.

La même année, cette même équipe a décrit une population de LT CD4⁺CD25^{high}CD127^{low}Foxp3⁺ capables de sécréter de l'IFN γ *ex vivo*. Certaines Tregs humaines peuvent ainsi acquérir un phénotype Th1-like si elles sont cultivées en présence d'IL-12. Ces Tregs Th1 ont une activité suppressive réduite *in vitro*, qui peut être reversée partiellement par des anticorps anti-IFN γ (Dominguez-Villar et al., 2011). Dans cette étude, les patients atteints de SEP rémittente présentaient une fréquence plus élevée de ces cellules Foxp3⁺ Th1 like. Il pourrait donc exister, dans un contexte d'inflammation, un défaut de régulation des nTregs induit en partie par la génération de Tregs Th1 like. L'environnement cytokinique joue donc un rôle probablement important dans la polarisation et la fonction des Tregs. L'étude de ces populations dans le sang périphérique présente donc des limites et n'est qu'un reflet probablement déformé de ce qu'il se passe au sein du SNC.

De plus, la multitude des marqueurs, et leur évolution permanente rendent complexe l'étude de la fonction de ces cellules. Ainsi, en 2009, une nouvelle classification des nTregs a été décrite par l'équipe de Sakaguchi (Miyara et al., 2009). Cette classification dépend essentiellement du taux d'expression de Foxp3, et de l'expression de CD45RA. Elle ajoute un niveau de complexité supplémentaire, par rapport aux Tregs naïves CD45RA⁺, antérieurement

décrites par Valmori. Elle permet ainsi de distinguer des LT régulateurs au repos $CD45RA^+Foxp3^{low}$, et activés $CD45RA^-Foxp3^{high}$, et des LT $CD45RA^-Foxp3^{low}$ non régulateurs sécrétant de fortes quantités de cytokines proinflammatoires. Il serait donc intéressant d'évaluer la fréquence et la fonction de ces sous populations chez les patients atteints de SEP. Enfin, il est probable que l'activité des Tregs soit modifiée en fonction de la forme et de l'évolution de la maladie. Les futures études doivent donc continuer à prendre en compte les différentes formes de maladie ainsi que leur évolution afin d'avoir des groupes homogènes de patients.

L'existence d'une population de LB régulateurs a été rapportée chez l'animal pour la première fois il y a plus de 30 ans (Neta and Salvin, 1974). Leur description chez l'homme est par contre récente (Blair et al., 2010), et leur caractérisation est toujours en cours. Le rôle de ces cellules dans l'évolution, et surtout la rémission de l'EAE, mais aussi l'intérêt grandissant pour les LB dans la SEP, nous ont conduits à nous intéresser à la population des LB régulateurs chez les patients atteints de SEP.

Dans notre étude, nous n'avons pas retrouvé de défaut de sécrétion d'IL-10 par les LB sanguins chez les patients atteints de SEP rémittente ou SP non traités. De plus, la fonction suppressive de ces LB sur la prolifération des LT $CD4^+CD25^-$ apparaît également conservée. Cette étude est le premier travail s'intéressant à la fonction régulatrice des LB $IL10^+$ dans la SEP.

Des études précédentes s'étaient intéressées à la sécrétion d'IL-10 par les LB de patients SEP (Duddy et al., 2007; Iwata et al., 2011; Knippenberg et al., 2011). Deux études avaient ainsi observé une diminution de sécrétion d'IL-10 (Duddy et al., 2007; Knippenberg et al., 2011) mais la dernière retrouvait des résultats contradictoires avec une augmentation de la sécrétion d'IL-10 par les LB (Iwata et al., 2011). Ces résultats divergents peuvent en partie s'expliquer par des différences de protocoles utilisés, mais aussi par le recrutement de patients sous traitement dans deux des études (Iwata et al., 2011; Knippenberg et al., 2011).

Dans notre étude, nous avons choisis d'inclure uniquement des patients non traités depuis au moins 3 mois. De plus, le protocole de stimulation utilisé est identique à celui décrit par l'équipe de T. Tedder, qui travaille sur les LB régulateurs depuis des années. Ce protocole permet de stimuler sur une courte période les LB régulateurs $IL-10^+$ (B10) mais également de promouvoir la différenciation des précurseurs de B10 (B10pro) en activant la voie du CD40 sur une plus longue période. En suivant ce protocole, aucune altération de sécrétion d'IL-10 n'a été mise en évidence chez les patients. Néanmoins, nous ne pouvons pas exclure que,

comme chez l'animal, différents sous-types de LB régulateurs existent, et que l'utilisation de protocoles de stimulation différents permette de recruter différents sous-groupes de LB régulateurs.

Un des intérêts majeur de notre travail a été d'évaluer la fonction suppressive des LB dans la SEP. Il a été ainsi possible de mettre en évidence une suppression de la prolifération des LT $CD4^+CD25^-$ par les LB pré stimulés, mais sans altération de la sécrétion de cytokines Th1 par ces même LT. Cet effet suppressif apparaît être dépendant du contact cellulaire. Et, dans notre étude, aucun défaut de suppression des LB n'a été retrouvé chez les patients atteints de SEP.

Cependant, ces résultats doivent être interprétés avec précaution. En effet, aucun marqueur phénotypique spécifique n'a encore été décrit pour ces cellules chez l'homme. De plus, il est probable que, comme pour les Tregs, il existe différentes populations de LB régulateurs dont les modes de stimulation et d'actions sont différents. Il est donc difficile d'exclure un défaut de régulation d'une sous population de LB régulateurs dans la SEP. De plus, certaines études suggèrent une prolifération Ag-spécifique des LB au sein du SNC. Ainsi des follicules lymphoïdes ont été retrouvés au sein des méninges de 40% des patients atteints de SEP SP (Magliozzi et al., 2007) et les Igs du LCR ont été décrites comme spécifiques de protéines de la myéline dans certaines études (Lambracht-Washington et al., 2007; von Budingen et al., 2008). Il est donc possible qu'il existe un défaut de régulation d'une sous population de LB régulateurs dirigés contre un antigène de la myéline, et que cette population ne soit pas détectée par notre stratégie de stimulation polyclonale.

Cependant, dans cette maladie touchant le SNC, travailler sur le sang périphérique n'est peut être pas le meilleur reflet de l'état des cellules *in situ*. On peut en effet imaginer que ces cellules régulatrices T et B sont inefficaces dans un contexte inflammatoire. Ainsi, dans un modèle d'EAE, durant le pic de la maladie, les LT régulateurs $Foxp3^+$ sont incapables d'inhiber la réaction inflammatoire (Korn et al., 2007). Cette résistance à la régulation est due à la sécrétion d'IL-6 et de TNF par les LT effecteurs pathogènes. Une autre étude a également montré, chez l'homme, qu'en présence d'IL-6 et d'IL-1 β , les nTregs $HLA-DR^-$ pouvaient évoluer vers un phénotype Th17 et perdre leurs capacités suppressives (Beriou et al., 2009). Donc, sans être altérées, les cellules régulatrices ne suffisent peut-être pas à stopper le développement de la maladie après son induction, et contribuent peut être, par des phénomènes de plasticité, à l'entretien de la maladie. Cependant, le problème de l'accessibilité à des biopsies cérébrales ou à des cellules du LCR, en nombre suffisant, rend cette hypothèse difficile à vérifier.

Une observation intéressante a été faite de manière récente. Fristching *et al* ont retrouvé un nombre très faible, voire indétectable, de nTregs au sein du parenchyme cérébral de patients atteints de SEP (Fritzsching et al., 2011). Cette observation avait déjà été faite précédemment (Tzartos et al., 2008). Dans cette étude, les auteurs ont émis l'hypothèse qu'il existait une sensibilité particulière à l'apoptose de ces cellules. En effet, ils ont démontré, que les nTregs du LCR des patients sur exprimaient CD95 (Fritzsching et al., 2011). Donc, une augmentation de la sensibilité des nTregs à l'apoptose au sein des lésions aiguës du SNC, ou un défaut de migration des cellules dans le parenchyme cérébral pourrait expliquer l'absence de ces cellules dans le SNC des patients. Cette carence en cellules régulatrices pourrait ainsi contribuer à favoriser l'emballement d'une cascade auto-immune au sein du SNC. Concernant les LB régulateurs, aucune étude n'a pour le moment étudié la présence de LB-IL10⁺ dans les lésions cérébrales de patients SEP. Par la suite, nous prévoyons de réaliser cette analyse à partir de cerveaux autopsiques de 3 patients décédés.

L'implication des populations régulatrices T et B ne peut pas être exclue pour le moment dans la physiopathologie de la maladie. Il existe en effet des arguments pour penser que les nTregs peuvent avoir un rôle dans l'entretien de la maladie. De même, la connaissance limitée des Bregs chez l'homme ne permet pas d'écarter formellement, à ce jour, un rôle de ces cellules dans la physiopathologie de la SEP. Ces cellules sont par ailleurs des cibles thérapeutiques intéressantes dans le cadre du traitement des maladies auto-immunes. Leur expansion pourrait ainsi permettre de contrecarrer un défaut de tolérance immunitaire tel qu'il a été réalisé récemment, par exemple, dans le cadre de vascularites à l'hépatite C (Saadoun et al., 2011). Leur étude dans le cadre de la maladie a donc tout son sens, puisque mieux comprendre leur rôle et les mécanismes qui les sous-tendent à la fois lors du développement et de l'entretien de la SEP pourrait permettre de les cibler plus précisément.

II. Perspectives

La SEP est une maladie complexe, se développant sur un terrain génétique favorisant, mais probablement déclenchée par la combinaison de plusieurs facteurs environnementaux. Plusieurs hypothèses ont été formulées afin d'essayer de mieux comprendre les premiers stades du déclenchement de la maladie. Ces hypothèses sont résumées ci dessous (Figure 6):

1. La première hypothèse est la plus classique et la plus ancienne. Elle repose sur l'existence de LT CD4⁺ auto-réactifs Th1 plus nombreux chez les patients atteints de SEP. Ces LT reconnaîtraient des peptides de la myéline, et s'activeraient, suite à une infection virale par un phénomène de mimétisme moléculaire. Ces LT migreraient alors à travers la BHM, pour déclencher une cascade auto-immune au sein du SNC (Sospedra and Martin, 2005).
2. La deuxième théorie est plus récente et s'est développée suite à la découverte du rôle des LT Th17 et de l'implication des Tregs dans la maladie. Elle se base sur l'existence d'un défaut de régulation périphérique, qui, s'associerait à la présence de LT Th17 auto-réactifs contre des peptides de la myéline. Ces cellules s'activeraient par un phénomène de mimétisme moléculaire et déclencheraient une cascade auto-immune au sein du SNC après migration (Lowther and Hafler, 2012).
3. La troisième hypothèse repose sur les travaux de M. Pender qui a développé une théorie, centré sur l'infection par l'EBV. En effet, certaines études ont retrouvé chez les patients un défaut de réponse des LT CD8⁺ (Pender et al., 2009). Ainsi, lors d'une infection à EBV, ce défaut de contrôle par les LT CD8⁺ entraînerait une augmentation importante de la charge virale et une infection importante des LB dont des LB auto-réactifs. Or, il a été montré que l'EBV pouvait également infecter les cellules endothéliales de la BHM favorisant la transmigration des LB (Casiraghi et al., 2011). Ceux-ci migreraient alors vers leur organe cible (i.e le SNC) pour former des follicules lymphoïdes, et y activeraient ensuite des LT auto-réactifs (Pender, 2012).
4. Enfin, la dernière et quatrième théorie s'est développée essentiellement suite aux travaux d'une équipe australienne. Elle se base sur une dégénérescence initiale des oligodendrocytes (Théorie « Inside out »). En 2004, cette équipe a retrouvé une apoptose extensive des oligodendrocytes mais sans infiltrat lymphocytaire chez des patients décédés d'une SEP agressive (Barnett and Prineas, 2004). Cette apoptose des

oligodendrocytes serait, à l'origine d'une activation globale, secondaire, du système immunitaire (Barnett and Prineas, 2004; Prineas and Parratt, 2012).

Pour chacune de ces théories, des zones d'ombre persistent : ainsi, que ce soit pour les théories « 1 » ou « 2 », la migration au sein du SNC à travers la BHM n'est pas expliquée. Comment ces cellules sont-elles attirées vers le SNC encore intact n'exprimant pas de ligand de chimiokines pro inflammatoires? Enfin, pour la théorie « Inside out », le stimulus à l'origine de l'apoptose oligodendrocytaire reste également inexpliqué.

Suite à nos travaux réalisés sur la régulation dans la SEP, la théorie n°2 nous paraît peu probable. La théorie de M. Pender « 3 » reste particulièrement séduisante car elle est la seule à replacer les LB dans le développement de la maladie, et à relier l'EBV à la physiopathologie de la maladie. Dans le futur, nous prévoyons ainsi, d'orienter une partie de nos travaux sur l'étude de la différenciation des LB des patients atteints de SEP dans un contexte d'infection virale par l'EBV.

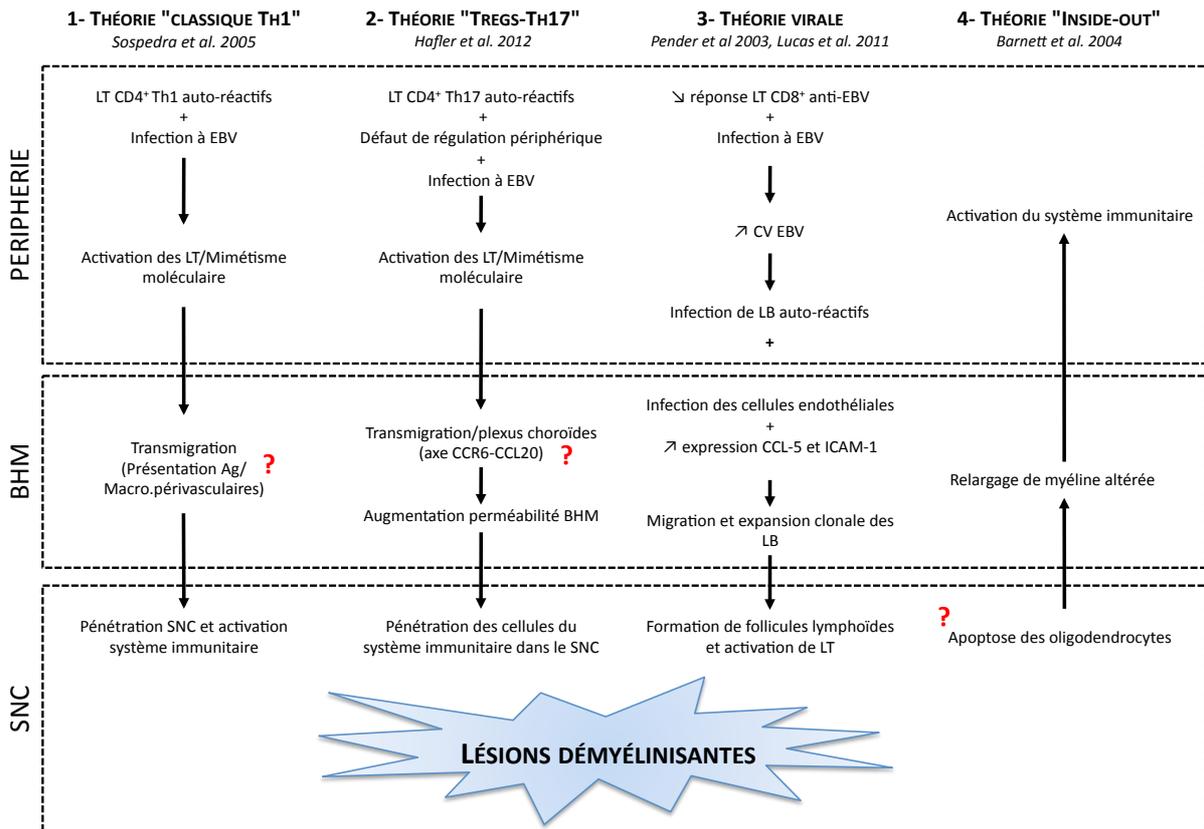


Figure 6 : Hypothèses physiopathologiques sur le développement de la SEP. (1) La première théorie se base sur l'activation de LT CD4⁺ Th1 auto-réactifs (dirigés contre des peptides de la myéline) par mimétisme moléculaire vis à vis d'un virus. (2) La deuxième théorie met en avant l'activation de LT CD4⁺ Th17 auto-réactifs, phénomène renforcé par un défaut de régulation chez les patients. (3) Dans la 3^{ème} hypothèse, c'est un défaut de réponse des LT CD8⁺ anti EBV qui serait à l'origine d'une infection massive des LB, dont des LB auto-réactifs qui migreraient dans le SNC pour former des follicules lymphoïdes et activer des LT auto-réactifs. (4) Enfin, la dernière théorie se base sur une dégénérescence primitive des oligodendrocytes, dont l'apoptose entraînerait une activation de différents composants du système immunitaire.

REFERENCES

- Agematsu, K., Hokibara, S., Nagumo, H., Komiyama, A., 2000. CD27: a memory B-cell marker. *Immunol Today*. 21, 204-6.
- Ahmadzadeh, M., Rosenberg, S.A., 2006. IL-2 administration increases CD4⁺ CD25(hi) Foxp3⁺ regulatory T cells in cancer patients. *Blood*. 107, 2409-14.
- Alferink, J., Tafuri, A., Vestweber, D., Hallmann, R., Hammerling, G.J., Arnold, B., 1998. Control of neonatal tolerance to tissue antigens by peripheral T cell trafficking. *Science*. 282, 1338-41.
- Allan, S.E., Crome, S.Q., Crellin, N.K., Passerini, L., Steiner, T.S., Bacchetta, R., Roncarolo, M.G., Levings, M.K., 2007. Activation-induced FOXP3 in human T effector cells does not suppress proliferation or cytokine production. *Int Immunol*. 19, 345-54.
- Alli, R., Nguyen, P., Geiger, T.L., 2008. Retrogenic modeling of experimental allergic encephalomyelitis associates T cell frequency but not TCR functional affinity with pathogenicity. *J Immunol*. 181, 136-45.
- Alt, F.W., Baltimore, D., 1982. Joining of immunoglobulin heavy chain gene segments: implications from a chromosome with evidence of three D-JH fusions. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 79, 4118-22.
- Alter, M., Leibowitz, U., Speer, J., 1966. Risk of multiple sclerosis related to age at immigration to Israel. *Arch Neurol*. 15, 234-7.
- Anderson, G., Partington, K.M., Jenkinson, E.J., 1998. Differential effects of peptide diversity and stromal cell type in positive and negative selection in the thymus. *J Immunol*. 161, 6599-603.
- Anderson, M.S., Venanzi, E.S., Klein, L., Chen, Z., Berzins, S.P., Turley, S.J., von Boehmer, H., Bronson, R., Dierich, A., Benoist, C., Mathis, D., 2002. Projection of an immunological self shadow within the thymus by the aire protein. *Science*. 298, 1395-401.
- Androdias, G., Reynolds, R., Chanal, M., Ritleng, C., Confavreux, C., Nataf, S., 2010. Meningeal T cells associate with diffuse axonal loss in multiple sclerosis spinal cords. *Ann Neurol*. 68, 465-76.
- Annacker, O., Asseman, C., Read, S., Powrie, F., 2003. Interleukin-10 in the regulation of T cell-induced colitis. *J Autoimmun*. 20, 277-9.
- Annibaldi, V., Ristori, G., Angelini, D.F., Serafini, B., Mechelli, R., Cannoni, S., Romano, S., Paolillo, A., Abderrahim, H., Diamantini, A., Borsellino, G., Aloisi, F., Battistini, L., Salvetti, M., 2011. CD161(high)CD8⁺T cells bear pathogenetic potential in multiple sclerosis. *Brain*. 134, 542-54.
- ANZgene, 2009. Genome-wide association study identifies new multiple sclerosis susceptibility loci on chromosomes 12 and 20. *Nat Genet*. 41, 824-8.
- Aplin, B.D., Keech, C.L., de Kauwe, A.L., Gordon, T.P., Cavill, D., McCluskey, J., 2003. Tolerance through indifference: autoreactive B cells to the nuclear antigen La show no evidence of tolerance in a transgenic model. *J Immunol*. 171, 5890-900.
- Apostolou, I., von Boehmer, H., 2004. In vivo instruction of suppressor commitment in naive T cells. *J Exp Med*. 199, 1401-8.
- Archelos, J.J., Storch, M.K., Hartung, H.P., 2000. The role of B cells and autoantibodies in multiple sclerosis. *Ann Neurol*. 47, 694-706.
- Ardelean, D.S., Gonska, T., Wires, S., Cutz, E., Griffiths, A., Harvey, E., Tse, S.M., Benseler, S.M., 2010. Severe ulcerative colitis after rituximab therapy. *Pediatrics*. 126, e243-6.
- Arstila, T.P., Casrouge, A., Baron, V., Even, J., Kanellopoulos, J., Kourilsky, P., 1999. A direct estimate of the human alphabeta T cell receptor diversity. *Science*. 286, 958-61.
- Asano, M., Toda, M., Sakaguchi, N., Sakaguchi, S., 1996. Autoimmune disease as a consequence of developmental abnormality of a T cell subpopulation. *J Exp Med*. 184, 387-96.
- Aschenbrenner, K., D'Cruz, L.M., Vollmann, E.H., Hinterberger, M., Emmerich, J., Swee, L.K., Rolink, A., Klein, L., 2007. Selection of Foxp3⁺ regulatory T cells specific for self antigen expressed and presented by Aire⁺ medullary thymic epithelial cells. *Nat Immunol*. 8, 351-8.
- Ascherio, A., Munger, K.L., 2010. Epstein-barr virus infection and multiple sclerosis: a review. *J Neuroimmune Pharmacol*. 5, 271-7.
- Ashton-Rickardt, P.G., Bandeira, A., Delaney, J.R., Van Kaer, L., Pircher, H.P., Zinkernagel, R.M., Tonegawa, S., 1994. Evidence for a differential avidity model of T cell selection in the thymus. *Cell*. 76, 651-63.

- Atibalentja, D.F., Byersdorfer, C.A., Unanue, E.R., 2009. Thymus-blood protein interactions are highly effective in negative selection and regulatory T cell induction. *J Immunol.* 183, 7909-18.
- Auer, D.P., Schumann, E.M., Kumpfel, T., Gossel, C., Trenkwalder, C., 2000. Seasonal fluctuations of gadolinium-enhancing magnetic resonance imaging lesions in multiple sclerosis. *Ann Neurol.* 47, 276-7.
- Babbe, H., Roers, A., Waisman, A., Lassmann, H., Goebels, N., Hohlfeld, R., Friese, M., Schroder, R., Deckert, M., Schmidt, S., Ravid, R., Rajewsky, K., 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.
- Baecher-Allan, C., Brown, J.A., Freeman, G.J., Hafler, D.A., 2001. CD4+CD25high regulatory cells in human peripheral blood. *J Immunol.* 167, 1245-53.
- Baecher-Allan, C., Wolf, E., Hafler, D.A., 2006. MHC class II expression identifies functionally distinct human regulatory T cells. *J Immunol.* 176, 4622-31.
- Baecher-Allan, C.M., Costantino, C.M., Cvetanovich, G.L., Ashley, C.W., Beriou, G., Dominguez-Villar, M., Hafler, D.A., 2011. CD2 costimulation reveals defective activity by human CD4+CD25(hi) regulatory cells in patients with multiple sclerosis. *J Immunol.* 186, 3317-26.
- Bahbouhi, B., Berthelot, L., Pettre, S., Michel, L., Wiertlewski, S., Weksler, B., Romero, I.A., Miller, F., Couraud, P.O., Brouard, S., Laplaud, D.A., Soullillou, J.P., 2009. Peripheral blood CD4+ T lymphocytes from multiple sclerosis patients are characterized by higher PSGL-1 expression and transmigration capacity across a human blood-brain barrier-derived endothelial cell line. *J Leukoc Biol.* 86, 1049-63.
- Bahbouhi, B., Pettre, S., Berthelot, L., Garcia, A., Elong Ngono, A., Degauque, N., Michel, L., Wiertlewski, S., Lefrere, F., Meyniel, C., Delcroix, C., Brouard, S., Laplaud, D.A., Soullillou, J.P., 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, 1622-36.
- Banchereau, J., Bazan, F., Blanchard, D., Briere, F., Galizzi, J.P., van Kooten, C., Liu, Y.J., Rousset, F., Saeland, S., 1994. The CD40 antigen and its ligand. *Annu Rev Immunol.* 12, 881-922.
- Baranzini, S.E., Wang, J., Gibson, R.A., Galwey, N., Naegelin, Y., Barkhof, F., Radue, E.W., Lindberg, R.L., Uitdehaag, B.M., Johnson, M.R., Angelakopoulou, A., Hall, L., Richardson, J.C., Prinjha, R.K., Gass, A., Geurts, J.J., Kragt, J., Sombekke, M., Vrenken, H., Qualley, P., Lincoln, R.R., Gomez, R., Caillier, S.J., George, M.F., Mousavi, H., Guerrero, R., Okuda, D.T., Cree, B.A., Green, A.J., Waubant, E., Goodin, D.S., Pelletier, D., Matthews, P.M., Hauser, S.L., Kappos, L., Polman, C.H., Oksenberg, J.R., 2009. Genome-wide association analysis of susceptibility and clinical phenotype in multiple sclerosis. *Hum Mol Genet.* 18, 767-78.
- Barnett, M.H., Prineas, J.W., 2004. Relapsing and remitting multiple sclerosis: pathology of the newly forming lesion. *Ann Neurol.* 55, 458-68.
- Basten, A., Silveira, P.A., 2010. B-cell tolerance: mechanisms and implications. *Curr Opin Immunol.* 22, 566-74.
- Baxter, A.G., 2007. The origin and application of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Nat Rev Immunol.* 7, 904-12.
- Ben-Nun, A., Wekerle, H., Cohen, I.R., 1981. Vaccination against autoimmune encephalomyelitis with T-lymphocyte line cells reactive against myelin basic protein. *Nature.* 292, 60-1.
- Bennett, C.L., Christie, J., Ramsdell, F., Brunkow, M.E., Ferguson, P.J., Whitesell, L., Kelly, T.E., Saulsbury, F.T., Chance, P.F., Ochs, H.D., 2001. The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat Genet.* 27, 20-1.
- Bensinger, S.J., Bandeira, A., Jordan, M.S., Caton, A.J., Laufer, T.M., 2001. Major histocompatibility complex class II-positive cortical epithelium mediates the selection of CD4(+)25(+) immunoregulatory T cells. *J Exp Med.* 194, 427-38.
- Berger, T., Rubner, P., Schautzer, F., Egg, R., Ulmer, H., Mayringer, I., Dilitz, E., Deisenhammer, F., Reindl, M., 2003. Antimyelin antibodies as a predictor of clinically definite multiple sclerosis after a first demyelinating event. *N Engl J Med.* 349, 139-45.

- Beriou, G., Costantino, C.M., Ashley, C.W., Yang, L., Kuchroo, V.K., Baecher-Allan, C., Hafler, D.A., 2009. IL-17-producing human peripheral regulatory T cells retain suppressive function. *Blood*. 113, 4240-9.
- Berthelot, L., Laplaud, D.A., Pettre, S., Ballet, C., Michel, L., Hillion, S., Braudeau, C., Connan, F., Lefrere, F., Wiertelowski, S., Guillet, J.G., Brouard, S., Choppin, J., Souilillou, J.P., 2008. Blood CD8⁺ T cell responses against myelin determinants in multiple sclerosis and healthy individuals. *Eur J Immunol*. 38, 1889-99.
- Bettelli, E., Carrier, Y., Gao, W., Korn, T., Strom, T.B., Oukka, M., Weiner, H.L., Kuchroo, V.K., 2006. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature*. 441, 235-8.
- Beyersdorf, N., Gaupp, S., Balbach, K., Schmidt, J., Toyka, K.V., Lin, C.H., Hanke, T., Hunig, T., Kerkau, T., Gold, R., 2005. Selective targeting of regulatory T cells with CD28 superagonists allows effective therapy of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med*. 202, 445-55.
- Bielekova, B., Howard, T., Packer, A.N., Richert, N., Blevins, G., Ohayon, J., Waldmann, T.A., McFarland, H.F., Martin, R., 2009. Effect of anti-CD25 antibody daclizumab in the inhibition of inflammation and stabilization of disease progression in multiple sclerosis. *Arch Neurol*. 66, 483-9.
- Blair, P.A., Chavez-Rueda, K.A., Evans, J.G., Shlomchik, M.J., Eddaoudi, A., Isenberg, D.A., Ehrenstein, M.R., Mauri, C., 2009. Selective targeting of B cells with agonistic anti-CD40 is an efficacious strategy for the generation of induced regulatory T2-like B cells and for the suppression of lupus in MRL/lpr mice. *J Immunol*. 182, 3492-502.
- Blair, P.A., Norena, L.Y., Flores-Borja, F., Rawlings, D.J., Isenberg, D.A., Ehrenstein, M.R., Mauri, C., 2010. CD19(+)CD24(hi)CD38(hi) B cells exhibit regulatory capacity in healthy individuals but are functionally impaired in systemic Lupus Erythematosus patients. *Immunity*. 32, 129-40.
- Blombery, P., Prince, H.M., Levinson, M., Pianko, S., Maxwell, E., Bhathal, P., 2011. Rituximab-induced immunodysregulatory ileocolitis in a patient with follicular lymphoma. *J Clin Oncol*. 29, e110-2.
- Bo, L., Vedeler, C.A., Nyland, H.I., Trapp, B.D., Mork, S.J., 2003. Subpial demyelination in the cerebral cortex of multiple sclerosis patients. *J Neuropathol Exp Neurol*. 62, 723-32.
- Boehm, T., Scheu, S., Pfeffer, K., Bleul, C.C., 2003. Thymic medullary epithelial cell differentiation, thymocyte emigration, and the control of autoimmunity require lympho-epithelial cross talk via LTbetaR. *J Exp Med*. 198, 757-69.
- Bolland, S., Ravetch, J.V., 2000. Spontaneous autoimmune disease in Fc(gamma)RIIB-deficient mice results from strain-specific epistasis. *Immunity*. 13, 277-85.
- Borsellino, G., Kleinewietfeld, M., Di Mitri, D., Sternjak, A., Diamantini, A., Giometto, R., Hopner, S., Centonze, D., Bernardi, G., Dell'Acqua, M.L., Rossini, P.M., Battistini, L., Rotzschke, O., Falk, K., 2007. Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3⁺ Treg cells: hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression. *Blood*. 110, 1225-32.
- Bouaziz, J.D., Calbo, S., Maho-Vaillant, M., Saussine, A., Bagot, M., Bensussan, A., Musette, P., 2010. IL-10 produced by activated human B cells regulates CD4(+) T-cell activation in vitro. *Eur J Immunol*. 40, 2686-91.
- Bouillet, P., Metcalf, D., Huang, D.C., Tarlinton, D.M., Kay, T.W., Kontgen, F., Adams, J.M., Strasser, A., 1999. Proapoptotic Bcl-2 relative Bim required for certain apoptotic responses, leukocyte homeostasis, and to preclude autoimmunity. *Science*. 286, 1735-8.
- Bouso, P., Bhakta, N.R., Lewis, R.S., Robey, E., 2002. Dynamics of thymocyte-stromal cell interactions visualized by two-photon microscopy. *Science*. 296, 1876-80.
- Brack, C., Hirama, M., Lenhard-Schuller, R., Tonegawa, S., 1978. A complete immunoglobulin gene is created by somatic recombination. *Cell*. 15, 1-14.
- Brandman, O., Liou, J., Park, W.S., Meyer, T., 2007. STIM2 is a feedback regulator that stabilizes basal cytosolic and endoplasmic reticulum Ca²⁺ levels. *Cell*. 131, 1327-39.
- Breij, E.C., Brink, B.P., Veerhuis, R., van den Berg, C., Vloet, R., Yan, R., Dijkstra, C.D., van der Valk, P., Bo, L., 2008. Homogeneity of active demyelinating lesions in established multiple sclerosis. *Ann Neurol*. 63, 16-25.

- Broux, B., Hellings, N., Venken, K., Rummens, J.L., Hensen, K., Van Wijmeersch, B., Stinissen, P., 2010. Haplotype 4 of the multiple sclerosis-associated interleukin-7 receptor alpha gene influences the frequency of recent thymic emigrants. *Genes Immun.* 11, 326-33.
- Brunkow, M.E., Jeffery, E.W., Hjerrild, K.A., Paepfer, B., Clark, L.B., Yasayko, S.A., Wilkinson, J.E., Galas, D., Ziegler, S.F., Ramsdell, F., 2001. Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurf, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat Genet.* 27, 68-73.
- Burchill, M.A., Yang, J., Vang, K.B., Farrar, M.A., 2007. Interleukin-2 receptor signaling in regulatory T cell development and homeostasis. *Immunol Lett.* 114, 1-8.
- Byrne, S.N., Halliday, G.M., 2005. B cells activated in lymph nodes in response to ultraviolet irradiation or by interleukin-10 inhibit dendritic cell induction of immunity. *J Invest Dermatol.* 124, 570-8.
- Cambier, J.C., Gauld, S.B., Merrell, K.T., Vilen, B.J., 2007. B-cell anergy: from transgenic models to naturally occurring anergic B cells? *Nat Rev Immunol.* 7, 633-43.
- Cao, X., Cai, S.F., Fehniger, T.A., Song, J., Collins, L.I., Piwnica-Worms, D.R., Ley, T.J., 2007. Granzyme B and perforin are important for regulatory T cell-mediated suppression of tumor clearance. *Immunity.* 27, 635-46.
- Capone, M., Romagnoli, P., Beermann, F., MacDonald, H.R., van Meerwijk, J.P., 2001. Dissociation of thymic positive and negative selection in transgenic mice expressing major histocompatibility complex class I molecules exclusively on thymic cortical epithelial cells. *Blood.* 97, 1336-42.
- Carsetti, R., Rosado, M.M., Wardmann, H., 2004. Peripheral development of B cells in mouse and man. *Immunol Rev.* 197, 179-91.
- Carter, N.A., Vasconcellos, R., Rosser, E.C., Tulone, C., Munoz-Suano, A., Kamanaka, M., Ehrenstein, M.R., Flavell, R.A., Mauri, C., 2011. Mice lacking endogenous IL-10-producing regulatory B cells develop exacerbated disease and present with an increased frequency of Th1/Th17 but a decrease in regulatory T cells. *J Immunol.* 186, 5569-79.
- Carton, H., Vlietinck, R., Debruyne, J., De Keyser, J., D'Hooghe, M.B., Loos, R., Medaer, R., Truyen, L., Yee, I.M., Sadovnick, A.D., 1997. Risks of multiple sclerosis in relatives of patients in Flanders, Belgium. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 62, 329-33.
- Casiraghi, C., Dorovini-Zis, K., Horwitz, M.S., 2011. Epstein-Barr virus infection of human brain microvessel endothelial cells: a novel role in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 230, 173-7.
- Cederbom, L., Hall, H., Ivars, F., 2000. CD4+CD25+ regulatory T cells down-regulate co-stimulatory molecules on antigen-presenting cells. *Eur J Immunol.* 30, 1538-43.
- Chappert, P., Schwartz, R.H., 2010. Induction of T cell anergy: integration of environmental cues and infectious tolerance. *Curr Opin Immunol.* 22, 552-9.
- Chen, W., Jin, W., Hardegen, N., Lei, K.J., Li, L., Marinos, N., McGrady, G., Wahl, S.M., 2003. Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med.* 198, 1875-86.
- Chen, X., Oppenheim, J.J., Winkler-Pickett, R.T., Ortaldo, J.R., Howard, O.M., 2006. Glucocorticoid amplifies IL-2-dependent expansion of functional FoxP3(+)/CD4(+)/CD25(+) T regulatory cells in vivo and enhances their capacity to suppress EAE. *Eur J Immunol.* 36, 2139-49.
- Chou, Y.K., Bourdette, D.N., Offner, H., Whitham, R., Wang, R.Y., Hashim, G.A., Vandenbark, A.A., 1992. Frequency of T cells specific for myelin basic protein and myelin proteolipid protein in blood and cerebrospinal fluid in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 38, 105-13.
- Codarri, L., Vallotton, L., Ciuffreda, D., Venetz, J.P., Garcia, M., Hadaya, K., Buhler, L., Rotman, S., Pascual, M., Pantaleo, G., 2007. Expansion and tissue infiltration of an allospecific CD4+CD25+CD45RO+IL-7Ralphahigh cell population in solid organ transplant recipients. *J Exp Med.* 204, 1533-41.
- Cohen, J.A., Barkhof, F., Comi, G., Hartung, H.P., Khatri, B.O., Montalban, X., Pelletier, J., Capra, R., Gallo, P., Izquierdo, G., Tiel-Wilck, K., de Vera, A., Jin, J., Stites, T., Wu, S., Aradhye, S., Kappos, L., 2010. Oral fingolimod or intramuscular interferon for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med.* 362, 402-15.

- Coles, A.J., Compston, D.A., Selmaj, K.W., Lake, S.L., Moran, S., Margolin, D.H., Norris, K., Tandon, P.K., 2008. Alemtuzumab vs. interferon beta-1a in early multiple sclerosis. *N Engl J Med.* 359, 1786-801.
- Collison, L.W., Workman, C.J., Kuo, T.T., Boyd, K., Wang, Y., Vignali, K.M., Cross, R., Sehy, D., Blumberg, R.S., Vignali, D.A., 2007. The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature.* 450, 566-9.
- Comi, G., Filippi, M., Barkhof, F., Durelli, L., Edan, G., Fernandez, O., Hartung, H., Seeldrayers, P., Sorensen, P.S., Rovaris, M., Martinelli, V., Hommes, O.R., 2001. Effect of early interferon treatment on conversion to definite multiple sclerosis: a randomised study. *Lancet.* 357, 1576-82.
- Comi, G., Pulizzi, A., Rovaris, M., Abramsky, O., Arbizu, T., Boiko, A., Gold, R., Havrdova, E., Komoly, S., Selmaj, K., Sharrack, B., Filippi, M., 2008. Effect of laquinimod on MRI-monitored disease activity in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis: a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled phase IIb study. *Lancet.* 371, 2085-92.
- Comi, G., Martinelli, V., Rodegher, M., Moiola, L., Bajenaru, O., Carra, A., Elovaara, I., Fazekas, F., Hartung, H.P., Hillert, J., King, J., Komoly, S., Lubetzki, C., Montalban, X., Myhr, K.M., Ravnborg, M., Rieckmann, P., Wynn, D., Young, C., Filippi, M., 2009. Effect of glatiramer acetate on conversion to clinically definite multiple sclerosis in patients with clinically isolated syndrome (PreCISe study): a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet.* 374, 1503-11.
- Compston, A., 1990. Risk factors for multiple sclerosis: race or place? *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 53, 821-3.
- Confavreux, C., Vukusic, S., Moreau, T., Adeleine, P., 2000. Relapses and progression of disability in multiple sclerosis. *N Engl J Med.* 343, 1430-8.
- consortium, F.-G.A., 1997. An autoimmune disease, APECED, caused by mutations in a novel gene featuring two PHD-type zinc-finger domains. *Nat Genet.* 17, 399-403.
- Correale, J., Farez, M., 2007. Association between parasite infection and immune responses in multiple sclerosis. *Ann Neurol.* 61, 97-108.
- Correale, J., Farez, M., Razzitte, G., 2008. Helminth infections associated with multiple sclerosis induce regulatory B cells. *Ann Neurol.* 64, 187-99.
- de Andres, C., Aristimuno, C., de Las Heras, V., Martinez-Gines, M.L., Bartolome, M., Arroyo, R., Navarro, J., Gimenez-Roldan, S., Fernandez-Cruz, E., Sanchez-Ramon, S., 2007. Interferon beta-1a therapy enhances CD4+ regulatory T-cell function: an ex vivo and in vitro longitudinal study in relapsing-remitting multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 182, 204-11.
- 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., Yelensky, R., Price, A., Leppa, V., Patterson, N., de Bakker, P.I., Tran, D., Aubin, C., Pobywajlo, S., Rossin, E., Hu, X., Ashley, C.W., Choy, E., Rioux, J.D., Pericak-Vance, M.A., Ivinson, A., Booth, D.R., Stewart, G.J., Palotie, A., Peltonen, L., Dubois, B., Haines, J.L., Weiner, H.L., Compston, A., Hauser, S.L., Daly, M.J., Reich, D., Oksenberg, J.R., Hafler, D.A., 2009. The role of the CD58 locus in multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106, 5264-9.
- Derbinski, J., Schulte, A., Kyewski, B., Klein, L., 2001. Promiscuous gene expression in medullary thymic epithelial cells mirrors the peripheral self. *Nat Immunol.* 2, 1032-9.
- DeSilva, D.R., Urdahl, K.B., Jenkins, M.K., 1991. Clonal anergy is induced in vitro by T cell receptor occupancy in the absence of proliferation. *J Immunol.* 147, 3261-7.
- Dhodapkar, M.V., Steinman, R.M., Krasovskiy, J., Munz, C., Bhardwaj, N., 2001. Antigen-specific inhibition of effector T cell function in humans after injection of immature dendritic cells. *J Exp Med.* 193, 233-8.
- Dhodapkar, M.V., Steinman, R.M., 2002. Antigen-bearing immature dendritic cells induce peptide-specific CD8(+) regulatory T cells in vivo in humans. *Blood.* 100, 174-7.
- Dieckmann, D., Plottner, H., Berchtold, S., Berger, T., Schuler, G., 2001. Ex vivo isolation and characterization of CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties from human blood. *J Exp Med.* 193, 1303-10.

- DiLillo, D.J., Matsushita, T., Tedder, T.F., 2010. B10 cells and regulatory B cells balance immune responses during inflammation, autoimmunity, and cancer. *Ann N Y Acad Sci.* 1183, 38-57.
- Ding, Q., Lu, L., Wang, B., Zhou, Y., Jiang, Y., Zhou, X., Xin, L., Jiao, Z., Chou, K.Y., 2006. B7H1-Ig fusion protein activates the CD4⁺ IFN-gamma receptor⁺ type 1 T regulatory subset through IFN-gamma-secreting Th1 cells. *J Immunol.* 177, 3606-14.
- Ding, Q., Yeung, M., Camirand, G., Zeng, Q., Akiba, H., Yagita, H., Chalasani, G., Sayegh, M.H., Najafian, N., Rothstein, D.M., 2011. Regulatory B cells are identified by expression of TIM-1 and can be induced through TIM-1 ligation to promote tolerance in mice. *J Clin Invest.* 121, 3645-56.
- Dominguez-Villar, M., Baecher-Allan, C.M., Hafler, D.A., 2011. Identification of T helper type 1-like, Foxp3⁺ regulatory T cells in human autoimmune disease. *Nat Med.* 17, 673-5.
- Duddy, M., Niino, M., Adatia, F., Hebert, S., Freedman, M., Atkins, H., Kim, H.J., Bar-Or, A., 2007. Distinct effector cytokine profiles of memory and naive human B cell subsets and implication in multiple sclerosis. *J Immunol.* 178, 6092-9.
- Duddy, M.E., Alter, A., Bar-Or, A., 2004. Distinct profiles of human B cell effector cytokines: a role in immune regulation? *J Immunol.* 172, 3422-7.
- Durelli, L., Conti, L., Clerico, M., Boselli, D., Contessa, G., Ripellino, P., Ferrero, B., Eid, P., Novelli, F., 2009. T-helper 17 cells expand in multiple sclerosis and are inhibited by interferon-beta. *Ann Neurol.* 65, 499-509.
- Dwyer, K.M., Deaglio, S., Gao, W., Friedman, D., Strom, T.B., Robson, S.C., 2007. CD39 and control of cellular immune responses. *Purinergic Signal.* 3, 171-80.
- Ebers, G.C., Sadovnick, A.D., Risch, N.J., 1995. A genetic basis for familial aggregation in multiple sclerosis. Canadian Collaborative Study Group. *Nature.* 377, 150-1.
- Ebers, G.C., Yee, I.M., Sadovnick, A.D., Duquette, P., 2000. Conjugal multiple sclerosis: population-based prevalence and recurrence risks in offspring. Canadian Collaborative Study Group. *Ann Neurol.* 48, 927-31.
- Edan, G., Miller, D., Clanet, M., Confavreux, C., Lyon-Caen, O., Lubetzki, C., Brochet, B., Berry, I., Rolland, Y., Froment, J.C., Cabanis, E., Iba-Zizen, M.T., Gandon, J.M., Lai, H.M., Moseley, I., Sabouraud, O., 1997. Therapeutic effect of mitoxantrone combined with methylprednisolone in multiple sclerosis: a randomised multicentre study of active disease using MRI and clinical criteria. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 62, 112-8.
- Egerton, M., Scollay, R., Shortman, K., 1990. Kinetics of mature T-cell development in the thymus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 87, 2579-82.
- El Fassi, D., Nielsen, C.H., Kjeldsen, J., Clemmensen, O., Hegedus, L., 2008. Ulcerative colitis following B lymphocyte depletion with rituximab in a patient with Graves' disease. *Gut.* 57, 714-5.
- Elliott, C., Lindner, M., Arthur, A., Brennan, K., Jarius, S., Hussey, J., Chan, A., Stroet, A., Olsson, T., Willison, H., Barnett, S.C., Meinl, E., Linington, C., 2012. Functional identification of pathogenic autoantibody responses in patients with multiple sclerosis. *Brain.* 135, 1819-33.
- Elong Ngono A., P.S., Salou M., Bahbouhi B., Soullillou J-P., Brouard S., Laplaud D-A., 2012. Frequency of circulating autoreactive T cells committed to myelin determinants in relapsing-remitting Multiple Sclerosis patients. *Clin Immunol.*
- Embry, A.F., Snowdon, L.R., Vieth, R., 2000. Vitamin D and seasonal fluctuations of gadolinium-enhancing magnetic resonance imaging lesions in multiple sclerosis. *Ann Neurol.* 48, 271-2.
- Enders, A., Bouillet, P., Puthalakath, H., Xu, Y., Tarlinton, D.M., Strasser, A., 2003. Loss of the proapoptotic BH3-only Bcl-2 family member Bim inhibits BCR stimulation-induced apoptosis and deletion of autoreactive B cells. *J Exp Med.* 198, 1119-26.
- Erhardt, A., Biburger, M., Papadopoulos, T., Tiegs, G., 2007. IL-10, regulatory T cells, and Kupffer cells mediate tolerance in concanavalin A-induced liver injury in mice. *Hepatology.* 45, 475-85.
- Evans, J.G., Chavez-Rueda, K.A., Eddaoudi, A., Meyer-Bahlburg, A., Rawlings, D.J., Ehrenstein, M.R., Mauri, C., 2007. Novel suppressive function of transitional 2 B cells in experimental arthritis. *J Immunol.* 178, 7868-78.
- Ezzelarab, M., Thomson, A.W., 2011. Tolerogenic dendritic cells and their role in transplantation. *Semin Immunol.* 23, 252-63.

- Fahlen, L., Read, S., Gorelik, L., Hurst, S.D., Coffman, R.L., Flavell, R.A., Powrie, F., 2005. T cells that cannot respond to TGF-beta escape control by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells. *J Exp Med.* 201, 737-46.
- Fallarino, F., Grohmann, U., Hwang, K.W., Orabona, C., Vacca, C., Bianchi, R., Belladonna, M.L., Fioretti, M.C., Alegre, M.L., Puccetti, P., 2003. Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells. *Nat Immunol.* 4, 1206-12.
- Feger, U., Luther, C., Poeschel, S., Melms, A., Tolosa, E., Wiendl, H., 2007. Increased frequency of CD4+ CD25+ regulatory T cells in the cerebrospinal fluid but not in the blood of multiple sclerosis patients. *Clin Exp Immunol.* 147, 412-8.
- Fernandez-Martin, A., Gonzalez-Rey, E., Chorny, A., Ganea, D., Delgado, M., 2006. Vasoactive intestinal peptide induces regulatory T cells during experimental autoimmune encephalomyelitis. *Eur J Immunol.* 36, 318-26.
- Feske, S., 2007. Calcium signalling in lymphocyte activation and disease. *Nat Rev Immunol.* 7, 690-702.
- Fillatreau, S., Sweeney, C.H., McGeachy, M.J., Gray, D., Anderton, S.M., 2002. B cells regulate autoimmunity by provision of IL-10. *Nat Immunol.* 3, 944-50.
- Fisher, G.H., Rosenberg, F.J., Straus, S.E., Dale, J.K., Middleton, L.A., Lin, A.Y., Strober, W., Lenardo, M.J., Puck, J.M., 1995. Dominant interfering Fas gene mutations impair apoptosis in a human autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Cell.* 81, 935-46.
- Floess, S., Freyer, J., Siewert, C., Baron, U., Olek, S., Polansky, J., Schlawe, K., Chang, H.D., Bopp, T., Schmitt, E., Klein-Hessling, S., Serfling, E., Hamann, A., Huehn, J., 2007. Epigenetic control of the foxp3 locus in regulatory T cells. *PLoS Biol.* 5, e38.
- Fontenot, J.D., Gavin, M.A., Rudensky, A.Y., 2003. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol.* 4, 330-6.
- Fontenot, J.D., Dooley, J.L., Farr, A.G., Rudensky, A.Y., 2005. Developmental regulation of Foxp3 expression during ontogeny. *J Exp Med.* 202, 901-6.
- Ford, M.L., Evavold, B.D., 2005. Specificity, magnitude, and kinetics of MOG-specific CD8+ T cell responses during experimental autoimmune encephalomyelitis. *Eur J Immunol.* 35, 76-85.
- Franciotta, D., Salvetti, M., Lolli, F., Serafini, B., Aloisi, F., 2008. B cells and multiple sclerosis. *Lancet Neurol.* 7, 852-8.
- Frazer, K.A., Ballinger, D.G., Cox, D.R., Hinds, D.A., Stuve, L.L., Gibbs, R.A., Belmont, J.W., Boudreau, A., Hardenbol, P., Leal, S.M., Pasternak, S., Wheeler, D.A., Willis, T.D., Yu, F., Yang, H., Zeng, C., Gao, Y., Hu, H., Hu, W., Li, C., Lin, W., Liu, S., Pan, H., Tang, X., Wang, J., Wang, W., Yu, J., Zhang, B., Zhang, Q., Zhao, H., Zhou, J., Gabriel, S.B., Barry, R., Blumenstiel, B., Camargo, A., Defelice, M., Faggart, M., Goyette, M., Gupta, S., Moore, J., Nguyen, H., Onofrio, R.C., Parkin, M., Roy, J., Stahl, E., Winchester, E., Ziaugra, L., Altshuler, D., Shen, Y., Yao, Z., Huang, W., Chu, X., He, Y., Jin, L., Liu, Y., Sun, W., Wang, H., Wang, Y., Xiong, X., Xu, L., Wayne, M.M., Tsui, S.K., Xue, H., Wong, J.T., Galver, L.M., Fan, J.B., Gunderson, K., Murray, S.S., Oliphant, A.R., Chee, M.S., Montpetit, A., Chagnon, F., Ferretti, V., Leboeuf, M., Olivier, J.F., Phillips, M.S., Roumy, S., Sallee, C., Verner, A., Hudson, T.J., Kwok, P.Y., Cai, D., Koboldt, D.C., Miller, R.D., Pawlikowska, L., Taillon-Miller, P., Xiao, M., Tsui, L.C., Mak, W., Song, Y.Q., Tam, P.K., Nakamura, Y., Kawaguchi, T., Kitamoto, T., Morizono, T., Nagashima, A., Ohnishi, Y., Sekine, A., Tanaka, T., Tsunoda, T., Deloukas, P., Bird, C.P., Delgado, M., Dermitzakis, E.T., Gwilliam, R., Hunt, S., Morrison, J., Powell, D., Stranger, B.E., Whittaker, P., Bentley, D.R., Daly, M.J., de Bakker, P.I., Barrett, J., Chretien, Y.R., Maller, J., McCarroll, S., Patterson, N., Pe'er, I., Price, A., Purcell, S., Richter, D.J., Sabeti, P., Saxena, R., Schaffner, S.F., Sham, P.C., Varilly, P., Stein, L.D., Krishnan, L., Smith, A.V., Tello-Ruiz, M.K., Thorisson, G.A., Chakravarti, A., Chen, P.E., Cutler, D.J., Kashuk, C.S., Lin, S., Abecasis, G.R., Guan, W., Li, Y., Munro, H.M., Qin, Z.S., Thomas, D.J., McVean, G., Auton, A., Bottolo, L., Cardin, N., Eyheramendy, S., Freeman, C., Marchini, J., Myers, S., Spencer, C., Stephens, M., Donnelly, P., Cardon, L.R., Clarke, G., Evans, D.M., Morris, A.P., Weir, B.S., Mullikin, J.C., Sherry, S.T., Feolo, M., Skol, A., Zhang, H., Matsuda, I., Fukushima, Y., Macer, D.R., Suda, E., Rotimi, C.N., Adebamowo, C.A., Ajayi, I., Aniagwu, T., Marshall, P.A., Nkwodimmah, C., Royal, C.D., Leppert, M.F., Dixon, M., Peiffer, A., Qiu, R., Kent, A., Kato, K., Niikawa, N., Adewole, I.F.,

- Knoppers, B.M., Foster, M.W., Clayton, E.W., Watkin, J., Muzny, D., Nazareth, L., Sodergren, E., Weinstock, G.M., Yakub, I., Birren, B.W., Wilson, R.K., Fulton, L.L., Rogers, J., Burton, J., Carter, N.P., Clee, C.M., Griffiths, M., Jones, M.C., McLay, K., Plumb, R.W., Ross, M.T., Sims, S.K., Willey, D.L., Chen, Z., Han, H., Kang, L., Godbout, M., Wallenburg, J.C., L'Archeveque, P., Bellemare, G., Saeki, K., An, D., Fu, H., Li, Q., Wang, Z., Wang, R., Holden, A.L., Brooks, L.D., McEwen, J.E., Guyer, M.S., Wang, V.O., Peterson, J.L., Shi, M., Spiegel, J., Sung, L.M., Zacharia, L.F., Collins, F.S., Kennedy, K., Jamieson, R., Stewart, J., 2007. A second generation human haplotype map of over 3.1 million SNPs. *Nature*. 449, 851-61.
- Freedman, M.S., Thompson, E.J., Deisenhammer, F., Giovannoni, G., Grimsley, G., Keir, G., Ohman, S., Racke, M.K., Sharief, M., Sindic, C.J., Sellebjerg, F., Tourtellotte, W.W., 2005. Recommended standard of cerebrospinal fluid analysis in the diagnosis of multiple sclerosis: a consensus statement. *Arch Neurol*. 62, 865-70.
- Frischer, J.M., Bramow, S., Dal-Bianco, A., Lucchinetti, C.F., Rauschka, H., Schmidbauer, M., Laursen, H., Sorensen, P.S., Lassmann, H., 2009. The relation between inflammation and neurodegeneration in multiple sclerosis brains. *Brain*. 132, 1175-89.
- Fritzsching, B., Haas, J., Konig, F., Kunz, P., Fritzsching, E., Poschl, J., Krammer, P.H., Bruck, W., Suri-Payer, E., 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.
- Frommer, F., Heinen, T.J., Wunderlich, F.T., Yogev, N., Buch, T., Roers, A., Bettelli, E., Muller, W., Anderton, S.M., Waisman, A., 2008. Tolerance without clonal expansion: self-antigen-expressing B cells program self-reactive T cells for future deletion. *J Immunol*. 181, 5748-59.
- Fromont, A., Biquet, C., Sauleau, E.A., Fournel, I., Bellisario, A., Adnet, J., Weill, A., Vukusic, S., Confavreux, C., Debouverie, M., Clerc, L., Bonithon-Kopp, C., Moreau, T., 2010. Geographic variations of multiple sclerosis in France. *Brain*. 133, 1889-99.
- Fu, F., Li, Y., Qian, S., Lu, L., Chambers, F., Starzl, T.E., Fung, J.J., Thomson, A.W., 1996. Costimulatory molecule-deficient dendritic cell progenitors (MHC class II+, CD80dim, CD86-) prolong cardiac allograft survival in nonimmunosuppressed recipients. *Transplantation*. 62, 659-65.
- Fugger, L., Friese, M.A., Bell, J.I., 2009. From genes to function: the next challenge to understanding multiple sclerosis. *Nat Rev Immunol*. 9, 408-17.
- Gallegos, A.M., Bevan, M.J., 2004. Central tolerance to tissue-specific antigens mediated by direct and indirect antigen presentation. *J Exp Med*. 200, 1039-49.
- Gartner, D., Hoff, H., Gimsa, U., Burmester, G.R., Brunner-Weinzierl, M.C., 2006. CD25 regulatory T cells determine secondary but not primary remission in EAE: impact on long-term disease progression. *J Neuroimmunol*. 172, 73-84.
- Gavin, M.A., Torgerson, T.R., Houston, E., DeRoos, P., Ho, W.Y., Stray-Pedersen, A., Ocheltree, E.L., Greenberg, P.D., Ochs, H.D., Rudensky, A.Y., 2006. Single-cell analysis of normal and FOXP3-mutant human T cells: FOXP3 expression without regulatory T cell development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 103, 6659-64.
- Gay, D., Saunders, T., Camper, S., Weigert, M., 1993. Receptor editing: an approach by autoreactive B cells to escape tolerance. *J Exp Med*. 177, 999-1008.
- Getnet, D., Grosso, J.F., Goldberg, M.V., Harris, T.J., Yen, H.R., Bruno, T.C., Durham, N.M., Hipkiss, E.L., Pyle, K.J., Wada, S., Pan, F., Pardoll, D.M., Drake, C.G., 2010. A role for the transcription factor Helios in human CD4(+)CD25(+) regulatory T cells. *Mol Immunol*. 47, 1595-600.
- Ghadirian, P., Jain, M., Ducic, S., Shatenstein, B., Morisset, R., 1998. Nutritional factors in the aetiology of multiple sclerosis: a case-control study in Montreal, Canada. *Int J Epidemiol*. 27, 845-52.
- Giedlin, M.A., Zimmerman, R.J., 1993. The use of recombinant human interleukin-2 in treating infectious diseases. *Curr Opin Biotechnol*. 4, 722-6.
- Gijbels, K., Brocke, S., Abrams, J.S., Steinman, L., 1995. Administration of neutralizing antibodies to interleukin-6 (IL-6) reduces experimental autoimmune encephalomyelitis and is associated

- with elevated levels of IL-6 bioactivity in central nervous system and circulation. *Mol Med.* 1, 795-805.
- Giovannoni, G., Comi, G., Cook, S., Rammohan, K., Rieckmann, P., Soelberg Sorensen, P., Vermersch, P., Chang, P., Hamlett, A., Musch, B., Greenberg, S.J., 2010. A placebo-controlled trial of oral cladribine for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med.* 362, 416-26.
- Gobin, S.J., Montagne, L., Van Zutphen, M., Van Der Valk, P., Van Den Elsen, P.J., De Groot, C.J., 2001. Upregulation of transcription factors controlling MHC expression in multiple sclerosis lesions. *Glia.* 36, 68-77.
- Goetz, M., Atreya, R., Ghalibafian, M., Galle, P.R., Neurath, M.F., 2007. Exacerbation of ulcerative colitis after rituximab salvage therapy. *Inflamm Bowel Dis.* 13, 1365-8.
- Gondek, D.C., Lu, L.F., Quezada, S.A., Sakaguchi, S., Noelle, R.J., 2005. Cutting edge: contact-mediated suppression by CD4+CD25+ regulatory cells involves a granzyme B-dependent, perforin-independent mechanism. *J Immunol.* 174, 1783-6.
- Goodnow, C.C., Crosbie, J., Adelstein, S., Lavoie, T.B., Smith-Gill, S.J., Brink, R.A., Pritchard-Briscoe, H., Wotherspoon, J.S., Loblay, R.H., Raphael, K., et al., 1988. Altered immunoglobulin expression and functional silencing of self-reactive B lymphocytes in transgenic mice. *Nature.* 334, 676-82.
- Gotot, J., Gottschalk, C., Leopold, S., Knolle, P.A., Yagita, H., Kurts, C., Ludwig-Portugall, I., 2012. Regulatory T cells use programmed death 1 ligands to directly suppress autoreactive B cells in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 109, 10468-73.
- Gotter, J., Brors, B., Hergenahn, M., 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, 155-66.
- Grallert, B., Boye, E., 2007. The *Gen2* kinase as a cell cycle regulator. *Cell Cycle.* 6, 2768-72.
- Grossman, W.J., Verbsky, J.W., Barchet, W., Colonna, M., Atkinson, J.P., Ley, T.J., 2004. Human T regulatory cells can use the perforin pathway to cause autologous target cell death. *Immunity.* 21, 589-601.
- Haas, J., Hug, A., Viehover, A., Fritzsching, B., Falk, C.S., Filser, A., Vetter, T., Milkova, L., Korporal, M., Fritz, B., Storch-Hagenlocher, B., Krammer, P.H., Suri-Payer, E., Wildemann, B., 2005. Reduced suppressive effect of CD4+CD25high regulatory T cells on the T cell immune response against myelin oligodendrocyte glycoprotein in patients with multiple sclerosis. *Eur J Immunol.* 35, 3343-52.
- Haas, J., Fritzsching, B., Trubswetter, P., Korporal, M., Milkova, L., Fritz, B., Vobis, D., Krammer, P.H., Suri-Payer, E., Wildemann, B., 2007. Prevalence of newly generated naive regulatory T cells (Treg) is critical for Treg suppressive function and determines Treg dysfunction in multiple sclerosis. *J Immunol.* 179, 1322-30.
- Haas, J., Korporal, M., Balint, B., Fritzsching, B., Schwarz, A., Wildemann, B., 2009. Glatiramer acetate improves regulatory T-cell function by expansion of naive CD4(+)CD25(+)FOXP3(+)CD31(+) T-cells in patients with multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 216, 113-7.
- Hafler, D.A., Compston, A., Sawcer, S., Lander, E.S., Daly, M.J., De Jager, P.L., de Bakker, P.I., Gabriel, S.B., Mirel, D.B., Ivinson, A.J., Pericak-Vance, M.A., Gregory, S.G., Rioux, J.D., McCauley, J.L., Haines, J.L., Barcellos, L.F., Cree, B., Oksenberg, J.R., Hauser, S.L., 2007. Risk alleles for multiple sclerosis identified by a genomewide study. *N Engl J Med.* 357, 851-62.
- Haines, J.L., Terwedow, H.A., Burgess, K., Pericak-Vance, M.A., Rimmler, J.B., Martin, E.R., Oksenberg, J.R., Lincoln, R., Zhang, D.Y., Banatao, D.R., Gatto, N., Goodkin, D.E., Hauser, S.L., 1998. Linkage of the MHC to familial multiple sclerosis suggests genetic heterogeneity. The Multiple Sclerosis Genetics Group. *Hum Mol Genet.* 7, 1229-34.
- Halverson, R., Torres, R.M., Pelanda, R., 2004. Receptor editing is the main mechanism of B cell tolerance toward membrane antigens. *Nat Immunol.* 5, 645-50.
- Hammond, S.R., English, D.R., McLeod, J.G., 2000. The age-range of risk of developing multiple sclerosis: evidence from a migrant population in Australia. *Brain.* 123 (Pt 5), 968-74.
- Hanabuchi, S., Ito, T., Park, W.R., Watanabe, N., Shaw, J.L., Roman, E., Arima, K., Wang, Y.H., Voo, K.S., Cao, W., Liu, Y.J., 2010. Thymic stromal lymphopoietin-activated plasmacytoid

- dendritic cells induce the generation of FOXP3⁺ regulatory T cells in human thymus. *J Immunol.* 184, 2999-3007.
- Hannum, L.G., Ni, D., Haberman, A.M., Weigert, M.G., Shlomchik, M.J., 1996. A disease-related rheumatoid factor autoantibody is not tolerized in a normal mouse: implications for the origins of autoantibodies in autoimmune disease. *J Exp Med.* 184, 1269-78.
- Harding, F.A., McArthur, J.G., Gross, J.A., Raulet, D.H., Allison, J.P., 1992. CD28-mediated signalling co-stimulates murine T cells and prevents induction of anergy in T-cell clones. *Nature.* 356, 607-9.
- 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., Racke, M.K., Cowell, L.G., Karandikar, N.J., Frohman, E.M., Monson, N.L., 2010. Memory B cells from a subset of treatment-naive relapsing-remitting multiple sclerosis patients elicit CD4(+) T-cell proliferation and IFN-gamma production in response to myelin basic protein and myelin oligodendrocyte glycoprotein. *Eur J Immunol.* 40, 2942-56.
- Hauser, S.L., Bhan, A.K., Gilles, F., Kemp, M., Kerr, C., Weiner, H.L., 1986. Immunohistochemical analysis of the cellular infiltrate in multiple sclerosis lesions. *Ann Neurol.* 19, 578-87.
- Hauser, S.L., Waubant, E., Arnold, D.L., Vollmer, T., Antel, J., Fox, R.J., Bar-Or, A., Panzara, M., Sarkar, N., Agarwal, S., Langer-Gould, A., Smith, C.H., 2008. B-cell depletion with rituximab in relapsing-remitting multiple sclerosis. *N Engl J Med.* 358, 676-88.
- Hawkes, C.H., 2007. Smoking is a risk factor for multiple sclerosis: a meta-analysis. *Mult Scler.* 13, 610-5.
- Hawrylowicz, C.M., 2005. Regulatory T cells and IL-10 in allergic inflammation. *J Exp Med.* 202, 1459-63.
- Hayashi, T., Morimoto, C., Burks, J.S., Kerr, C., Hauser, S.L., 1988. Dual-label immunocytochemistry of the active multiple sclerosis lesion: major histocompatibility complex and activation antigens. *Ann Neurol.* 24, 523-31.
- Hayes, C.E., Donald Acheson, E., 2008. A unifying multiple sclerosis etiology linking virus infection, sunlight, and vitamin D, through viral interleukin-10. *Med Hypotheses.* 71, 85-90.
- Hedstrom, A.K., Baarnhielm, M., Olsson, T., Alfredsson, L., 2009. Tobacco smoking, but not Swedish snuff use, increases the risk of multiple sclerosis. *Neurology.* 73, 696-701.
- Heidt, S., Hester, J., Shankar, S., Friend, P.J., Wood, K.J., 2012. B cell repopulation after alemtuzumab induction-transient increase in transitional B cells and long-term dominance of naive B cells. *Am J Transplant.* 12, 1784-92.
- Hellings, N., Barea, M., Verhoeven, C., D'Hooghe M, B., Medaer, R., Bernard, C.C., Raus, J., Stinissen, P., 2001. T-cell reactivity to multiple myelin antigens in multiple sclerosis patients and healthy controls. *J Neurosci Res.* 63, 290-302.
- Hemminki, K., Li, X., Sundquist, J., Hillert, J., Sundquist, K., 2009. Risk for multiple sclerosis in relatives and spouses of patients diagnosed with autoimmune and related conditions. *Neurogenetics.* 10, 5-11.
- Hernan, M.A., Olek, M.J., Ascherio, A., 2001. Cigarette smoking and incidence of multiple sclerosis. *Am J Epidemiol.* 154, 69-74.
- Hill, J.A., Feuerer, M., Tash, K., Haxhinasto, S., Perez, J., Melamed, R., Mathis, D., Benoist, C., 2007. Foxp3 transcription-factor-dependent and -independent regulation of the regulatory T cell transcriptional signature. *Immunity.* 27, 786-800.
- Hogquist, K.A., Bevan, M.J., 1996. The nature of the peptide/MHC ligand involved in positive selection. *Semin Immunol.* 8, 63-8.
- Hohlfeld, R., Wekerle, H., 2004. Autoimmune concepts of multiple sclerosis as a basis for selective immunotherapy: from pipe dreams to (therapeutic) pipelines. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101 Suppl 2, 14599-606.
- Hong, J., Li, N., Zhang, X., Zheng, B., Zhang, J.Z., 2005. Induction of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells by copolymer-I through activation of transcription factor Foxp3. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102, 6449-54.
- Horak, I., 1995. Immunodeficiency in IL-2-knockout mice. *Clin Immunol Immunopathol.* 76, S172-3.

- Hori, S., Haury, M., Coutinho, A., Demengeot, J., 2002. Specificity requirements for selection and effector functions of CD25+4+ regulatory T cells in anti-myelin basic protein T cell receptor transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99, 8213-8.
- Hori, S., Nomura, T., Sakaguchi, S., 2003. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science.* 299, 1057-61.
- Houot, R., Perrot, I., Garcia, E., Durand, I., Lebecque, S., 2006. Human CD4+CD25high regulatory T cells modulate myeloid but not plasmacytoid dendritic cells activation. *J Immunol.* 176, 5293-8.
- Howell, O.W., Reeves, C.A., Nicholas, R., Carassiti, D., Radotra, B., Gentleman, S.M., Serafini, B., Aloisi, F., Roncaroli, F., Magliozzi, R., Reynolds, R., 2011. Meningeal inflammation is widespread and linked to cortical pathology in multiple sclerosis. *Brain.* 134, 2755-71.
- Hsieh, C.S., Liang, Y., Tyznik, A.J., Self, S.G., Liggitt, D., Rudensky, A.Y., 2004. Recognition of the peripheral self by naturally arising CD25+ CD4+ T cell receptors. *Immunity.* 21, 267-77.
- Hu, C.Y., Rodriguez-Pinto, D., Du, W., Ahuja, A., Henegariu, O., Wong, F.S., Shlomchik, M.J., Wen, L., 2007. Treatment with CD20-specific antibody prevents and reverses autoimmune diabetes in mice. *J Clin Invest.* 117, 3857-67.
- Huang, C.T., Workman, C.J., Flies, D., Pan, X., Marson, A.L., Zhou, G., Hipkiss, E.L., Ravi, S., Kowalski, J., Levitsky, H.I., Powell, J.D., Pardoll, D.M., Drake, C.G., Vignali, D.A., 2004. Role of LAG-3 in regulatory T cells. *Immunity.* 21, 503-13.
- Huseby, E.S., Liggitt, D., Brabb, T., Schnabel, B., Ohlen, C., Goverman, J., 2001. A pathogenic role for myelin-specific CD8(+) T cells in a model for multiple sclerosis. *J Exp Med.* 194, 669-76.
- Islam, T., Gauderman, W.J., Cozen, W., Mack, T.M., 2007. Childhood sun exposure influences risk of multiple sclerosis in monozygotic twins. *Neurology.* 69, 381-8.
- Isnardi, I., Ng, Y.S., Srdanovic, I., Motaghedi, R., Rudchenko, S., von Bernuth, H., Zhang, S.Y., Puel, A., Jouanguy, E., Picard, C., Garty, B.Z., Camcioglu, Y., Doffinger, R., Kumararatne, D., Davies, G., Gallin, J.I., Haraguchi, S., Day, N.K., Casanova, J.L., Meffre, E., 2008. IRAK-4- and MyD88-dependent pathways are essential for the removal of developing autoreactive B cells in humans. *Immunity.* 29, 746-57.
- Ito, T., Hanabuchi, S., Wang, Y.H., Park, W.R., Arima, K., Bover, L., Qin, F.X., Gilliet, M., Liu, Y.J., 2008. Two functional subsets of FOXP3+ regulatory T cells in human thymus and periphery. *Immunity.* 28, 870-80.
- Itoh, M., Takahashi, T., Sakaguchi, N., Kuniyasu, Y., Shimizu, J., Otsuka, F., Sakaguchi, S., 1999. Thymus and autoimmunity: production of CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells as a key function of the thymus in maintaining immunologic self-tolerance. *J Immunol.* 162, 5317-26.
- 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., Hall, R.P., St Clair, E.W., Tedder, T.F., 2011. Characterization of a rare IL-10-competent B-cell subset in humans that parallels mouse regulatory B10 cells. *Blood.* 117, 530-41.
- Jacobs, L.D., Beck, R.W., Simon, J.H., Kinkel, R.P., Brownschidle, C.M., Murray, T.J., Simonian, N.A., Slasor, P.J., Sandrock, A.W., 2000. Intramuscular interferon beta-1a therapy initiated during a first demyelinating event in multiple sclerosis. CHAMPS Study Group. *N Engl J Med.* 343, 898-904.
- Jameson, S.C., Hogquist, K.A., Bevan, M.J., 1995. Positive selection of thymocytes. *Annu Rev Immunol.* 13, 93-126.
- Jenkins, M.K., Pardoll, D.M., Mizuguchi, J., Chused, T.M., Schwartz, R.H., 1987. Molecular events in the induction of a nonresponsive state in interleukin 2-producing helper T-lymphocyte clones. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 84, 5409-13.
- Jilek, S., Schluep, M., Harari, A., Canales, M., Lysandropoulos, A., Zekeridou, A., Pantaleo, G., Du Pasquier, R.A., 2012. HLA-B7-restricted EBV-specific CD8+ T cells are dysregulated in multiple sclerosis. *J Immunol.* 188, 4671-80.
- Jingwu, Z., Medaer, R., Hashim, G.A., Chin, Y., van den Berg-Loonen, E., Raus, J.C., 1992. Myelin basic protein-specific T lymphocytes in multiple sclerosis and controls: precursor frequency, fine specificity, and cytotoxicity. *Ann Neurol.* 32, 330-8.

- Joetham, A., Takeda, K., Taube, C., Miyahara, N., Matsubara, S., Koya, T., Rha, Y.H., Dakhama, A., Gelfand, E.W., 2007. Naturally occurring lung CD4(+)CD25(+) T cell regulation of airway allergic responses depends on IL-10 induction of TGF-beta. *J Immunol.* 178, 1433-42.
- Johnson, K.P., Brooks, B.R., Cohen, J.A., Ford, C.C., Goldstein, J., Lisak, R.P., Myers, L.W., Panitch, H.S., Rose, J.W., Schiffer, R.B., 1995. Copolymer 1 reduces relapse rate and improves disability in relapsing-remitting multiple sclerosis: results of a phase III multicenter, double-blind placebo-controlled trial. The Copolymer 1 Multiple Sclerosis Study Group. *Neurology.* 45, 1268-76.
- Jonuleit, H., Schmitt, E., Stassen, M., Tuettenberg, A., Knop, J., Enk, A.H., 2001. Identification and functional characterization of human CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties isolated from peripheral blood. *J Exp Med.* 193, 1285-94.
- Jordan, M.S., Boesteanu, A., Reed, A.J., Petrone, A.L., Holenbeck, A.E., Lerman, M.A., Najj, A., Caton, A.J., 2001. Thymic selection of CD4+CD25+ regulatory T cells induced by an agonist self-peptide. *Nat Immunol.* 2, 301-6.
- Junker, A., Ivanidze, J., Malotka, J., Eiglmeier, I., Lassmann, H., Wekerle, H., Meinl, E., Hohlfeld, R., Dormair, K., 2007. Multiple sclerosis: T-cell receptor expression in distinct brain regions. *Brain.* 130, 2789-99.
- Kampman, M.T., Wilsgaard, T., Mellgren, S.I., 2007. Outdoor activities and diet in childhood and adolescence relate to MS risk above the Arctic Circle. *J Neurol.* 254, 471-7.
- Kappos, L., Comi, G., Panitch, H., Oger, J., Antel, J., Conlon, P., Steinman, L., 2000. Induction of a non-encephalitogenic type 2 T helper-cell autoimmune response in multiple sclerosis after administration of an altered peptide ligand in a placebo-controlled, randomized phase II trial. The Altered Peptide Ligand in Relapsing MS Study Group. *Nat Med.* 6, 1176-82.
- Kappos, L., Polman, C.H., Freedman, M.S., Edan, G., Hartung, H.P., Miller, D.H., Montalban, X., Barkhof, F., Bauer, L., Jakobs, P., Pohl, C., Sandbrink, R., 2006. Treatment with interferon beta-1b delays conversion to clinically definite and McDonald MS in patients with clinically isolated syndromes. *Neurology.* 67, 1242-9.
- Kappos, L., Gold, R., Miller, D.H., Macmanus, D.G., Havrdova, E., Limmroth, V., Polman, C.H., Schmierer, K., Youstry, T.A., Yang, M., Eraksoy, M., Meluzinova, E., Rektor, I., Dawson, K.T., Sandrock, A.W., O'Neill, G.N., 2008. Efficacy and safety of oral fumarate in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis: a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled phase IIb study. *Lancet.* 372, 1463-72.
- Kappos, L., Li, D., Calabresi, P.A., O'Connor, P., Bar-Or, A., Barkhof, F., Yin, M., Leppert, D., Glanzman, R., Tinbergen, J., Hauser, S.L., 2011. Ocrelizumab in relapsing-remitting multiple sclerosis: a phase 2, randomised, placebo-controlled, multicentre trial. *Lancet.* 378, 1779-87.
- Kasper, L.H., Shoemaker, J., 2010. Multiple sclerosis immunology: The healthy immune system vs the MS immune system. *Neurology.* 74 Suppl 1, S2-8.
- Katz, S.I., Parker, D., Turk, J.L., 1974. Suppressor cells in delayed hypersensitivity reactions. *Mayo Clin Proc.* 49, 537-40.
- Kebir, H., Kreymborg, K., Ifergan, I., Dodelet-Devillers, A., Cayrol, R., Bernard, M., Giuliani, F., Arbour, N., Becher, B., Prat, A., 2007. Human TH17 lymphocytes promote blood-brain barrier disruption and central nervous system inflammation. *Nat Med.* 13, 1173-5.
- Keenan, R.A., De Riva, A., Corleis, B., Hepburn, L., Licence, S., Winkler, T.H., Martensson, I.L., 2008. Censoring of autoreactive B cell development by the pre-B cell receptor. *Science.* 321, 696-9.
- Kessel, A., Haj, T., Peri, R., Snir, A., Melamed, D., Sabo, E., Toubi, E., 2012. Human CD19(+)CD25(high) B regulatory cells suppress proliferation of CD4(+) T cells and enhance Foxp3 and CTLA-4 expression in T-regulatory cells. *Autoimmun Rev.* 11, 670-7.
- Khattari, R., Cox, T., Yasayko, S.A., Ramsdell, F., 2003. An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells. *Nat Immunol.* 4, 337-42.
- Kimball, S.M., Ursell, M.R., O'Connor, P., Vieth, R., 2007. Safety of vitamin D3 in adults with multiple sclerosis. *Am J Clin Nutr.* 86, 645-51.
- Kimura, A., Naka, T., Kishimoto, T., 2007. IL-6-dependent and -independent pathways in the development of interleukin 17-producing T helper cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104, 12099-104.

- Klein, L., Hinterberger, M., Wirnsberger, G., Kyewski, B., 2009. Antigen presentation in the thymus for positive selection and central tolerance induction. *Nat Rev Immunol.* 9, 833-44.
- Klein, U., Rajewsky, K., Kuppers, R., 1998. Human immunoglobulin (Ig)M+IgD+ peripheral blood B cells expressing the CD27 cell surface antigen carry somatically mutated variable region genes: CD27 as a general marker for somatically mutated (memory) B cells. *J Exp Med.* 188, 1679-89.
- Knippenberg, S., Peelen, E., Smolders, J., Thewissen, M., Menheere, P., Cohen Tervaert, J.W., Hupperts, R., Damoiseaux, J., 2011. 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.* 239, 80-6.
- Kohm, A.P., Carpentier, P.A., Anger, H.A., Miller, S.D., 2002. Cutting edge: CD4+CD25+ regulatory T cells suppress antigen-specific autoreactive immune responses and central nervous system inflammation during active experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol.* 169, 4712-6.
- Korn, T., Reddy, J., Gao, W., Bettelli, E., Awasthi, A., Petersen, T.R., Backstrom, B.T., Sobel, R.A., Wucherpfennig, K.W., Strom, T.B., Oukka, M., Kuchroo, V.K., 2007. Myelin-specific regulatory T cells accumulate in the CNS but fail to control autoimmune inflammation. *Nat Med.* 13, 423-31.
- Korn, T., Mitsdoerffer, M., Croxford, A.L., Awasthi, A., Dardalhon, V.A., Galileos, G., Vollmar, P., Stritesky, G.L., Kaplan, M.H., Waisman, A., Kuchroo, V.K., Oukka, M., 2008. IL-6 controls Th17 immunity in vivo by inhibiting the conversion of conventional T cells into Foxp3+ regulatory T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105, 18460-5.
- Korporal, M., Haas, J., Balint, B., Fritzsching, B., Schwarz, A., Moeller, S., Fritz, B., Suri-Payer, E., Wildemann, B., 2008. Interferon beta-induced restoration of regulatory T-cell function in multiple sclerosis is prompted by an increase in newly generated naive regulatory T cells. *Arch Neurol.* 65, 1434-9.
- Kramer, S., Schimpl, A., Hunig, T., 1995. Immunopathology of interleukin (IL) 2-deficient mice: thymus dependence and suppression by thymus-dependent cells with an intact IL-2 gene. *J Exp Med.* 182, 1769-76.
- Kretschmer, K., Apostolou, I., Hawiger, D., Khazaie, K., Nussenzweig, M.C., von Boehmer, H., 2005. Inducing and expanding regulatory T cell populations by foreign antigen. *Nat Immunol.* 6, 1219-27.
- Kreuzaler, M., Rauch, M., Salzer, U., Birmelin, J., Rizzi, M., Grimbacher, B., Plebani, A., Lougaris, V., Quinti, I., Thon, V., Litzman, J., Schlesier, M., Warnatz, K., Thiel, J., Rolink, A.G., Eibel, H., 2012. Soluble BAFF levels inversely correlate with peripheral B cell numbers and the expression of BAFF receptors. *J Immunol.* 188, 497-503.
- Kumar, M., Putzki, N., Limmroth, V., Remus, R., Lindemann, M., Knop, D., Mueller, N., Hardt, C., Kreuzfelder, E., Grosse-Wilde, H., 2006. CD4+CD25+FoxP3+ T lymphocytes fail to suppress myelin basic protein-induced proliferation in patients with multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 180, 178-84.
- Kurobe, H., Liu, C., Ueno, T., Saito, F., Ohigashi, I., Seach, N., Arakaki, R., Hayashi, Y., Kitagawa, T., Lipp, M., Boyd, R.L., Takahama, Y., 2006. CCR7-dependent cortex-to-medulla migration of positively selected thymocytes is essential for establishing central tolerance. *Immunity.* 24, 165-77.
- Kurtzke, J.F., 1975. A reassessment of the distribution of multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand.* 51, 137-57.
- Kurtzke, J.F., Hyllested, K., 1987. Multiple sclerosis in the Faroe Islands. III. An alternative assessment of the three epidemics. *Acta Neurol Scand.* 76, 317-39.
- Kurtzke, J.F., Delasnerie-Laupretre, N., 1996. Reflection on the geographic distribution of multiple sclerosis in France. *Acta Neurol Scand.* 93, 110-7.
- Kurtzke, J.F., Heltberg, A., 2001. Multiple sclerosis in the Faroe Islands: an epitome. *J Clin Epidemiol.* 54, 1-22.
- Kyewski, B., Derbinski, J., 2004. Self-representation in the thymus: an extended view. *Nat Rev Immunol.* 4, 688-98.

- Lafaille, J.J., Nagashima, K., Katsuki, M., Tonegawa, S., 1994. High incidence of spontaneous autoimmune encephalomyelitis in immunodeficient anti-myelin basic protein T cell receptor transgenic mice. *Cell*. 78, 399-408.
- Lambracht-Washington, D., O'Connor, K.C., Cameron, E.M., Jowdry, A., Ward, E.S., Frohman, E., Racke, M.K., Monson, N.L., 2007. Antigen specificity of clonally expanded and receptor edited cerebrospinal fluid B cells from patients with relapsing remitting MS. *J Neuroimmunol*. 186, 164-76.
- Lampasona, V., Franciotta, D., Furlan, R., Zanaboni, S., Fazio, R., Bonifacio, E., Comi, G., Martino, G., 2004. Similar low frequency of anti-MOG IgG and IgM in MS patients and healthy subjects. *Neurology*. 62, 2092-4.
- Lampropoulou, V., Hoehlig, K., Roch, T., Neves, P., Calderon Gomez, E., Sweenie, C.H., Hao, Y., Freitas, A.A., Steinhoff, U., Anderton, S.M., Fillatreau, S., 2008. TLR-activated B cells suppress T cell-mediated autoimmunity. *J Immunol*. 180, 4763-73.
- Lan, R.Y., Ansari, A.A., Lian, Z.X., Gershwin, M.E., 2005. Regulatory T cells: development, function and role in autoimmunity. *Autoimmun Rev*. 4, 351-63.
- Lang, H.L., Jacobsen, H., Ikemizu, S., Andersson, C., Harlos, K., Madsen, L., Hjorth, P., Sondergaard, L., Svejgaard, A., Wucherpfennig, K., Stuart, D.I., Bell, J.I., Jones, E.Y., Fugger, L., 2002. A functional and structural basis for TCR cross-reactivity in multiple sclerosis. *Nat Immunol*. 3, 940-3.
- Laplaud, D.A., Ruiz, C., Wiertlewski, S., Brouard, S., Berthelot, L., Guillet, M., Melchior, B., Degauque, N., Edan, G., Brachet, P., Damier, P., Soulillou, J.P., 2004. Blood T-cell receptor beta chain transcriptome in multiple sclerosis. Characterization of the T cells with altered CDR3 length distribution. *Brain*. 127, 981-95.
- Larkin, J., 3rd, Rankin, A.L., Picca, C.C., Riley, M.P., Jenks, S.A., Sant, A.J., Caton, A.J., 2008. CD4+CD25+ regulatory T cell repertoire formation shaped by differential presentation of peptides from a self-antigen. *J Immunol*. 180, 2149-57.
- Lassmann, H., 2007. Experimental models of multiple sclerosis. *Rev Neurol (Paris)*. 163, 651-5.
- Lathrop, S.K., Santacruz, N.A., Pham, D., Luo, J., Hsieh, C.S., 2008. Antigen-specific peripheral shaping of the natural regulatory T cell population. *J Exp Med*. 205, 3105-17.
- Laufer, T.M., DeKoning, J., Markowitz, J.S., Lo, D., Glimcher, L.H., 1996. Unopposed positive selection and autoreactivity in mice expressing class II MHC only on thymic cortex. *Nature*. 383, 81-5.
- Lavie, F., Miceli-Richard, C., Ittah, M., Sellam, J., Gottenberg, J.E., Mariette, X., 2007. Increase of B cell-activating factor of the TNF family (BAFF) after rituximab treatment: insights into a new regulating system of BAFF production. *Ann Rheum Dis*. 66, 700-3.
- Leandro, M.J., Cambridge, G., Ehrenstein, M.R., Edwards, J.C., 2006. Reconstitution of peripheral blood B cells after depletion with rituximab in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 54, 613-20.
- Lee, H.M., Hsieh, C.S., 2009. Rare development of Foxp3+ thymocytes in the CD4+CD8+ subset. *J Immunol*. 183, 2261-6.
- Lee, L.F., Logronio, K., Tu, G.H., Zhai, W., Ni, I., Mei, L., Dilley, J., Yu, J., Rajpal, A., Brown, C., Appah, C., Chin, S.M., Han, B., Affolter, T., Lin, J.C., 2012. Anti-IL-7 receptor-alpha reverses established type 1 diabetes in nonobese diabetic mice by modulating effector T-cell function. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 109, 12674-9.
- Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J.M., Hoffmann, J.A., 1996. The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell*. 86, 973-83.
- Lemoine, F.M., Cherai, M., Giverne, C., Dimitri, D., Rosenzweig, M., Trebeden-Negre, H., Chaput, N., Barrou, B., Thioun, N., Gattegnio, B., Selles, F., Six, A., Azar, N., Lotz, J.P., Buzyn, A., Sibony, M., Delcourt, A., Boyer, O., Herson, S., Klatzmann, D., Lacave, R., 2009. Massive expansion of regulatory T-cells following interleukin 2 treatment during a phase I-II dendritic cell-based immunotherapy of metastatic renal cancer. *Int J Oncol*. 35, 569-81.
- Lemoine, S., Morva, A., Youinou, P., Jamin, C., 2011. Human T cells induce their own regulation through activation of B cells. *J Autoimmun*. 36, 228-38.

- Lenert, P., Brummel, R., Field, E.H., Ashman, R.F., 2005. TLR-9 activation of marginal zone B cells in lupus mice regulates immunity through increased IL-10 production. *J Clin Immunol.* 25, 29-40.
- Lesley, R., Xu, Y., Kalled, S.L., Hess, D.M., Schwab, S.R., Shu, H.B., Cyster, J.G., 2004. Reduced competitiveness of autoantigen-engaged B cells due to increased dependence on BAFF. *Immunity.* 20, 441-53.
- Levin, L.I., Munger, K.L., Rubertone, M.V., Peck, C.A., Lennette, E.T., Spiegelman, D., Ascherio, A., 2005. Temporal relationship between elevation of epstein-barr virus antibody titers and initial onset of neurological symptoms in multiple sclerosis. *JAMA.* 293, 2496-500.
- Levings, M.K., Sangregorio, R., Roncarolo, M.G., 2001. Human cd25(+)cd4(+) t regulatory cells suppress naive and memory T cell proliferation and can be expanded in vitro without loss of function. *J Exp Med.* 193, 1295-302.
- Lewkowich, I.P., Herman, N.S., Schleifer, K.W., Dance, M.P., Chen, B.L., Dienger, K.M., Sproles, A.A., Shah, J.S., Kohl, J., Belkaid, Y., Wills-Karp, M., 2005. CD4+CD25+ T cells protect against experimentally induced asthma and alter pulmonary dendritic cell phenotype and function. *J Exp Med.* 202, 1549-61.
- Li, M.O., Wan, Y.Y., Flavell, R.A., 2007. T cell-produced transforming growth factor-beta1 controls T cell tolerance and regulates Th1- and Th17-cell differentiation. *Immunity.* 26, 579-91.
- Li, Y., Li, H., Weigert, M., 2002. Autoreactive B cells in the marginal zone that express dual receptors. *J Exp Med.* 195, 181-8.
- Liang, B., Workman, C., Lee, J., Chew, C., Dale, B.M., Colonna, L., Flores, M., Li, N., Schweighoffer, E., Greenberg, S., Tybulewicz, V., Vignali, D., Clynes, R., 2008. Regulatory T cells inhibit dendritic cells by lymphocyte activation gene-3 engagement of MHC class II. *J Immunol.* 180, 5916-26.
- Lincoln, M.R., Montpetit, A., Cader, M.Z., Saarela, J., Dyment, D.A., Tiislar, M., Ferretti, V., Tienari, P.J., Sadovnick, A.D., Peltonen, L., Ebers, G.C., Hudson, T.J., 2005. A predominant role for the HLA class II region in the association of the MHC region with multiple sclerosis. *Nat Genet.* 37, 1108-12.
- Liou, J., Kim, M.L., Heo, W.D., Jones, J.T., Myers, J.W., Ferrell, J.E., Jr., Meyer, T., 2005. STIM is a Ca²⁺ sensor essential for Ca²⁺-store-depletion-triggered Ca²⁺ influx. *Curr Biol.* 15, 1235-41.
- Liston, A., Nutsch, K.M., Farr, A.G., Lund, J.M., Rasmussen, J.P., Koni, P.A., Rudensky, A.Y., 2008. Differentiation of regulatory Foxp3⁺ T cells in the thymic cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105, 11903-8.
- Liu, S., Velez, M.G., Humann, J., Rowland, S., Conrad, F.J., Halverson, R., Torres, R.M., Pelanda, R., 2005. Receptor editing can lead to allelic inclusion and development of B cells that retain antibodies reacting with high avidity autoantigens. *J Immunol.* 175, 5067-76.
- Liu, W., Putnam, A.L., Xu-Yu, Z., Szot, G.L., Lee, M.R., Zhu, S., Gottlieb, P.A., Kapranov, P., Gingeras, T.R., Fazekas de St Groth, B., Clayberger, C., Soper, D.M., Ziegler, S.F., Bluestone, J.A., 2006. CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4⁺ T reg cells. *J Exp Med.* 203, 1701-11.
- Liu, X., Nguyen, P., Liu, W., Cheng, C., Steeves, M., Obenaus, J.C., Ma, J., Geiger, T.L., 2009. T cell receptor CDR3 sequence but not recognition characteristics distinguish autoreactive effector and Foxp3(+) regulatory T cells. *Immunity.* 31, 909-20.
- Loftus, B., Newsom, B., Montgomery, M., Von Gynz-Rekowski, K., Riser, M., Inman, S., Garces, P., Rill, D., Zhang, J., Williams, J.C., 2009. Autologous attenuated T-cell vaccine (Tovaxin) dose escalation in multiple sclerosis relapsing-remitting and secondary progressive patients nonresponsive to approved immunomodulatory therapies. *Clin Immunol.* 131, 202-15.
- Lowther, D.E., Hafler, D.A., 2012. Regulatory T cells in the central nervous system. *Immunol Rev.* 248, 156-69.
- Lu, L., Li, W., Fu, F., Chambers, F.G., Qian, S., Fung, J.J., 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, 1808-15.
- Lublin, F.D., Reingold, S.C., 1996. Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey. National Multiple Sclerosis Society (USA) Advisory Committee on Clinical Trials of New Agents in Multiple Sclerosis. *Neurology.* 46, 907-11.

- Lublin, F.D., 2005. Clinical features and diagnosis of multiple sclerosis. *Neurol Clin.* 23, 1-15, v.
- Lucas, R.M., Hughes, A.M., Lay, M.L., Ponsonby, A.L., Dwyer, D.E., Taylor, B.V., Pender, M.P., 2011. Epstein-Barr virus and multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 82, 1142-8.
- Lucchinetti, C., Bruck, W., Parisi, J., Scheithauer, B., Rodriguez, M., Lassmann, H., 2000. Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination. *Ann Neurol.* 47, 707-17.
- Ludwig-Portugall, I., Hamilton-Williams, E.E., Gottschalk, C., Kurts, C., 2008. Cutting edge: CD25+ regulatory T cells prevent expansion and induce apoptosis of B cells specific for tissue autoantigens. *J Immunol.* 181, 4447-51.
- Ludwig-Portugall, I., Hamilton-Williams, E.E., Gotot, J., Kurts, C., 2009. CD25+ T(reg) specifically suppress auto-Ab generation against pancreatic tissue autoantigens. *Eur J Immunol.* 39, 225-33.
- Lundmark, F., Duvefelt, K., Hillert, J., 2007a. Genetic association analysis of the interleukin 7 gene (IL7) in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 192, 171-3.
- Lundmark, F., Duvefelt, K., Iacobaeus, E., Kockum, I., Wallstrom, E., Khademi, M., Oturai, A., Ryder, L.P., Saarela, J., Harbo, H.F., Celius, E.G., Salter, H., Olsson, T., Hillert, J., 2007b. Variation in interleukin 7 receptor alpha chain (IL7R) influences risk of multiple sclerosis. *Nat Genet.* 39, 1108-13.
- Lunemann, J.D., Jelcic, I., Roberts, S., Lutterotti, A., Tackenberg, B., Martin, R., Munz, 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, 1763-73.
- Magliozzi, R., Howell, O., Vora, A., Serafini, B., Nicholas, R., Puopolo, M., Reynolds, R., Aloisi, F., 2007. Meningeal B-cell follicles in secondary progressive multiple sclerosis associate with early onset of disease and severe cortical pathology. *Brain.* 130, 1089-104.
- Magliozzi, R., Howell, O.W., Reeves, C., Roncaroli, F., Nicholas, R., Serafini, B., Aloisi, F., Reynolds, R., 2010. A Gradient of neuronal loss and meningeal inflammation in multiple sclerosis. *Ann Neurol.* 68, 477-93.
- Mann, M.K., Maresz, K., Shriver, L.P., Tan, Y., Dittel, B.N., 2007. B cell regulation of CD4+CD25+ T regulatory cells and IL-10 via B7 is essential for recovery from experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol.* 178, 3447-56.
- Manzotti, C.N., Tipping, H., Perry, L.C., Mead, K.I., Blair, P.J., Zheng, Y., Sansom, D.M., 2002. Inhibition of human T cell proliferation by CTLA-4 utilizes CD80 and requires CD25+ regulatory T cells. *Eur J Immunol.* 32, 2888-96.
- Marrack, P., Kappler, J., 2004. Control of T cell viability. *Annu Rev Immunol.* 22, 765-87.
- Marson, A., Kretschmer, K., Frampton, G.M., Jacobsen, E.S., Polansky, J.K., MacIsaac, K.D., Levine, S.S., Fraenkel, E., von Boehmer, H., Young, R.A., 2007. Foxp3 occupancy and regulation of key target genes during T-cell stimulation. *Nature.* 445, 931-5.
- Martin, R., 2012. Anti-CD25 (daclizumab) monoclonal antibody therapy in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Clin Immunol.* 142, 9-14.
- Maseda, D., Smith, S.H., DiLillo, D.J., Bryant, J.M., Candando, K.M., Weaver, C.T., Tedder, T.F., 2012. Regulatory B10 cells differentiate into antibody-secreting cells after transient IL-10 production in vivo. *J Immunol.* 188, 1036-48.
- Mathis, D., Benoist, C., 2009. Aire. *Annu Rev Immunol.* 27, 287-312.
- Matsumoto, M., Fujii, Y., Baba, A., Hikida, M., Kurosaki, T., Baba, Y., 2011. The calcium sensors STIM1 and STIM2 control B cell regulatory function through interleukin-10 production. *Immunity.* 34, 703-14.
- Matsumoto, Y., Sakuma, H., Kohyama, K., Park, I.K., 2007. Paralysis of CD4(+)CD25(+) regulatory T cell response in chronic autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol.* 187, 44-54.
- Matsushita, T., Fujimoto, M., Hasegawa, M., Komura, K., Takehara, K., Tedder, T.F., Sato, S., 2006. Inhibitory role of CD19 in the progression of experimental autoimmune encephalomyelitis by regulating cytokine response. *Am J Pathol.* 168, 812-21.
- Matsushita, T., Yanaba, K., Bouaziz, J.D., Fujimoto, M., Tedder, T.F., 2008. Regulatory B cells inhibit EAE initiation in mice while other B cells promote disease progression. *J Clin Invest.* 118, 3420-30.

- Matsushita, T., Horikawa, M., Iwata, Y., 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.* 185, 2240-52.
- Mauri, C., Mars, L.T., Londei, M., 2000. Therapeutic activity of agonistic monoclonal antibodies against CD40 in a chronic autoimmune inflammatory process. *Nat Med.* 6, 673-9.
- Mauri, C., Gray, D., Mushtaq, N., Londei, M., 2003. Prevention of arthritis by interleukin 10-producing B cells. *J Exp Med.* 197, 489-501.
- Mauri, C., 2010. Regulation of immunity and autoimmunity by B cells. *Curr Opin Immunol.* 22, 761-7.
- Mauri, C., Bosma, A., 2012. Immune regulatory function of B cells. *Annu Rev Immunol.* 30, 221-41.
- Mayo, L., Quintana, F.J., Weiner, H.L., 2012. The innate immune system in demyelinating disease. *Immunol Rev.* 248, 170-87.
- McCaughy, T.M., Wilken, M.S., Hogquist, K.A., 2007. Thymic emigration revisited. *J Exp Med.* 204, 2513-20.
- McGeachy, M.J., Stephens, L.A., Anderton, S.M., 2005. Natural recovery and protection from autoimmune encephalomyelitis: contribution of CD4+CD25+ regulatory cells within the central nervous system. *J Immunol.* 175, 3025-32.
- McKean, D., Huppi, K., Bell, M., Staudt, L., Gerhard, W., Weigert, M., 1984. Generation of antibody diversity in the immune response of BALB/c mice to influenza virus hemagglutinin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 81, 3180-4.
- McKeever, U., Mordes, J.P., Greiner, D.L., Appel, M.C., Rozing, J., Handler, E.S., Rossini, A.A., 1990. Adoptive transfer of autoimmune diabetes and thyroiditis to athymic rats. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 87, 7618-22.
- Michel, L., Berthelot, L., Pettre, S., Wiertlewski, S., Lefrere, F., Braudeau, C., Brouard, S., Soulillou, J.P., 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, 3411-9.
- Misra, N., Bayry, J., Lacroix-Desmazes, S., Kazatchkine, M.D., Kaveri, S.V., 2004. Cutting edge: human CD4+CD25+ T cells restrain the maturation and antigen-presenting function of dendritic cells. *J Immunol.* 172, 4676-80.
- Miyara, M., Yoshioka, Y., Kitoh, A., Shima, T., Wing, K., Niwa, A., Parizot, C., Taflin, C., Heike, T., Valeyre, D., Mathian, A., Nakahata, T., Yamaguchi, T., Nomura, T., Ono, M., Amoura, Z., Gorochoy, G., Sakaguchi, S., 2009. Functional delineation and differentiation dynamics of human CD4+ T cells expressing the FoxP3 transcription factor. *Immunity.* 30, 899-911.
- Mizoguchi, A., Mizoguchi, E., Smith, R.N., Preffer, F.I., Bhan, A.K., 1997. Suppressive role of B cells in chronic colitis of T cell receptor alpha mutant mice. *J Exp Med.* 186, 1749-56.
- Mizoguchi, A., Mizoguchi, E., Takedatsu, H., Blumberg, R.S., Bhan, A.K., 2002. Chronic intestinal inflammatory condition generates IL-10-producing regulatory B cell subset characterized by CD1d upregulation. *Immunity.* 16, 219-30.
- Mizoguchi, E., Mizoguchi, A., Preffer, F.I., Bhan, A.K., 2000. Regulatory role of mature B cells in a murine model of inflammatory bowel disease. *Int Immunol.* 12, 597-605.
- Montes, M., Zhang, X., Berthelot, L., Laplaud, D.A., Brouard, S., Jin, J., Rogan, S., Armao, D., Jewells, V., Soulillou, J.P., Markovic-Plese, S., 2009. Oligoclonal myelin-reactive T-cell infiltrates derived from multiple sclerosis lesions are enriched in Th17 cells. *Clin Immunol.* 130, 133-44.
- Morrissey, P.J., Charrier, K., Braddy, S., Liggitt, D., Watson, J.D., 1993. CD4+ T cells that express high levels of CD45RB induce wasting disease when transferred into congenic severe combined immunodeficient mice. Disease development is prevented by cotransfer of purified CD4+ T cells. *J Exp Med.* 178, 237-44.
- Morva, A., Lemoine, S., Achour, A., Pers, J.O., Youinou, P., Jamin, C., 2012. Maturation and function of human dendritic cells are regulated by B lymphocytes. *Blood.* 119, 106-14.
- Moulin, V., Andris, F., Thielemans, K., Maliszewski, C., Urbain, J., Moser, M., 2000. B lymphocytes regulate dendritic cell (DC) function in vivo: increased interleukin 12 production by DCs from B cell-deficient mice results in T helper cell type 1 deviation. *J Exp Med.* 192, 475-82.
- Mueller, D.L., 2010. Mechanisms maintaining peripheral tolerance. *Nat Immunol.* 11, 21-7.

- Munger, K.L., Zhang, S.M., O'Reilly, E., Hernan, M.A., Olek, M.J., Willett, W.C., Ascherio, A., 2004. Vitamin D intake and incidence of multiple sclerosis. *Neurology*. 62, 60-5.
- Munger, K.L., Levin, L.I., Hollis, B.W., Howard, N.S., Ascherio, A., 2006. Serum 25-hydroxyvitamin D levels and risk of multiple sclerosis. *JAMA*. 296, 2832-8.
- Munn, D.H., Sharma, M.D., Hou, D., Baban, B., Lee, J.R., Antonia, S.J., Messina, J.L., Chandler, P., Koni, P.A., Mellor, A.L., 2004. Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase by plasmacytoid dendritic cells in tumor-draining lymph nodes. *J Clin Invest*. 114, 280-90.
- Munn, D.H., Sharma, M.D., Baban, B., Harding, H.P., Zhang, Y., Ron, D., Mellor, A.L., 2005. GCN2 kinase in T cells mediates proliferative arrest and anergy induction in response to indoleamine 2,3-dioxygenase. *Immunity*. 22, 633-42.
- Nagamine, K., Peterson, P., Scott, H.S., Kudoh, J., Minoshima, S., Heino, M., Krohn, K.J., Lalioti, M.D., Mullis, P.E., Antonarakis, S.E., Kawasaki, K., Asakawa, S., Ito, F., Shimizu, N., 1997. Positional cloning of the APECED gene. *Nat Genet*. 17, 393-8.
- Nakashima, H., Hamaguchi, Y., Watanabe, R., Ishiura, N., Kuwano, Y., Okochi, H., Takahashi, Y., Tamaki, K., Sato, S., Tedder, T.F., Fujimoto, M., 2010. CD22 expression mediates the regulatory functions of peritoneal B-1a cells during the remission phase of contact hypersensitivity reactions. *J Immunol*. 184, 4637-45.
- Nemazee, D., Buerki, K., 1989. Clonal deletion of autoreactive B lymphocytes in bone marrow chimeras. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 86, 8039-43.
- Nemazee, D.A., Burki, K., 1989. Clonal deletion of B lymphocytes in a transgenic mouse bearing anti-MHC class I antibody genes. *Nature*. 337, 562-6.
- Neta, R., Salvin, S.B., 1974. Specific suppression of delayed hypersensitivity: the possible presence of a suppressor B cell in the regulation of delayed hypersensitivity. *J Immunol*. 113, 1716-25.
- Neumann, H., Medana, I.M., Bauer, J., Lassmann, H., 2002. Cytotoxic T lymphocytes in autoimmune and degenerative CNS diseases. *Trends Neurosci*. 25, 313-9.
- Niino, M., Hirotsu, M., Miyazaki, Y., Sasaki, H., 2009. Memory and naive B-cell subsets in patients with multiple sclerosis. *Neurosci Lett*. 464, 74-8.
- Nossal, G.J., Pike, B.L., 1980. Clonal anergy: persistence in tolerant mice of antigen-binding B lymphocytes incapable of responding to antigen or mitogen. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 77, 1602-6.
- O'Connor, K.C., McLaughlin, K.A., De Jager, P.L., Chitnis, T., Bettelli, E., Xu, C., Robinson, W.H., Cherry, S.V., Bar-Or, A., Banwell, B., Fukaura, H., Fukazawa, T., Tenembaum, S., Wong, S.J., Tavakoli, N.P., Idrissova, Z., Viglietta, V., Rostasy, K., Pohl, D., Dale, R.C., Freedman, M., Steinman, L., Buckle, G.J., Kuchroo, V.K., Hafler, D.A., Wucherpfennig, K.W., 2007a. Self-antigen tetramers discriminate between myelin autoantibodies to native or denatured protein. *Nat Med*. 13, 211-7.
- O'Connor, P.W., Li, D., Freedman, M.S., Bar-Or, A., Rice, G.P., Confavreux, C., Paty, D.W., Stewart, J.A., Scheyer, R., 2006. A Phase II study of the safety and efficacy of teriflunomide in multiple sclerosis with relapses. *Neurology*. 66, 894-900.
- O'Connor, R.A., Malpass, K.H., Anderton, S.M., 2007b. The inflamed central nervous system drives the activation and rapid proliferation of Foxp3+ regulatory T cells. *J Immunol*. 179, 958-66.
- Oberle, N., Eberhardt, N., Falk, C.S., Krammer, P.H., Suri-Payer, E., 2007. Rapid suppression of cytokine transcription in human CD4+CD25 T cells by CD4+Foxp3+ regulatory T cells: independence of IL-2 consumption, TGF-beta, and various inhibitors of TCR signaling. *J Immunol*. 179, 3578-87.
- Ochoa-Reparaz, J., Riccardi, C., Rynda, A., Jun, S., Callis, G., Pascual, D.W., 2007. Regulatory T cell vaccination without autoantigen protects against experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol*. 178, 1791-9.
- Oderup, C., Cederbom, L., Makowska, A., Cilio, C.M., Ivars, F., 2006. Cytotoxic T lymphocyte antigen-4-dependent down-modulation of costimulatory molecules on dendritic cells in CD4+CD25+ regulatory T-cell-mediated suppression. *Immunology*. 118, 240-9.
- Oh, U., Blevins, G., Griffith, C., Richert, N., Maric, D., Lee, C.R., McFarland, H., Jacobson, S., 2009. Regulatory T cells are reduced during anti-CD25 antibody treatment of multiple sclerosis. *Arch Neurol*. 66, 471-9.

- Oksenberg, J.R., Panzara, M.A., Begovich, A.B., Mitchell, D., Erlich, H.A., Murray, R.S., Shimonkevitz, R., Sherritt, M., Rothbard, J., Bernard, C.C., et al., 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.
- Oksenberg, J.R., Hauser, S.L., 2005. Genetics of multiple sclerosis. *Neurol Clin*. 23, 61-75, vi.
- Oksenberg, J.R., Baranzini, S.E., 2010. Multiple sclerosis genetics--is the glass half full, or half empty? *Nat Rev Neurol*. 6, 429-37.
- Olerup, O., Olsson, R., Hultcrantz, R., Broome, U., 1995. HLA-DR and HLA-DQ are not markers for rapid disease progression in primary sclerosing cholangitis. *Gastroenterology*. 108, 870-8.
- Olivares-Villagomez, D., Wang, Y., Lafaille, J.J., 1998. Regulatory CD4(+) T cells expressing endogenous T cell receptor chains protect myelin basic protein-specific transgenic mice from spontaneous autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med*. 188, 1883-94.
- Olkhanud, P.B., Damdinsuren, B., Bodogai, M., Gress, R.E., Sen, R., Wejksza, K., Malchinkhuu, E., Wersto, R.P., Biragyn, A., 2011. Tumor-evoked regulatory B cells promote breast cancer metastasis by converting resting CD4(+) T cells to T-regulatory cells. *Cancer Res*. 71, 3505-15.
- Olsson, T., Sun, J., Hillert, J., Hojeberg, B., Ekre, H.P., Andersson, G., Olerup, O., Link, H., 1992. Increased numbers of T cells recognizing multiple myelin basic protein epitopes in multiple sclerosis. *Eur J Immunol*. 22, 1083-7.
- Owens, G.P., Bennett, J.L., Lassmann, H., O'Connor, K.C., Ritchie, A.M., Shearer, A., Lam, C., Yu, X., Birlea, M., DuPree, C., Williamson, R.A., Hafler, D.A., Burgoon, M.P., Gilden, D., 2009. Antibodies produced by clonally expanded plasma cells in multiple sclerosis cerebrospinal fluid. *Ann Neurol*. 65, 639-49.
- Pacholczyk, R., Ignatowicz, H., Kraj, P., Ignatowicz, L., 2006. Origin and T cell receptor diversity of Foxp3+CD4+CD25+ T cells. *Immunity*. 25, 249-59.
- Pandiyan, P., Zheng, L., Ishihara, S., Reed, J., Lenardo, M.J., 2007. CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4+ T cells. *Nat Immunol*. 8, 1353-62.
- Parekh, V.V., Prasad, D.V., Banerjee, P.P., Joshi, B.N., Kumar, A., Mishra, G.C., 2003. B cells activated by lipopolysaccharide, but not by anti-Ig and anti-CD40 antibody, induce anergy in CD8+ T cells: role of TGF-beta 1. *J Immunol*. 170, 5897-911.
- Paty, D.W., Li, D.K., 1993. Interferon beta-1b is effective in relapsing-remitting multiple sclerosis. II. MRI analysis results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. UBC MS/MRI Study Group and the IFNB Multiple Sclerosis Study Group. *Neurology*. 43, 662-7.
- Pelanda, R., Torres, R.M., 2006. Receptor editing for better or for worse. *Curr Opin Immunol*. 18, 184-90.
- Penaranda, C., Kuswanto, W., Hofmann, J., Kenefeck, R., Narendran, P., Walker, L.S., Bluestone, J.A., Abbas, A.K., Dooks, H., 2012. IL-7 receptor blockade reverses autoimmune diabetes by promoting inhibition of effector/memory T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 109, 12668-73.
- Pender, M.P., Csurhes, P.A., Greer, J.M., Mowat, P.D., Henderson, R.D., Cameron, K.D., Purdie, D.M., McCombe, P.A., 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*. 165, 5322-31.
- Pender, M.P., 2003. Infection of autoreactive B lymphocytes with EBV, causing chronic autoimmune diseases. *Trends Immunol*. 24, 584-8.
- Pender, M.P., Csurhes, P.A., Lenarczyk, A., Pfluger, C.M., Burrows, S.R., 2009. Decreased T cell reactivity to Epstein-Barr virus infected lymphoblastoid cell lines in multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 80, 498-505.
- 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.
- Pennington, D.J., Silva-Santos, B., Silberzahn, T., Escorcio-Correia, M., Woodward, M.J., Roberts, S.J., Smith, A.L., Dyson, P.J., Hayday, A.C., 2006. Early events in the thymus affect the balance of effector and regulatory T cells. *Nature*. 444, 1073-7.

- Peterson, P., Org, T., Rebane, A., 2008. Transcriptional regulation by AIRE: molecular mechanisms of central tolerance. *Nat Rev Immunol.* 8, 948-57.
- Petrie, H.T., Livak, F., Schatz, D.G., Strasser, A., Crispe, I.N., Shortman, K., 1993. Multiple rearrangements in T cell receptor alpha chain genes maximize the production of useful thymocytes. *J Exp Med.* 178, 615-22.
- Piccirillo, C.A., Letterio, J.J., Thornton, A.M., McHugh, R.S., Mamura, M., Mizuhara, H., Shevach, E.M., 2002. CD4(+)CD25(+) regulatory T cells can mediate suppressor function in the absence of transforming growth factor beta1 production and responsiveness. *J Exp Med.* 196, 237-46.
- Pillai, S., Mattoo, H., Cariappa, A., 2011. B cells and autoimmunity. *Curr Opin Immunol.* 23, 721-31.
- Polman, C.H., Reingold, S.C., Edan, G., Filippi, M., Hartung, H.P., Kappos, L., Lublin, F.D., Metz, L.M., McFarland, H.F., O'Connor, P.W., Sandberg-Wollheim, M., Thompson, A.J., Weinshenker, B.G., Wolinsky, J.S., 2005. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2005 revisions to the "McDonald Criteria". *Ann Neurol.* 58, 840-6.
- Polman, C.H., O'Connor, P.W., Havrdova, E., Hutchinson, M., Kappos, L., Miller, D.H., Phillips, J.T., Lublin, F.D., Giovannoni, G., Wajgt, A., Toal, M., Lynn, F., Panzara, M.A., Sandrock, A.W., 2006. A randomized, placebo-controlled trial of natalizumab for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med.* 354, 899-910.
- Polman, C.H., Reingold, S.C., Banwell, B., Clanet, M., Cohen, J.A., Filippi, M., Fujihara, K., Havrdova, E., Hutchinson, M., Kappos, L., Lublin, F.D., Montalban, X., O'Connor, P., Sandberg-Wollheim, M., Thompson, A.J., Waubant, E., Weinshenker, B., Wolinsky, J.S., 2011. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria. *Ann Neurol.* 69, 292-302.
- Powell, J.T., 2006. Genes predisposing to rapid aneurysm growth. *Ann N Y Acad Sci.* 1085, 236-41.
- Powrie, F., Leach, M.W., Mauze, S., Caddle, L.B., Coffman, R.L., 1993. Phenotypically distinct subsets of CD4+ T cells induce or protect from chronic intestinal inflammation in C. B-17 scid mice. *Int Immunol.* 5, 1461-71.
- Prat, A., Al-Asmi, A., Duquette, P., Antel, J.P., 1999. Lymphocyte migration and multiple sclerosis: relation with disease course and therapy. *Ann Neurol.* 46, 253-6.
- Prineas, J.W., Parratt, J.D., 2012. Oligodendrocytes and the early multiple sclerosis lesion. *Ann Neurol.* 72, 18-31.
- Putheti, P., Pettersson, A., Soderstrom, M., Link, H., Huang, Y.M., 2004. Circulating CD4+CD25+ T regulatory cells are not altered in multiple sclerosis and unaffected by disease-modulating drugs. *J Clin Immunol.* 24, 155-61.
- Raghuwanshi, A., Joshi, S.S., Christakos, S., 2008. Vitamin D and multiple sclerosis. *J Cell Biochem.* 105, 338-43.
- Raiotach-Regue, D., Grau-Lopez, L., Naranjo-Gomez, M., Ramo-Tello, C., Pujol-Borrell, R., Martinez-Caceres, E., Borrás, F.E., 2012. Stable antigen-specific T-cell hyporesponsiveness induced by tolerogenic dendritic cells from multiple sclerosis patients. *Eur J Immunol.* 42, 771-82.
- Ramagopalan, S.V., Hanwell, H.E., Giovannoni, G., Knappskog, P.M., Nyland, H.I., Myhr, K.M., Ebers, G.C., Torkildsen, O., 2010. Vitamin D-dependent rickets, HLA-DRB1, and the risk of multiple sclerosis. *Arch Neurol.* 67, 1034-5.
- Ransohoff, R.M., Estes, M.L., 1991. Astrocyte expression of major histocompatibility complex gene products in multiple sclerosis brain tissue obtained by stereotactic biopsy. *Arch Neurol.* 48, 1244-6.
- Read, S., Malmstrom, V., Powrie, F., 2000. Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25(+)CD4(+) regulatory cells that control intestinal inflammation. *J Exp Med.* 192, 295-302.
- Reboldi, A., Coisne, C., Baumjohann, D., Benvenuto, F., Bottinelli, D., Lira, S., Uccelli, A., Lanzavecchia, A., Engelhardt, B., 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, 514-23.
- Reindl, M., Linington, C., Brehm, U., Egg, R., Dilitz, E., Deisenhammer, F., Poewe, W., Berger, T., 1999. Antibodies against the myelin oligodendrocyte glycoprotein and the myelin basic

- protein in multiple sclerosis and other neurological diseases: a comparative study. *Brain*. 122 (Pt 11), 2047-56.
- Ren, X., Ye, F., Jiang, Z., Chu, Y., Xiong, S., Wang, Y., 2007. Involvement of cellular death in TRAIL/DR5-dependent suppression induced by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells. *Cell Death Differ*. 14, 2076-84.
- Ribot, J., Enault, G., Pilipenko, S., Huchenq, A., Calise, M., Hudrisier, D., Romagnoli, P., van Meerwijk, J.P., 2007. Shaping of the autoreactive regulatory T cell repertoire by thymic cortical positive selection. *J Immunol*. 179, 6741-8.
- Riley, J.L., June, C.H., Blazar, B.R., 2009. Human T regulatory cell therapy: take a billion or so and call me in the morning. *Immunity*. 30, 656-65.
- Romagnoli, P., van Meerwijk, J.P., 2010. Thymic selection and lineage commitment of CD4(+)Foxp3(+) regulatory T lymphocytes. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 92, 251-77.
- Roncador, G., Brown, P.J., Maestre, L., Hue, S., Martinez-Torrecuadrada, J.L., Ling, K.L., Pratap, S., Toms, C., Fox, B.C., Cerundolo, V., Powrie, F., Banham, A.H., 2005. Analysis of FOXP3 protein expression in human CD4+CD25+ regulatory T cells at the single-cell level. *Eur J Immunol*. 35, 1681-91.
- Rook, G.A., 2012. Hygiene hypothesis and autoimmune diseases. *Clin Rev Allergy Immunol*. 42, 5-15.
- Rosati, G., 2001. The prevalence of multiple sclerosis in the world: an update. *Neurol Sci*. 22, 117-39.
- Rubtsov, Y.P., Rasmussen, J.P., Chi, E.Y., Fontenot, J., Castelli, L., Ye, X., Treuting, P., Siewe, L., Roers, A., Henderson, W.R., Jr., Muller, W., Rudensky, A.Y., 2008. Regulatory T cell-derived interleukin-10 limits inflammation at environmental interfaces. *Immunity*. 28, 546-58.
- Saadoun, D., Rosenzweig, M., Joly, F., Six, A., Carrat, F., Thibault, V., Sene, D., Cacoub, P., Klatzmann, D., 2011. Regulatory T-cell responses to low-dose interleukin-2 in HCV-induced vasculitis. *N Engl J Med*. 365, 2067-77.
- Sadlack, B., Lohler, J., Schorle, H., Klebb, G., Haber, H., Sickel, E., Noelle, R.J., Horak, I., 1995. Generalized autoimmune disease in interleukin-2-deficient mice is triggered by an uncontrolled activation and proliferation of CD4+ T cells. *Eur J Immunol*. 25, 3053-9.
- Sadovnick, A.D., Armstrong, H., Rice, G.P., Bulman, D., Hashimoto, L., Paty, D.W., Hashimoto, S.A., Warren, S., Hader, W., Murray, T.J., et al., 1993. A population-based study of multiple sclerosis in twins: update. *Ann Neurol*. 33, 281-5.
- Sadovnick, A.D., Ebers, G.C., Dyment, D.A., Risch, N.J., 1996. Evidence for genetic basis of multiple sclerosis. The Canadian Collaborative Study Group. *Lancet*. 347, 1728-30.
- Sakaguchi, S., Fukuma, K., Kuribayashi, K., Masuda, T., 1985. Organ-specific autoimmune diseases induced in mice by elimination of T cell subset. I. Evidence for the active participation of T cells in natural self-tolerance; deficit of a T cell subset as a possible cause of autoimmune disease. *J Exp Med*. 161, 72-87.
- Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M., Toda, M., 1995. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol*. 155, 1151-64.
- Sakaguchi, S., 2004. Naturally arising CD4+ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu Rev Immunol*. 22, 531-62.
- Sakaguchi, S., 2005. Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat Immunol*. 6, 345-52.
- Sakaguchi, S., Miyara, M., Costantino, C.M., Hafler, D.A., 2010. FOXP3+ regulatory T cells in the human immune system. *Nat Rev Immunol*. 10, 490-500.
- Salomon, B., Lenschow, D.J., Rhee, L., Ashourian, N., Singh, B., Sharpe, A., Bluestone, J.A., 2000. B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4+CD25+ immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes. *Immunity*. 12, 431-40.
- Salvetti, M., Giovannoni, G., Aloisi, F., 2009. Epstein-Barr virus and multiple sclerosis. *Curr Opin Neurol*. 22, 201-6.
- Samoilova, E.B., Horton, J.L., Chen, Y., 1998. Acceleration of experimental autoimmune encephalomyelitis in interleukin-10-deficient mice: roles of interleukin-10 in disease progression and recovery. *Cell Immunol*. 188, 118-24.

- Sawcer, S., Hellenthal, G., Pirinen, M., Spencer, C.C., Patsopoulos, N.A., Moutsianas, L., Dilthey, A., Su, Z., Freeman, C., Hunt, S.E., Edkins, S., Gray, E., Booth, D.R., Potter, S.C., Goris, A., Band, G., Oturai, A.B., Strange, A., Saarela, J., Bellenguez, C., Fontaine, B., Gillman, M., Hemmer, B., Gwilliam, R., Zipp, F., Jayakumar, A., Martin, R., Leslie, S., Hawkins, S., Giannoulatou, E., D'Alfonso, S., Blackburn, H., Martinelli Boneschi, F., Liddle, J., Harbo, H.F., Perez, M.L., Spurkland, A., Waller, M.J., Mycko, M.P., Ricketts, M., Comabella, M., Hammond, N., Kockum, I., McCann, O.T., Ban, M., Whittaker, P., Kempainen, A., Weston, P., Hawkins, C., Widaa, S., Zajicek, J., Dronov, S., Robertson, N., Bumpstead, S.J., Barcellos, L.F., Ravindrarajah, R., Abraham, R., Alfredsson, L., Ardlie, K., Aubin, C., Baker, A., Baker, K., Baranzini, S.E., Bergamaschi, L., Bergamaschi, R., Bernstein, A., Berthele, A., Boggild, M., Bradfield, J.P., Brassat, D., Broadley, S.A., Buck, D., Butzkueven, H., Capra, R., Carroll, W.M., Cavalla, P., Celius, E.G., Cepok, S., Chiavacci, R., Clerget-Darpoux, F., Clysters, K., Comi, G., Cossburn, M., Cournu-Rebeix, I., Cox, M.B., Cozen, W., Cree, B.A., Cross, A.H., Cusi, D., Daly, M.J., Davis, E., de Bakker, P.I., Debouverie, M., D'Hooghe M, B., Dixon, K., Dobosi, R., Dubois, B., Ellinghaus, D., Elovaara, I., Esposito, F., Fontenille, C., Foote, S., Franke, A., Galimberti, D., Ghezzi, A., Glessner, J., Gomez, R., Gout, O., Graham, C., Grant, S.F., Guerini, F.R., Hakonarson, H., Hall, P., Hamsten, A., Hartung, H.P., Heard, R.N., Heath, S., Hobart, J., Hoshi, M., Infante-Duarte, C., Ingram, G., Ingram, W., Islam, T., Jagodic, M., Kabesch, M., Kermod, A.G., Kilpatrick, T.J., Kim, C., Klopp, N., Koivisto, K., Larsson, M., Lathrop, M., Lechner-Scott, J.S., Leone, M.A., Leppa, V., Liljedahl, U., Bomfim, I.L., Lincoln, R.R., Link, J., Liu, J., Lorentzen, A.R., Lupoli, S., Macciardi, F., Mack, T., Marriott, M., Martinelli, V., Mason, D., McCauley, J.L., Mentch, F., Mero, I.L., Mihalova, T., Montalban, X., Mottershead, J., Myhr, K.M., Naldi, P., Ollier, W., Page, A., Palotie, A., Pelletier, J., Piccio, L., Pickersgill, T., Piehl, F., Pobywajlo, S., Quach, H.L., Ramsay, P.P., Reunanen, M., Reynolds, R., Rioux, J.D., Rodegher, M., Roesner, S., Rubio, J.P., Ruckert, I.M., Salvetti, M., Salvi, E., Santaniello, A., Schaefer, C.A., Schreiber, S., Schulze, C., Scott, R.J., Sellebjerg, F., Selmaj, K.W., Sexton, D., Shen, L., Simms-Acuna, B., Skidmore, S., Sleiman, P.M., Smestad, C., Sorensen, P.S., Sondergaard, H.B., Stankovich, J., Strange, R.C., Sulonen, A.M., Sundqvist, E., Syvanen, A.C., Taddeo, F., Taylor, B., Blackwell, J.M., Tienari, P., Bramon, E., Tourbah, A., Brown, M.A., Tronczynska, E., Casas, J.P., Tubridy, N., Corvin, A., Vickery, J., Jankowski, J., Villoslada, P., Markus, H.S., Wang, K., Mathew, C.G., Wason, J., Palmer, C.N., Wichmann, H.E., Plomin, R., Willoughby, E., Rautanen, A., Winkelmann, J., Wittig, M., Trembath, R.C., Yaouanq, J., Viswanathan, A.C., Zhang, H., Wood, N.W., Zuvich, R., Deloukas, P., Langford, C., Duncanson, A., Oksenberg, J.R., Pericak-Vance, M.A., Haines, J.L., Olsson, T., Hillert, J., Ivinson, A.J., De Jager, P.L., Peltonen, L., Stewart, G.J., Hafler, D.A., Hauser, S.L., McVean, G., Donnelly, P., Compston, A., 2011. Genetic risk and a primary role for cell-mediated immune mechanisms in multiple sclerosis. *Nature*. 476, 214-9.
- Saxena, A., Bauer, J., Scheikl, T., Zappulla, J., Audebert, M., Desbois, S., Waisman, A., Lassmann, H., Liblau, R.S., Mars, L.T., 2008. Cutting edge: Multiple sclerosis-like lesions induced by effector CD8 T cells recognizing a sequestered antigen on oligodendrocytes. *J Immunol*. 181, 1617-21.
- Scapini, P., Lamagna, C., Hu, Y., Lee, K., Tang, Q., DeFranco, A.L., Lowell, C.A., 2011. B cell-derived IL-10 suppresses inflammatory disease in Lyn-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 108, E823-32.
- Scollay, R.G., Butcher, E.C., Weissman, I.L., 1980. Thymus cell migration. Quantitative aspects of cellular traffic from the thymus to the periphery in mice. *Eur J Immunol*. 10, 210-8.
- Seddiki, N., Santner-Nanan, B., Martinson, J., Zaunders, J., Sasson, S., Landay, A., Solomon, M., Selby, W., Alexander, S.I., Nanan, R., Kelleher, A., Fazekas de St Groth, B., 2006. Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells. *J Exp Med*. 203, 1693-700.
- Segal, B.M., Constantinescu, C.S., Raychaudhuri, A., Kim, L., Fidelus-Gort, R., Kasper, L.H., 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.

- Serafini, B., Rosicarelli, B., Magliozzi, R., Stigliano, E., Aloisi, F., 2004. Detection of ectopic B-cell follicles with germinal centers in the meninges of patients with secondary progressive multiple sclerosis. *Brain Pathol.* 14, 164-74.
- Serafini, B., Rosicarelli, B., Franciotta, D., Magliozzi, R., Reynolds, R., Cinque, P., Andreoni, L., Trivedi, P., Salvetti, M., Faggioni, A., Aloisi, F., 2007. Dysregulated Epstein-Barr virus infection in the multiple sclerosis brain. *J Exp Med.* 204, 2899-912.
- Serra, P., Amrani, A., Yamanouchi, J., Han, B., Thiessen, S., Utsugi, T., Verdaguer, J., Santamaria, P., 2003. CD40 ligation releases immature dendritic cells from the control of regulatory CD4+CD25+ T cells. *Immunity.* 19, 877-89.
- Setoguchi, R., Hori, S., Takahashi, T., Sakaguchi, S., 2005. Homeostatic maintenance of natural Foxp3(+) CD25(+) CD4(+) regulatory T cells by interleukin (IL)-2 and induction of autoimmune disease by IL-2 neutralization. *J Exp Med.* 201, 723-35.
- Shah, S., Qiao, L., 2008. Resting B cells expand a CD4+CD25+Foxp3+ Treg population via TGF-beta3. *Eur J Immunol.* 38, 2488-98.
- Shevach, E.M., 2002. CD4+ CD25+ suppressor T cells: more questions than answers. *Nat Rev Immunol.* 2, 389-400.
- Shevach, E.M., DiPaolo, R.A., Andersson, J., Zhao, D.M., Stephens, G.L., Thornton, A.M., 2006. The lifestyle of naturally occurring CD4+ CD25+ Foxp3+ regulatory T cells. *Immunol Rev.* 212, 60-73.
- Shlomchik, M.J., Zharhary, D., Saunders, T., Camper, S.A., Weigert, M.G., 1993. A rheumatoid factor transgenic mouse model of autoantibody regulation. *Int Immunol.* 5, 1329-41.
- Shlomchik, M.J., 2008. Sites and stages of autoreactive B cell activation and regulation. *Immunity.* 28, 18-28.
- Singh, B., Read, S., Asseman, C., Malmstrom, V., Mottet, C., Stephens, L.A., Stepankova, R., Tlaskalova, H., Powrie, F., 2001. Control of intestinal inflammation by regulatory T cells. *Immunol Rev.* 182, 190-200.
- Smolders, J., Thewissen, M., Peelen, E., Menheere, P., Tervaert, J.W., Damoiseaux, J., Hupperts, R., 2009. Vitamin D status is positively correlated with regulatory T cell function in patients with multiple sclerosis. *PLoS One.* 4, e6635.
- Smolders, J., Peelen, E., Thewissen, M., Cohen Tervaert, J.W., Menheere, P., Hupperts, R., Damoiseaux, J., 2010. Safety and T cell modulating effects of high dose vitamin D3 supplementation in multiple sclerosis. *PLoS One.* 5, e15235.
- Soilu-Hanninen, M., Laaksonen, M., Laitinen, I., Eralinna, J.P., Lilius, E.M., 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, 152-7.
- Soper, D.M., Kasprovicz, D.J., Ziegler, S.F., 2007. IL-2Rbeta links IL-2R signaling with Foxp3 expression. *Eur J Immunol.* 37, 1817-26.
- Sospedra, M., Martin, R., 2005. Immunology of multiple sclerosis. *Annu Rev Immunol.* 23, 683-747.
- Srivastava, R., Aslam, M., Kalluri, S.R., Schirmer, L., Buck, D., Tackenberg, B., Rothhammer, V., Chan, A., Gold, R., Berthele, A., Bennett, J.L., Korn, T., Hemmer, B., 2012. Potassium channel KIR4.1 as an immune target in multiple sclerosis. *N Engl J Med.* 367, 115-23.
- Srivatsan, S., Peng, S.L., 2005. Cutting edge: Foxj1 protects against autoimmunity and inhibits thymocyte egress. *J Immunol.* 175, 7805-9.
- Steinman, R.M., Nussenzweig, M.C., 2002. Avoiding horror autotoxicus: the importance of dendritic cells in peripheral T cell tolerance. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99, 351-8.
- Stephens, L.A., Mottet, C., Mason, D., Powrie, F., 2001. Human CD4(+)CD25(+) thymocytes and peripheral T cells have immune suppressive activity in vitro. *Eur J Immunol.* 31, 1247-54.
- Stephens, L.A., Gray, D., Anderton, S.M., 2005. CD4+CD25+ regulatory T cells limit the risk of autoimmune disease arising from T cell receptor crossreactivity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102, 17418-23.
- Strauss, L., Bergmann, C., Gooding, W., Johnson, J.T., Whiteside, T.L., 2007. The frequency and suppressor function of CD4+CD25highFoxp3+ T cells in the circulation of patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clin Cancer Res.* 13, 6301-11.

- Stummvoll, G.H., DiPaolo, R.J., Huter, E.N., Davidson, T.S., Glass, D., Ward, J.M., Shevach, E.M., 2008. Th1, Th2, and Th17 effector T cell-induced autoimmune gastritis differs in pathological pattern and in susceptibility to suppression by regulatory T cells. *J Immunol.* 181, 1908-16.
- Sugihara, S., Izumi, Y., Yoshioka, T., Yagi, H., Tsujimura, T., Tarutani, O., Kohno, Y., Murakami, S., Hamaoka, T., Fujiwara, H., 1988. Autoimmune thyroiditis induced in mice depleted of particular T cell subsets. I. Requirement of Lyt-1 dull L3T4 bright normal T cells for the induction of thyroiditis. *J Immunol.* 141, 105-13.
- Sun, D., Whitaker, J.N., Huang, Z., Liu, D., Coleclough, C., Wekerle, H., Raine, C.S., 2001. Myelin antigen-specific CD8⁺ T cells are encephalitogenic and produce severe disease in C57BL/6 mice. *J Immunol.* 166, 7579-87.
- Sun, J.B., Flach, C.F., Czerkinsky, C., Holmgren, J., 2008. B lymphocytes promote expansion of regulatory T cells in oral tolerance: powerful induction by antigen coupled to cholera toxin B subunit. *J Immunol.* 181, 8278-87.
- Suri-Payer, E., Amar, A.Z., Thornton, A.M., Shevach, E.M., 1998. CD4⁺CD25⁺ T cells inhibit both the induction and effector function of autoreactive T cells and represent a unique lineage of immunoregulatory cells. *J Immunol.* 160, 1212-8.
- Surolia, I., Pirnie, S.P., Chellappa, V., Taylor, K.N., Cariappa, A., Moya, J., Liu, H., Bell, D.W., Driscoll, D.R., Diederichs, S., Haider, K., Netravali, I., Le, S., Elia, R., Dow, E., Lee, A., Freudenberg, J., De Jager, P.L., Chretien, Y., Varki, A., MacDonald, M.E., Gillis, T., Behrens, T.W., Bloch, D., Collier, D., Korzenik, J., Podolsky, D.K., Hafler, D., Murali, M., Sands, B., Stone, J.H., Gregersen, P.K., Pillai, S., 2010. Functionally defective germline variants of sialic acid acetyltransferase in autoimmunity. *Nature.* 466, 243-7.
- Suzuki, A., Yamaguchi, M.T., Ohteki, T., Sasaki, T., Kaisho, T., Kimura, Y., Yoshida, R., Wakeham, A., Higuchi, T., Fukumoto, M., Tsubata, T., Ohashi, P.S., Koyasu, S., Penninger, J.M., Nakano, T., Mak, T.W., 2001. T cell-specific loss of Pten leads to defects in central and peripheral tolerance. *Immunity.* 14, 523-34.
- Suzuki, H., Kundig, T.M., Furlonger, C., Wakeham, A., Timms, E., Matsuyama, T., Schmits, R., Simard, J.J., Ohashi, P.S., Griesser, H., et al., 1995. Deregulated T cell activation and autoimmunity in mice lacking interleukin-2 receptor beta. *Science.* 268, 1472-6.
- Tadokoro, C.E., Shakhar, G., Shen, S., Ding, Y., Lino, A.C., Maraver, A., Lafaille, J.J., Dustin, M.L., 2006. Regulatory T cells inhibit stable contacts between CD4⁺ T cells and dendritic cells in vivo. *J Exp Med.* 203, 505-11.
- Takahashi, T., Kuniyasu, Y., Toda, M., Sakaguchi, N., Itoh, M., Iwata, M., Shimizu, J., Sakaguchi, S., 1998. Immunologic self-tolerance maintained by CD25⁺CD4⁺ naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state. *Int Immunol.* 10, 1969-80.
- Takahashi, T., Tagami, T., Yamazaki, S., Uede, T., Shimizu, J., Sakaguchi, N., Mak, T.W., Sakaguchi, S., 2000. Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+)CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. *J Exp Med.* 192, 303-10.
- Takemura, S., Klimiuk, P.A., Braun, A., Goronzy, J.J., Weyand, C.M., 2001. T cell activation in rheumatoid synovium is B cell dependent. *J Immunol.* 167, 4710-8.
- Tang, Q., Henriksen, K.J., Boden, E.K., Tooley, A.J., Ye, J., Subudhi, S.K., Zheng, X.X., Strom, T.B., Bluestone, J.A., 2003. Cutting edge: CD28 controls peripheral homeostasis of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *J Immunol.* 171, 3348-52.
- Tang, Q., Boden, E.K., Henriksen, K.J., Bour-Jordan, H., Bi, M., Bluestone, J.A., 2004. Distinct roles of CTLA-4 and TGF-beta in CD4⁺CD25⁺ regulatory T cell function. *Eur J Immunol.* 34, 2996-3005.
- Tang, Q., Krummel, M.F., 2006. Imaging the function of regulatory T cells in vivo. *Curr Opin Immunol.* 18, 496-502.
- Tarasenko, T., Dean, J.A., Bolland, S., 2007. FcγRIIB as a modulator of autoimmune disease susceptibility. *Autoimmunity.* 40, 409-17.
- The IFNB Multiple Sclerosis Study Group, 1993. Interferon beta-1b is effective in relapsing-remitting multiple sclerosis. I. Clinical results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. The IFNB Multiple Sclerosis Study Group. *Neurology.* 43, 655-61.

- Thien, M., Phan, T.G., Gardam, S., Amesbury, M., Basten, A., Mackay, F., Brink, R., 2004. Excess BAFF rescues self-reactive B cells from peripheral deletion and allows them to enter forbidden follicular and marginal zone niches. *Immunity*. 20, 785-98.
- Thornton, A.M., Shevach, E.M., 1998. CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J Exp Med*. 188, 287-96.
- Thornton, A.M., Shevach, E.M., 2000. Suppressor effector function of CD4+CD25+ immunoregulatory T cells is antigen nonspecific. *J Immunol*. 164, 183-90.
- Thornton, A.M., Piccirillo, C.A., Shevach, E.M., 2004. Activation requirements for the induction of CD4+CD25+ T cell suppressor function. *Eur J Immunol*. 34, 366-76.
- Thornton, A.M., Korty, P.E., Tran, D.Q., Wohlfert, E.A., Murray, P.E., Belkaid, Y., Shevach, E.M., 2010. Expression of Helios, an Ikaros transcription factor family member, differentiates thymic-derived from peripherally induced Foxp3+ T regulatory cells. *J Immunol*. 184, 3433-41.
- Tian, J., Zekzer, D., Hanssen, L., Lu, Y., Olcott, A., Kaufman, D.L., 2001. Lipopolysaccharide-activated B cells down-regulate Th1 immunity and prevent autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice. *J Immunol*. 167, 1081-9.
- Tian, Y., Wu, G., Xing, J.C., Tang, J., Zhang, Y., Huang, Z.M., Jia, Z.C., Zhao, R., Tian, Z.Q., Wang, S.F., Chen, X.L., Wang, L., Wu, Y.Z., Ni, B., 2012. A novel splice variant of folate receptor 4 predominantly expressed in regulatory T cells. *BMC Immunol*. 13, 30.
- Tiegs, S.L., Russell, D.M., Nemazee, D., 1993. Receptor editing in self-reactive bone marrow B cells. *J Exp Med*. 177, 1009-20.
- Tiller, T., Tsuiji, M., Yurasov, S., Velinzon, K., Nussenzweig, M.C., Wardemann, H., 2007. Autoreactivity in human IgG+ memory B cells. *Immunity*. 26, 205-13.
- Tiller, T., Kofer, J., Kreschel, C., Busse, C.E., Riebel, S., Wickert, S., Oden, F., Mertes, M.M., Ehlers, M., Wardemann, H., 2010. Development of self-reactive germinal center B cells and plasma cells in autoimmune Fc gammaRIIB-deficient mice. *J Exp Med*. 207, 2767-78.
- Tonegawa, S., 1983. Somatic generation of antibody diversity. *Nature*. 302, 575-81.
- Townsend, M.J., Monroe, J.G., Chan, A.C., 2010. B-cell targeted therapies in human autoimmune diseases: an updated perspective. *Immunol Rev*. 237, 264-83.
- Tremlett, H., van der Mei, I.A., Pittas, F., Blizzard, L., Paley, G., Mesaros, D., Woodbaker, R., Nunez, M., Dwyer, T., Taylor, B.V., Ponsonby, A.L., 2008. Monthly ambient sunlight, infections and relapse rates in multiple sclerosis. *Neuroepidemiology*. 31, 271-9.
- Tsuiji, M., Yurasov, S., Velinzon, K., Thomas, S., Nussenzweig, M.C., Wardemann, H., 2006. A checkpoint for autoreactivity in human IgM+ memory B cell development. *J Exp Med*. 203, 393-400.
- Tu, W., Lau, Y.L., Zheng, J., Liu, Y., Chan, P.L., Mao, H., Dionis, K., Schneider, P., Lewis, D.B., 2008. Efficient generation of human alloantigen-specific CD4+ regulatory T cells from naive precursors by CD40-activated B cells. *Blood*. 112, 2554-62.
- Tzartos, J.S., Friese, M.A., Craner, M.J., Palace, J., Newcombe, J., Esiri, M.M., 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, 146-55.
- Tzartos, J.S., Khan, G., Vossenkamper, A., Cruz-Sadaba, M., Lonardi, S., Sefia, E., Meager, A., Elia, A., Middeldorp, J.M., Clemens, M., Farrell, P.J., Giovannoni, G., Meier, U.C., 2012. Association of innate immune activation with latent Epstein-Barr virus in active MS lesions. *Neurology*. 78, 15-23.
- Valmori, D., Merlo, A., Souleimanian, N.E., Hesdorffer, C.S., Ayyoub, M., 2005. A peripheral circulating compartment of natural naive CD4 Tregs. *J Clin Invest*. 115, 1953-62.
- van der Mei, I.A., Ponsonby, A.L., Dwyer, T., Blizzard, L., Simmons, R., Taylor, B.V., Butzkueven, H., Kilpatrick, T., 2003. Past exposure to sun, skin phenotype, and risk of multiple sclerosis: case-control study. *BMJ*. 327, 316.
- van Noort, J.M., Bajramovic, J.J., Plomp, A.C., van Stipdonk, M.J., 2000. Mistaken self, a novel model that links microbial infections with myelin-directed autoimmunity in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*. 105, 46-57.
- 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., Ader, H.J., Polman, C.H., 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, 351-7.
- Van Parijs, L., Biuckians, A., Ibragimov, A., Alt, F.W., Willerford, D.M., Abbas, A.K., 1997. Functional responses and apoptosis of CD25 (IL-2R alpha)-deficient T cells expressing a transgenic antigen receptor. *J Immunol*. 158, 3738-45.
- van Sechel, A.C., Bajramovic, J.J., van Stipdonk, M.J., Persoon-Deen, C., Geutskens, S.B., van Noort, J.M., 1999. EBV-induced expression and HLA-DR-restricted presentation by human B cells of alpha B-crystallin, a candidate autoantigen in multiple sclerosis. *J Immunol*. 162, 129-35.
- Vandenbark, A.A., Culbertson, N.E., Bartholomew, R.M., Huan, J., Agotsch, M., LaTocha, D., Yadav, V., Mass, M., Whitham, R., Lovera, J., Milano, J., Theofan, G., Chou, Y.K., Offner, H., Bourdette, D.N., 2008. Therapeutic vaccination with a trivalent T-cell receptor (TCR) peptide vaccine restores deficient FoxP3 expression and TCR recognition in subjects with multiple sclerosis. *Immunology*. 123, 66-78.
- Veldhoen, M., Hocking, R.J., Atkins, C.J., Locksley, R.M., Stockinger, B., 2006. TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity*. 24, 179-89.
- Venken, K., Hellings, N., Hensen, K., Rummens, J.L., Medaer, R., D'Hooghe M, B., Dubois, B., Raus, J., Stinissen, P., 2006. Secondary progressive in contrast to relapsing-remitting multiple sclerosis patients show a normal CD4+CD25+ regulatory T-cell function and FOXP3 expression. *J Neurosci Res*. 83, 1432-46.
- Venken, K., Hellings, N., Broekmans, T., Hensen, K., Rummens, J.L., Stinissen, P., 2008a. Natural naive CD4+CD25+CD127low regulatory T cell (Treg) development and function are disturbed in multiple sclerosis patients: recovery of memory Treg homeostasis during disease progression. *J Immunol*. 180, 6411-20.
- Venken, K., Hellings, N., Thewissen, M., Somers, V., Hensen, K., Rummens, J.L., Medaer, R., Hupperts, R., Stinissen, P., 2008b. Compromised CD4+ CD25(high) regulatory T-cell function in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis is correlated with a reduced frequency of FOXP3-positive cells and reduced FOXP3 expression at the single-cell level. *Immunology*. 123, 79-89.
- Venken, K., Hellings, N., Hensen, K., Rummens, J.L., Stinissen, P., 2010. Memory CD4+CD127high T cells from patients with multiple sclerosis produce IL-17 in response to myelin antigens. *J Neuroimmunol*. 226, 185-91.
- Verhagen, J., Wraith, D.C., 2010. Comment on "Expression of Helios, an Ikaros transcription factor family member, differentiates thymic-derived from peripherally induced Foxp3+ T regulatory cells". *J Immunol*. 185, 7129; author reply 7130.
- Viglietta, V., Baecher-Allan, C., Weiner, H.L., Hafler, D.A., 2004. Loss of functional suppression by CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. *J Exp Med*. 199, 971-9.
- Viglietta, V., Bourcier, K., Buckle, G.J., Healy, B., Weiner, H.L., Hafler, D.A., Egorova, S., Guttman, C.R., Rusche, J.R., Khoury, S.J., 2008. CTLA4Ig treatment in patients with multiple sclerosis: an open-label, phase 1 clinical trial. *Neurology*. 71, 917-24.
- Vignali, D.A., Collison, L.W., Workman, C.J., 2008. How regulatory T cells work. *Nat Rev Immunol*. 8, 523-32.
- Vinuesa, C.G., Sanz, I., Cook, M.C., 2009. Dysregulation of germinal centres in autoimmune disease. *Nat Rev Immunol*. 9, 845-57.
- von Budingen, H.C., Harrer, M.D., Kuenzle, S., Meier, M., Goebels, N., 2008. Clonally expanded plasma cells in the cerebrospinal fluid of MS patients produce myelin-specific antibodies. *Eur J Immunol*. 38, 2014-23.
- Vukusic, S., Van Bockstael, V., Gosselin, S., Confavreux, C., 2007. Regional variations in the prevalence of multiple sclerosis in French farmers. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 78, 707-9.
- Walker, L.S., Abbas, A.K., 2002. The enemy within: keeping self-reactive T cells at bay in the periphery. *Nat Rev Immunol*. 2, 11-9.
- Wallstrom, E., Khademi, M., Andersson, M., Weissert, R., Linington, C., Olsson, T., 1998. Increased reactivity to myelin oligodendrocyte glycoprotein peptides and epitope mapping in HLA DR2(15)+ multiple sclerosis. *Eur J Immunol*. 28, 3329-35.

- Wang, J., Ioan-Facsinay, A., van der Voort, E.I., Huizinga, T.W., Toes, R.E., 2007. Transient expression of FOXP3 in human activated nonregulatory CD4⁺ T cells. *Eur J Immunol.* 37, 129-38.
- Wardemann, H., Yurasov, S., Schaefer, A., Young, J.W., Meffre, E., Nussenzweig, M.C., 2003. Predominant autoantibody production by early human B cell precursors. *Science.* 301, 1374-7.
- Wardemann, H., Nussenzweig, M.C., 2007. B-cell self-tolerance in humans. *Adv Immunol.* 95, 83-110.
- Watanabe, N., Wang, Y.H., Lee, H.K., Ito, T., Cao, W., Liu, Y.J., 2005. Hassall's corpuscles instruct dendritic cells to induce CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in human thymus. *Nature.* 436, 1181-5.
- Watanabe, R., Ishiura, N., Nakashima, H., Kuwano, Y., Okochi, H., Tamaki, K., Sato, S., Tedder, T.F., Fujimoto, M., 2010. Regulatory B cells (B10 cells) have a suppressive role in murine lupus: CD19 and B10 cell deficiency exacerbates systemic autoimmunity. *J Immunol.* 184, 4801-9.
- Wei, B., Velazquez, P., Turovskaya, O., Spricher, K., Aranda, R., Kronenberg, M., Birnbaumer, L., Braun, J., 2005. Mesenteric B cells centrally inhibit CD4⁺ T cell colitis through interaction with regulatory T cell subsets. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102-6.
- Weigert, M., Gatmaitan, L., Loh, E., Schilling, J., Hood, L., 1978. Rearrangement of genetic information may produce immunoglobulin diversity. *Nature.* 276, 785-90.
- Wells, A.D., 2009. New insights into the molecular basis of T cell anergy: anergy factors, avoidance sensors, and epigenetic imprinting. *J Immunol.* 182, 7331-41.
- Wheeler, K.M., Samy, E.T., Tung, K.S., 2009. Cutting edge: normal regional lymph node enrichment of antigen-specific regulatory T cells with autoimmune disease-suppressive capacity. *J Immunol.* 183, 7635-8.
- Wildin, R.S., Ramsdell, F., Peake, J., Faravelli, F., Casanova, J.L., Buist, N., Levy-Lahad, E., Mazzella, M., Goulet, O., Perroni, L., Bricarelli, F.D., Byrne, G., McEuen, M., Proll, S., Appleby, M., Brunkow, M.E., 2001. X-linked neonatal diabetes mellitus, enteropathy and endocrinopathy syndrome is the human equivalent of mouse scurfy. *Nat Genet.* 27, 18-20.
- Willer, C.J., Dymont, D.A., Risch, N.J., Sadovnick, A.D., Ebers, G.C., 2003. Twin concordance and sibling recurrence rates in multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100, 12877-82.
- Willerford, D.M., Chen, J., Ferry, J.A., Davidson, L., Ma, A., Alt, F.W., 1995. Interleukin-2 receptor alpha chain regulates the size and content of the peripheral lymphoid compartment. *Immunity.* 3, 521-30.
- Willis, S.N., Stadelmann, C., Rodig, S.J., Caron, T., Gattenloehner, S., Mallozzi, S.S., Roughan, J.E., Almqvist, S.E., Blewett, M.M., Bruck, W., Hafler, D.A., O'Connor, K.C., 2009. Epstein-Barr virus infection is not a characteristic feature of multiple sclerosis brain. *Brain.* 132, 3318-28.
- Wingerchuk, D.M., Lesaux, J., Rice, G.P., Kremenutzky, M., Ebers, G.C., 2005. A pilot study of oral calcitriol (1,25-dihydroxyvitamin D3) for relapsing-remitting multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 76, 1294-6.
- Wolf, S.D., Dittel, B.N., Hardardottir, F., Janeway, C.A., Jr., 1996. Experimental autoimmune encephalomyelitis induction in genetically B cell-deficient mice. *J Exp Med.* 184, 2271-8.
- Wucherpfennig, K.W., 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.
- Wynn, D., Kaufman, M., Montalban, X., Vollmer, T., Simon, J., Elkins, J., O'Neill, G., Neyer, L., Sheridan, J., Wang, C., Fong, A., Rose, J.W., 2010. Daclizumab in active relapsing multiple sclerosis (CHOICE study): a phase 2, randomised, double-blind, placebo-controlled, add-on trial with interferon beta. *Lancet Neurol.* 9, 381-90.
- Xia, Z.W., Xu, L.Q., Zhong, W.W., Wei, J.J., Li, N.L., Shao, J., Li, Y.Z., Yu, S.C., Zhang, Z.L., 2007. Heme oxygenase-1 attenuates ovalbumin-induced airway inflammation by up-regulation of foxp3 T-regulatory cells, interleukin-10, and membrane-bound transforming growth factor-1. *Am J Pathol.* 171, 1904-14.
- Xiao, S., Brooks, C.R., Zhu, C., Wu, C., Sweere, J.M., Petecka, S., Yeste, A., Quintana, F.J., Ichimura, T., Sobel, R.A., Bonventre, J.V., Kuchroo, V.K., 2012. Defect in regulatory B-cell

- function and development of systemic autoimmunity in T-cell Ig mucin 1 (Tim-1) mucin domain-mutant mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 109, 12105-10.
- Yamaguchi, T., Hirota, K., Nagahama, K., Ohkawa, K., Takahashi, T., Nomura, T., Sakaguchi, S., 2007. Control of immune responses by antigen-specific regulatory T cells expressing the folate receptor. *Immunity.* 27, 145-59.
- Yanaba, K., Bouaziz, J.D., Haas, K.M., Poe, J.C., Fujimoto, M., Tedder, T.F., 2008. A regulatory B cell subset with a unique CD1dhiCD5⁺ phenotype controls T cell-dependent inflammatory responses. *Immunity.* 28, 639-50.
- Yanaba, K., Bouaziz, J.D., Matsushita, T., Tsubata, T., Tedder, T.F., 2009. The development and function of regulatory B cells expressing IL-10 (B10 cells) requires antigen receptor diversity and TLR signals. *J Immunol.* 182, 7459-72.
- Yu, P., Gregg, R.K., Bell, J.J., Ellis, J.S., Divekar, R., Lee, H.H., Jain, R., Waldner, H., Hardaway, J.C., Collins, M., Kuchroo, V.K., Zaghoulani, H., 2005. Specific T regulatory cells display broad suppressive functions against experimental allergic encephalomyelitis upon activation with cognate antigen. *J Immunol.* 174, 6772-80.
- Zabransky, D.J., Nirschl, C.J., Durham, N.M., Park, B.V., Ceccato, C.M., Bruno, T.C., Tam, A.J., Getnet, D., Drake, C.G., 2012. Phenotypic and functional properties of Helios⁺ regulatory T cells. *PLoS One.* 7, e34547.
- Zarek, P.E., Huang, C.T., Lutz, E.R., Kowalski, J., Horton, M.R., Linden, J., Drake, C.G., Powell, J.D., 2008. A2A receptor signaling promotes peripheral tolerance by inducing T-cell anergy and the generation of adaptive regulatory T cells. *Blood.* 111, 251-9.
- Zhang, J., Weiner, H.L., Hafler, D.A., 1992. Autoreactive T cells in multiple sclerosis. *Int Rev Immunol.* 9, 183-201.
- Zhang, X., Koldzic, D.N., Izikson, L., Reddy, J., Nazareno, R.F., Sakaguchi, S., Kuchroo, V.K., Weiner, H.L., 2004. IL-10 is involved in the suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells. *Int Immunol.* 16, 249-56.
- Zhang, X., Reddy, J., Ochi, H., Frenkel, D., Kuchroo, V.K., Weiner, H.L., 2006. Recovery from experimental allergic encephalomyelitis is TGF-beta dependent and associated with increases in CD4⁺LAP⁺ and CD4⁺CD25⁺ T cells. *Int Immunol.* 18, 495-503.
- Zhang, X., Deriaud, E., Jiao, X., Braun, D., Leclerc, C., Lo-Man, R., 2007. Type I interferons protect neonates from acute inflammation through interleukin 10-producing B cells. *J Exp Med.* 204, 1107-18.
- Zheng, J., Liu, Y., Lau, Y.L., Tu, W., 2010. CD40-activated B cells are more potent than immature dendritic cells to induce and expand CD4(+) regulatory T cells. *Cell Mol Immunol.* 7, 44-50.
- Zhou, D., Srivastava, R., Nessler, S., Grummel, V., Sommer, N., Bruck, W., Hartung, H.P., Stadelmann, C., 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, 19057-62.
- Zozulya, A.L., Wiendl, H., 2008. The role of regulatory T cells in multiple sclerosis. *Nat Clin Pract Neurol.* 4, 384-98.

ANNEXE

Caractérisation des TCR des cellules T infiltrantes dans la sclérose en plaques de forme rémittente et recherche de l'antigène reconnu.

Durant ma thèse, j'ai également travaillé avec le Dr Laplaud sur un projet portant sur l'étude et la caractérisation du TCR de clones potentiellement impliqués dans la SEP. Dans ce cadre, j'ai pu redéveloppé des techniques de *CDR3 spectratyping* qui avaient été utilisées au laboratoire il y a une dizaine d'années (Berthelot et al., 2010; Brouard et al., 1999; Brouard et al., 2005; Degauque et al., 2011; Gagne et al., 2000; Guillet et al., 2002; Lair et al., 2007; Laplaud et al., 2004; Laplaud et al., 2006; Miqueu et al., 2007; Miqueu et al., 2010). Mais j'ai également développé la culture et l'amplification de cellules de LCR ainsi que la transfection de plasmides au sein d'hybridomes T murins. Par la suite, je vais donc résumer rapidement les avancées de ce travail, toujours en cours.

1- Contexte et hypothèse de travail :

Le système immunitaire est, de manière certaine, impliqué dans la pathogénie de la SEP. Des études sur le modèle animal de la SEP, l'EAE, ont démontré que les lymphocytes T auto-réactifs - surtout CD4⁺ - jouaient un rôle prédominant dans la maladie (Ben-Nun et al., 1981; Friese and Fugger, 2009).

Plus récemment, et grâce notamment à des études chez l'homme, le rôle potentiel des LT CD8⁺ dans la SEP a émergé (Friese and Fugger, 2009; Saxena et al., 2011). Certains travaux montrent que ces cellules sont prépondérantes dans les lésions aiguës de SEP (Babbe et al., 2000; Friese and Fugger, 2009). De plus, plusieurs équipes, dont la nôtre, ont mis en évidence une sélection oligoclonale de lymphocytes CD8⁺ au sein de lésions démyélinisantes actives du SNC de patients atteints de SEP suggérant une réponse immunitaire antigène dépendante identique dans les différents endroits du SNC touchés par la maladie (Babbe et al., 2000; Junker et al., 2007; Montes et al., 2009). Dans le sang circulant, il est également retrouvé des anomalies du répertoire T, CD8 dépendantes, et corrélées avec l'accumulation de nouvelles lésions IRM (Laplaud et al., 2004; Laplaud et al., 2006).

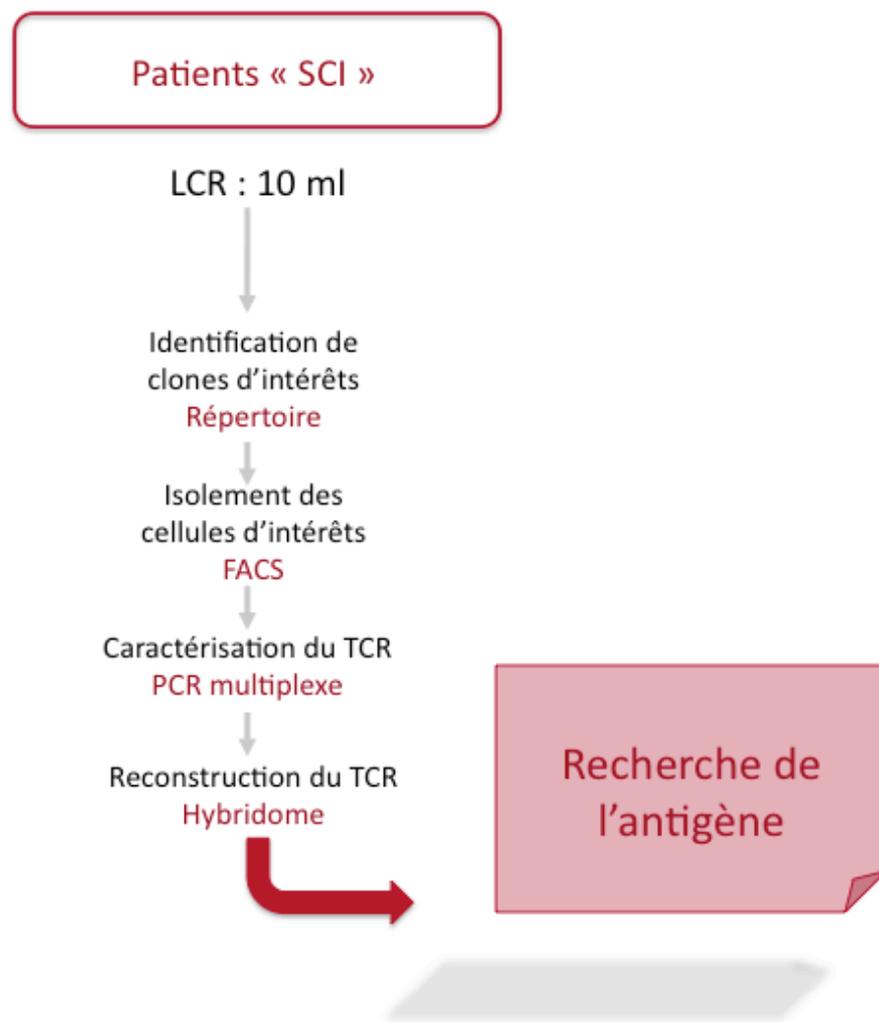
Néanmoins une question primordiale demeure : **Quelle est la cible antigénique de ces Lymphocytes T CD8⁺ qui infiltrent le SNC ?** A travers les modèles animaux, de nombreux antigènes candidats ont été proposés, mais aucune preuve directe n'a été apportée de leur réelle implication dans ces mécanismes d'auto-réactivité. S'agit-il des mêmes antigènes d'un patient à l'autre ? Chez un même patient au cours du temps ? Ou existe-t-il une dispersion

d'antigène ? Ce sont autant de questions que nous essayons de résoudre dans ce travail. L'objectif principal de cette étude est donc de permettre la caractérisation des antigènes reconnus par les lymphocytes T infiltrant le SNC chez les patients atteints de sclérose en plaques de forme rémittente. Pour cela, nous avons décidé de recruter essentiellement des patients au tout début de la maladie (Syndrome Cliniquement Isolé, SCI). Les récepteurs des clones T prédominants issus du LCR d'un patient ont ainsi pu être identifiés. L'un de ces TCR a par la suite été exprimé au sein d'une lignée d'hybridomes qui servira à réaliser un screening d'antigènes.

Ce projet pourrait donc conduire à des avancées significatives en termes de compréhension de la physiopathologie de la maladie et de développement de nouveaux axes thérapeutiques.

2- Méthodologie :

Stratégie générale :



2.1 Sélection des patients. Etude du répertoire T :

Les patients recrutés doivent avoir présentés un premier événement démyélinisant (SCI), et sont donc au tout début de leur maladie. Néanmoins, les patients recrutés avaient tous des lésions évocatrices de SEP et répondaient aux critères de dissémination spatiale utilisés dans la classification de McDonald 2005 (Polman et al., 2005). De plus, l'analyse du LCR révélait la présence de bandes oligoclonales. Chez ces patients, un échantillon de sang et de LCR a été prélevé lors de l'apparition des premiers symptômes.

L'étude du répertoire T a donc été réalisée chez ces patients dans le sang et le LCR.

Afin d'effectuer cette analyse du répertoire T des patients, les cellules mononuclées du sang et du LCR ont été isolées puis l'ARN extrait et rétrotranscrit en cDNA. Celui-ci a alors été amplifié par PCR à l'aide d'une amorce C β et d'une des 24 amorces spécifiques V β . L'analyse de la région hypervariable du TCR, le CDR3, a été réalisée grâce à l'utilisation de la méthode de *CDR3 spectratyping* (cf. Figure 1) permettant une quantification relative des transcrits codant pour les différentes longueurs de CDR3 et ce pour chaque famille V β .

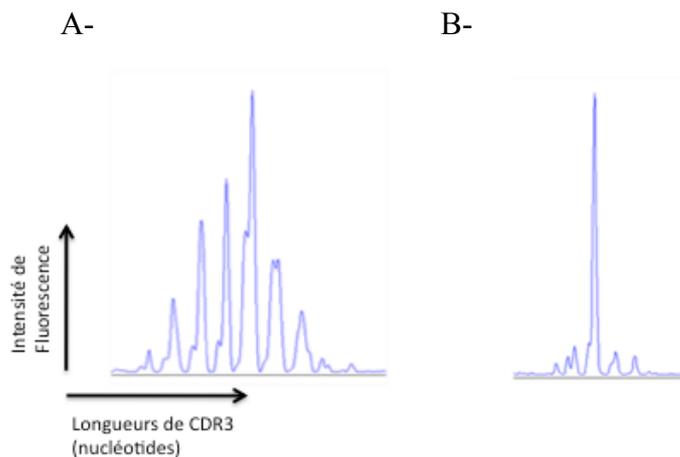


Figure 1: *CDR3 spectratyping d'une famille V β (V β 11) des lymphocytes CD8⁺ d'un témoin (A) et d'un patient (B). A- Répartition gaussienne des différentes longueurs de CDR3. B- Surreprésentation d'une longueur de CDR3 traduisant une sélection monoclonale.*

Grâce à cette technique, Il est alors possible de déterminer pour chaque individu les familles V β ayant une répartition oligoclonale des longueurs de CDR3. Un séquençage des familles monoclonales a par la suite été réalisé. Cette étape d'identification des familles d'intérêt a permis ainsi de diriger le tri cellulaire vers les populations choisies.

2.2 Tri et purification des cellules monoclonales T par FACS ARIA :

Les cellules mononuclées du LCR de chaque patient concerné ont par la suite été marquées avec des anticorps anti CD3 et anti CD8 mais également avec un anticorps spécifique dirigé contre la chaîne V β choisie. Ces cellules cibles ont pu être triées à une cellule par puits grâce à un cytomètre trieur permettant d'isoler des cellules correspondant à nos marquages.

2.3 Mise en évidence des paires de chaînes α/β composant le TCR de ces cellules :

Après la réalisation d'une rétro-transcription et d'une pré-amplification, nous avons réalisé une amplification de la chaîne β par PCR à l'aide d'amorces V β spécifiques correspondant à la cellule isolée. Nous avons ainsi pu vérifier que la cellule sélectionnée correspondait bien au clone observé en *CDR3 spectratyping*. Dans un deuxième temps, nous avons identifié la chaîne α du TCR par des techniques de PCR multiplexes. Un séquençage de l'ADN amplifié permet ainsi d'obtenir l'identité de la chaîne α et donc du TCR dans son ensemble. Cette technique a déjà été utilisée avec succès dans la polymyosite et dans la myosite à inclusion par l'équipe avec laquelle nous collaborons pour ce projet (K. Dornmair, MPI – Munich) (Seitz et al., 2006).

2.4 Reconstruction du TCR α/β et expression de celui-ci par un hybridome :

Après identification des chaînes α et β du TCR, nous les avons reconstituées et exprimées au sein d'une lignée d'hybridome T murin 58_{q7} par transfection à l'aide d'un plasmide pRSVneo (Collaboration avec la plateforme de biologie moléculaire de l'unité). Ces hybridomes ont la particularité de sécréter de l'IL-2 après reconnaissance spécifique de l'antigène.

2.5 Identification de l'antigène reconnu par ce TCR :

Un pool d'antigènes candidats sera alors testé, et la reconnaissance spécifique du TCR de l'hybridome sera évaluée grâce à sa production d'IL-2. Pour cela, nous réaliserons des cocultures d'hybridomes et de DCs (porteurs de CMH-I du patient) sur 14 heures. La sécrétion d'IL-2 dans les surnageants sera ensuite dosée en ELISA.

En cas d'échec, nous réaliserons une méthode de *scanning* de bibliothèques de peptides (Pinilla et al., 2001; Sospedra et al., 2010), en collaboration avec C. Pinilla, San Diego.

3- Résultats :

1. Trois patients ayant présenté un SCI (actuellement diagnostiqués en SEP) ont été inclus dans l'étude. Des prélèvements de LCR et de sang ont été réalisés lors de leur hospitalisation.
2. L'étude du répertoire des LT a été réalisée sur le LCR des patients et nous a permis d'identifier plusieurs familles V β d'intérêt (aspect monoclonal). Pour l'un des patients, le séquençage de ces familles nous a permis d'identifier un clone V β 11 et quatre clones V β 13.2.
3. Un tri en single cell ARIA des LT CD4⁺ et CD8⁺ V β 11 et V β 13.2 a été ensuite réalisé sur les LT du LCR et les cellules correspondant aux clones d'intérêt ont pu être identifiées.
4. La chaîne α du TCR de ces clones a été recherchée par des méthodes de PCR multiplexe. Pour les quatre clones V β 13.2, la chaîne α associée à la chaîne β a pu être analysée permettant l'identification complète de la séquence du TCR pour ces clones.

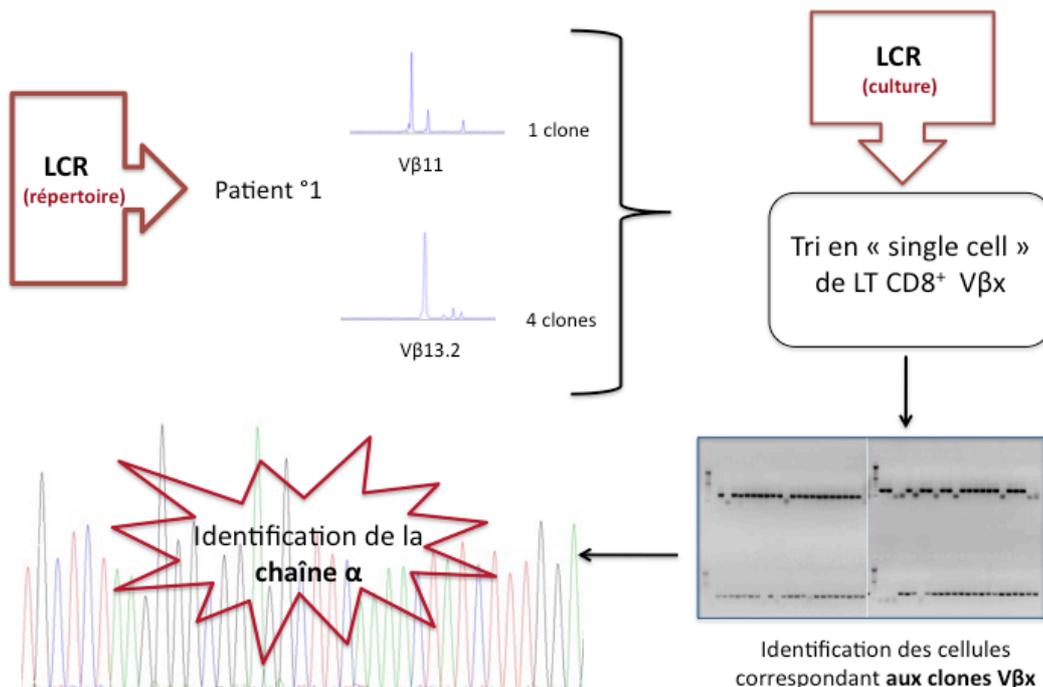


Figure 2: Chez le patient n°1: Deux familles V β 11 et V β 13.2 ont été identifiées comme très altérées après étude du répertoire du LCR. Cinq clones ont été identifiés après séquençage. Sur les cellules du LCR conservées en culture, un tri de cellules uniques CD8⁺ a été réalisé, correspondant à la famille V β d'intérêt. Puis, après identification des clones d'intérêt, par une méthode de PCR multiplexe, la chaîne α a pu être séquençée pour les clones de la famille V β 13.2.

Pour le clone V β 11, aucune chaîne α n'a pu être identifiée, aussi bien dans les cellules T CD4⁺ que les CD8⁺. Il est possible que la culture et l'amplification des cellules du LCR entraînent, chez nos clones, un phénomène d'AICD (Activation Induced Cell Death). Ce qui expliquerait qu'il ait été difficile dans un second temps de trier et d'isoler ces cellules. Il est aussi possible que la culture, qui est non spécifique, provoque la prolifération de clones minoritaires modifiant ainsi la répartition clonale de la famille V β étudiée.

Afin d'éviter ce phénomène, nous avons décidé, chez un autre patient, de ne pas amplifier les cellules du LCR, et de les conserver dans du milieu 48h seulement avant le tri. Les résultats sont actuellement en cours.

5. Dans un troisième temps, nous avons reconstruit, avec l'aide de L. Tesson (Plate forme de Biologie moléculaire), les deux chaînes d'un des TCR V β 13.2 au sein d'un plasmide pRSVneo. Puis, par une méthode d'électroporation, ces deux chaînes ont été transfectées au sein des hybridomes T murin 58_{cp}⁷. Par la suite, nous avons transfectés les hybridomes avec le CD8, par coculture avec des cellules GP+E 86 et sélectionnés par un antibiotique. Nous avons ainsi pu obtenir plusieurs millions d'hybridomes CD8⁺ V β 13.2⁺.

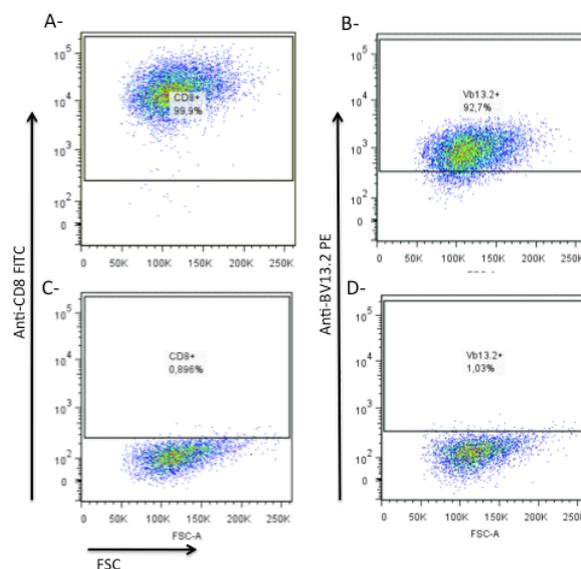


Figure 3 : Fréquence des hybridomes T V β 13.2⁺ et CD8⁺ (A-B) et des hybridomes non transfectés (C-D) par analyse en cytométrie en flux. A- Marquage des hybridomes avec un anti CD8-FITC, Plus de 99% des hybridomes après tri au cytomètre trieur sont CD8⁺ (A). B- Marquage des hybridomes avec un anti V β 13.2-PE, plus de 90% des hybridomes triés sont V β 13.2⁺ (B).

6. Dans les prochains mois, nous prévoyons de tester des pools d'antigènes candidats composés de peptides de la myéline déjà testés par une ancienne étudiante du laboratoire (Berthelot et al., 2008) (cf méthodologie).

Conclusion/perspectives :

L'intérêt de ce travail réside dans la réponse qu'il peut apporter à une problématique majeure dans la sclérose en plaques : **Quels sont les antigènes impliqués dans le déclenchement de la maladie ? S'agit-il d'antigènes publics ou privés ? Se modifient-ils au cours du temps ?** Ce projet ambitieux peut permettre, par des moyens originaux, de répondre en partie à cette question par l'identification du TCR des lymphocytes infiltrants potentiellement les lésions du SNC et donc de faciliter la compréhension des mécanismes physiopathologiques qui sous tendent la maladie. La découverte de ces antigènes aurait des conséquences sur le plan thérapeutique en permettant éventuellement le développement de thérapies ciblant spécifiquement les lymphocytes T autoréactifs impliqués dans la maladie (médecine individuelle).

Références :

- Babbe, H., Roers, A., Waisman, A., Lassmann, H., Goebels, N., Hohlfeld, R., Friese, M., Schroder, R., Deckert, M., Schmidt, S., Ravid, R., Rajewsky, K., 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.
- Ben-Nun, A., Wekerle, H., Cohen, I.R., 1981. Vaccination against autoimmune encephalomyelitis with T-lymphocyte line cells reactive against myelin basic protein. *Nature.* 292, 60-1.
- Berthelot, L., Laplaud, D.A., Pettre, S., Ballet, C., Michel, L., Hillion, S., Braudeau, C., Connan, F., Lefrere, F., Wiertlewski, S., Guillet, J.G., Brouard, S., Choppin, J., Soullillou, J.P., 2008. Blood CD8+ T cell responses against myelin determinants in multiple sclerosis and healthy individuals. *Eur J Immunol.* 38, 1889-99.
- Berthelot, L., Miqueu, P., Pettre, S., Guillet, M., Moynard, J., Wiertlewski, S., Lefrere, F., Brouard, S., Soullillou, J.P., Laplaud, D.A., 2010. Failure of glatiramer acetate to modify the peripheral T cell repertoire of relapsing-remitting multiple sclerosis patients. *Clin Immunol.* 135, 33-42.
- Brouard, S., Vanhove, B., Gagne, K., Neumann, A., Douillard, P., Moreau, A., Cuturi, C., Soullillou, J.P., 1999. T cell repertoire alterations of vascularized xenografts. *J Immunol.* 162, 3367-77.
- Brouard, S., Dupont, A., Giral, M., Louis, S., Lair, D., Braudeau, C., Degauque, N., Moizant, F., Pallier, A., Ruiz, C., Guillet, M., Laplaud, D., Soullillou, J.P., 2005. Operationally tolerant and minimally immunosuppressed kidney recipients display strongly altered blood T-cell clonal regulation. *Am J Transplant.* 5, 330-40.
- Degauque, N., Boeffard, F., Foucher, Y., Ballet, C., Brouard, S., 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.
- Friese, M.A., Fugger, L., 2009. Pathogenic CD8(+) T cells in multiple sclerosis. *Ann Neurol.* 66, 132-41.
- Gagne, K., Brouard, S., Giral, M., Sebille, F., Moreau, A., Guillet, M., Bignon, J.D., Imbert, B.M., Cuturi, M.C., Soullillou, J.P., 2000. Highly altered V beta repertoire of T cells infiltrating long-term rejected kidney allografts. *J Immunol.* 164, 1553-63.
- Guillet, M., Brouard, S., Gagne, K., Sebille, F., Cuturi, M.C., Delsuc, M.A., Soullillou, J.P., 2002. Different qualitative and quantitative regulation of V beta TCR transcripts during early acute allograft rejection and tolerance induction. *J Immunol.* 168, 5088-95.
- Junker, A., Ivanidze, J., Malotka, J., Eiglmeier, I., Lassmann, H., Wekerle, H., Meinl, E., Hohlfeld, R., Dornmair, K., 2007. Multiple sclerosis: T-cell receptor expression in distinct brain regions. *Brain.* 130, 2789-99.
- Lair, D., Degauque, N., Miqueu, P., Jovanovic, V., Guillet, M., Merieau, E., Moreau, A., Soullillou, J.P., Brouard, S., 2007. Functional compartmentalization following induction of long-term graft survival with pregraft donor-specific transfusion. *Am J Transplant.* 7, 538-49.
- Laplaud, D.A., Ruiz, C., Wiertlewski, S., Brouard, S., Berthelot, L., Guillet, M., Melchior, B., Degauque, N., Edan, G., Brachet, P., Damier, P., Soullillou, J.P., 2004. Blood T-cell receptor beta chain transcriptome in multiple sclerosis. Characterization of the T cells with altered CDR3 length distribution. *Brain.* 127, 981-95.
- Laplaud, D.A., Berthelot, L., Miqueu, P., Bourcier, K., Moynard, J., Oudinet, Y., Guillet, M., Ruiz, C., Oden, N., Brouard, S., Guttman, C.R., Weiner, H.L., Khoury, S.J., Soullillou, J.P., 2006. Serial blood T cell repertoire alterations in multiple sclerosis patients; correlation with clinical and MRI parameters. *J Neuroimmunol.* 177, 151-60.
- Miqueu, P., Guillet, M., Degauque, N., Dore, J.C., Soullillou, J.P., Brouard, S., 2007. Statistical analysis of CDR3 length distributions for the assessment of T and B cell repertoire biases. *Mol Immunol.* 44, 1057-64.
- Miqueu, P., Degauque, N., Guillet, M., Giral, M., Ruiz, C., Pallier, A., Braudeau, C., Roussey-Kesler, G., Ashton-Chess, J., Dore, J.C., Thervet, E., Legendre, C., Hernandez-Fuentes, M.P., Warrens, A.N., Goldman, M., Volk, H.D., Janssen, U., Wood, K.J., Lechler, R.I., Bertrand, D., Sebille, V., Soullillou, J.P., Brouard, S., 2010. Analysis of the peripheral T-cell repertoire in kidney transplant patients. *Eur J Immunol.* 40, 3280-90.

-
- Montes, M., Zhang, X., Berthelot, L., Laplaud, D.A., Brouard, S., Jin, J., Rogan, S., Armao, D., Jewells, V., Soullillou, J.P., Markovic-Plese, S., 2009. Oligoclonal myelin-reactive T-cell infiltrates derived from multiple sclerosis lesions are enriched in Th17 cells. *Clin Immunol.* 130, 133-44.
- Pinilla, C., Rubio-Godoy, V., Dutoit, V., Guillaume, P., Simon, R., Zhao, Y., Houghten, R.A., Cerottini, J.C., Romero, P., Valmori, D., 2001. Combinatorial peptide libraries as an alternative approach to the identification of ligands for tumor-reactive cytolytic T lymphocytes. *Cancer Res.* 61, 5153-60.
- Polman, C.H., Reingold, S.C., Edan, G., Filippi, M., Hartung, H.P., Kappos, L., Lublin, F.D., Metz, L.M., McFarland, H.F., O'Connor, P.W., Sandberg-Wollheim, M., Thompson, A.J., Weinshenker, B.G., Wolinsky, J.S., 2005. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2005 revisions to the "McDonald Criteria". *Ann Neurol.* 58, 840-6.
- Saxena, A., Martin-Blondel, G., Mars, L.T., Liblau, R.S., 2011. Role of CD8 T cell subsets in the pathogenesis of multiple sclerosis. *FEBS Lett.* 585, 3758-63.
- Seitz, S., Schneider, C.K., Malotka, J., Nong, X., Engel, A.G., Wekerle, H., Hohlfeld, R., 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, 12057-62.
- Sospedra, M., Zhao, Y., Giulianotti, M., Simon, R., Pinilla, C., Martin, R., 2010. Combining positional scanning peptide libraries, HLA-DR transfectants and bioinformatics to dissect the epitope spectrum of HLA class II cross-restricted CD4+ T cell clones. *J Immunol Methods.* 353, 93-101.



Patients with relapsing-remitting multiple sclerosis have normal Treg function when cells expressing IL-7 receptor α -chain are excluded from the analysis

Laure Michel,^{1,2} Laureline Berthelot,¹ Ségolène Pettré,¹ Sandrine Wiertlewski,^{2,3} Fabienne Lefrère,³ Cécile Braudeau,¹ Sophie Brouard,¹ Jean-Paul Soullou,¹ and David-Axel Laplaud^{1,2,3}

¹INSERM U643, CHU Nantes, Institut de Transplantation et de Recherche en Transplantation (ITERT), and Faculté de Médecine, Université de Nantes, Nantes, France. ²Service de Neurologie and ³INSERM CIC004, CHU Nantes, Nantes, France.

Multiple sclerosis (MS) is a chronic inflammatory disease that results in demyelination in the central nervous system, and a defect in the regulatory function of CD4⁺CD25^{high} T cells has been implicated in the pathogenesis of the disease. Here, we reanalyzed the function of this T cell subset in patients with MS, but we depleted cells expressing IL-7 receptor α -chain (CD127), a marker recently described as present on activated T cells but not Tregs. Similar to other studies, we observed a marked defect in the suppressive function of unseparated CD4⁺CD25^{high} T cells isolated from MS patients. However, when CD127^{high} cells were removed from the CD4⁺CD25^{high} population, patient and control cells inhibited T cell proliferation and cytokine production equally. Likewise, when the CD25 gate used to sort the cells was stringent enough to eliminate CD127^{high} cells, CD4⁺CD25^{high} T cells from patients with MS and healthy individuals had similar regulatory function. Additional analysis indicated that the CD127^{high} cells within the CD4⁺CD25^{high} T cell population from patients with MS appeared more proliferative and secreted more IFN- γ and IL-2 than the same cells from healthy individuals. Taken together, we conclude that CD4⁺CD25^{high}CD127^{low} Tregs from MS patients and healthy individuals exhibit similar suppressive functions. The decreased inhibitory function of unfractionated CD4⁺CD25^{high} cells previously observed might be due to abnormal activation of CD127^{high} T cells in patients with MS.

Introduction

In the adaptive immune system, the balance between the efficient recognition of pathogens and the control of autoimmune diseases is assumed by deletion of autoreactive clones and mechanisms of peripheral tolerance in which Tregs have a key role (1, 2). Such a role for Tregs was first described by Sakaguchi and colleagues, opening the way for the description of different types of Tregs (3, 4). The same group identified the transcription factor FOXP3 as the hallmark of regulatory function (5–7). However, FOXP3 cannot be used to isolate living Tregs because of its intracellular expression. In addition, FOXP3 can also be expressed by activated cells (8–10). Natural Tregs also express IL-2 receptor α -chain (IL-2R α chain, also known as CD25), a cell surface marker commonly used to distinguish among regulatory (CD25^{high}), activated (CD25^{int}), and naive (CD25^{low}) T cells (11, 12) in humans. However, despite CD25 being a useful marker, the level of CD25 expression alone does not enable a precise estimation of the content of Tregs within a biological sample. Recently, Seddiki et al. (13) and Liu et al. (14) showed that, in humans, low expression of IL-7R α chain (CD127) combined with high expression of CD25 enables better isolation and purification of Treg populations among CD4⁺CD25⁺ T cells. In functional assays, CD4⁺CD25^{high}CD127^{low} T cells are highly suppressive. Furthermore, expression of CD127 negatively

correlates with FOXP3 content, since FOXP3 interacts with the CD127 promoter, contributing to the low expression of CD127 in CD4⁺CD25^{high} Tregs (14).

MS is a chronic inflammatory and demyelinating disease of the central nervous system. This disorder is thought to be initiated by autoreactive T cells recognizing peptides from myelin sheath proteins (15, 16). However, there is no compelling evidence that the frequency of autoreactive cells is increased in MS versus age-matched controls (17). In an initial study, the frequency of CD4⁺CD25^{high} T cells was found to be normal, but the authors did not assess functional suppression (18). Several studies have sought to prove the hypothesis of a reduced suppressive function of this T cell subset in MS (19–21). Viglietta et al. (21) reported a decrease in the regulatory function of CD4⁺CD25^{high} T cells from the peripheral blood of patients with relapsing-remitting MS (RR-MS) compared with healthy individuals (HIs). In addition, the levels of FOXP3 have also been reported as decreased, both at the single cell level and in the CD4⁺CD25⁺ population (22, 23). Hence, a defect in the control of the *in vitro* proliferative response of MS patient CD4⁺ T cells to myelin proteins has also been reported (19, 20). However, in all of these studies, a single-step CD25 enrichment protocol was used to isolate the T cell populations tested in a coculture system in which the regulatory potency assessment was based on the inhibition of CD4⁺CD25⁻ cell growth following polyclonal stimulation.

In this study, we took advantage of new CD4⁺CD25^{high} markers to revisit CD4 T cell regulatory function in MS patients. For this purpose, we used CD127-depleted cells to more precisely characterize the regulatory properties of CD4⁺CD25^{high} T cells from MS

Nonstandard abbreviations used: HI, healthy individual; RR-MS, relapsing-remitting MS.

Conflict of interest: The authors have declared that no conflict of interest exists.

Citation for this article: *J. Clin. Invest.* 118:3411–3419 (2008). doi:10.1172/JCI35365.

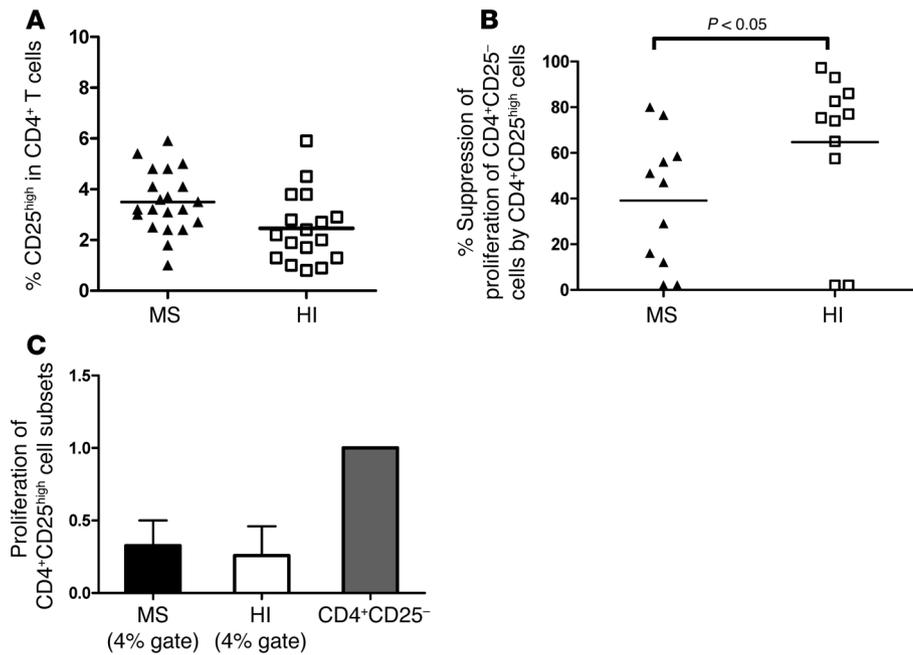


Figure 1

Frequency, proliferation, and suppressive activity of the top 4% of sorted CD4⁺CD25^{high} T cells from MS patients and HIs. **(A)** Comparison of the percentage of CD4⁺CD25^{high} T cells from MS patients and controls. The cut-off for high-staining CD25 was placed at 6×10^3 of mean fluorescence intensity. No statistical difference can be shown between the groups (patients, $n = 21$; HI, $n = 17$). **(B)** Regulatory properties of CD4⁺CD25^{high} cells were examined in 11 untreated patients with RR-MS and 11 healthy controls. Cocultures of CD4⁺CD25⁻ and CD4⁺CD25^{high} cells were performed at a 1:1 ratio and under anti-CD3 stimulation. Proliferation was measured by incorporation of ³H-thymidine after 5 days of incubation. The percentage of suppression of responding cell proliferation (CD4⁺CD25⁻) by CD4⁺CD25^{high} cells was determined as $1 - (\text{proliferation of coculture} / \text{proliferation of responder population alone}) \times 100$, where proliferation is expressed as cpm. CD4⁺CD25^{high} T cells from MS patients exhibited less suppressive activity when the gate for sorting was positioned as shown in Supplemental Figure 1 ($P < 0.05$, Mann-Whitney U test). Mean values in **A** and **B** are indicated by horizontal lines. **(C)** Comparison of the proliferation of CD4⁺CD25^{high} T cells in MS patients and HIs relative to the proliferation of the CD4⁺CD25⁻ T cell subset. Proliferation of CD4⁺CD25^{high} cells was not significantly different between patients ($n = 11$) and HIs ($n = 11$). When the top 4% of CD4⁺CD25^{high} T cells were sorted, the cells were not fully anergic, suggesting the presence of activated T cells. Data represent mean \pm SD.

patients compared with HIs. Based on a study of 34 patients and 25 healthy volunteers, we now report that the regulatory function of the CD4⁺CD25^{high}CD127^{low} T cells is similar in MS patients and HIs. We also show that the isolated CD4⁺CD25^{high}CD127^{high} T cell subset of MS patients may proliferate more and produce more mitogenic lymphokines in coculture assays, resulting in an apparent peripheral defect of CD4⁺CD25^{high} regulation in MS patients.

Results

Suppressive function of the top 4% of sorted CD4⁺CD25^{high} T cells from MS patients. We first studied the frequency of CD4⁺CD25^{high} T cells in MS patients and HIs using flow cytometry. Figure 1A shows that the mean frequency of CD4⁺CD25^{high} cells within the CD4⁺ T cell population was $2.5\% \pm 1.4\%$ for HIs and $3.5\% \pm 1.2\%$ for MS patients ($P = \text{NS}$), confirming that there is no difference in the frequency of CD4⁺CD25^{high} T cells between MS patients and HIs.

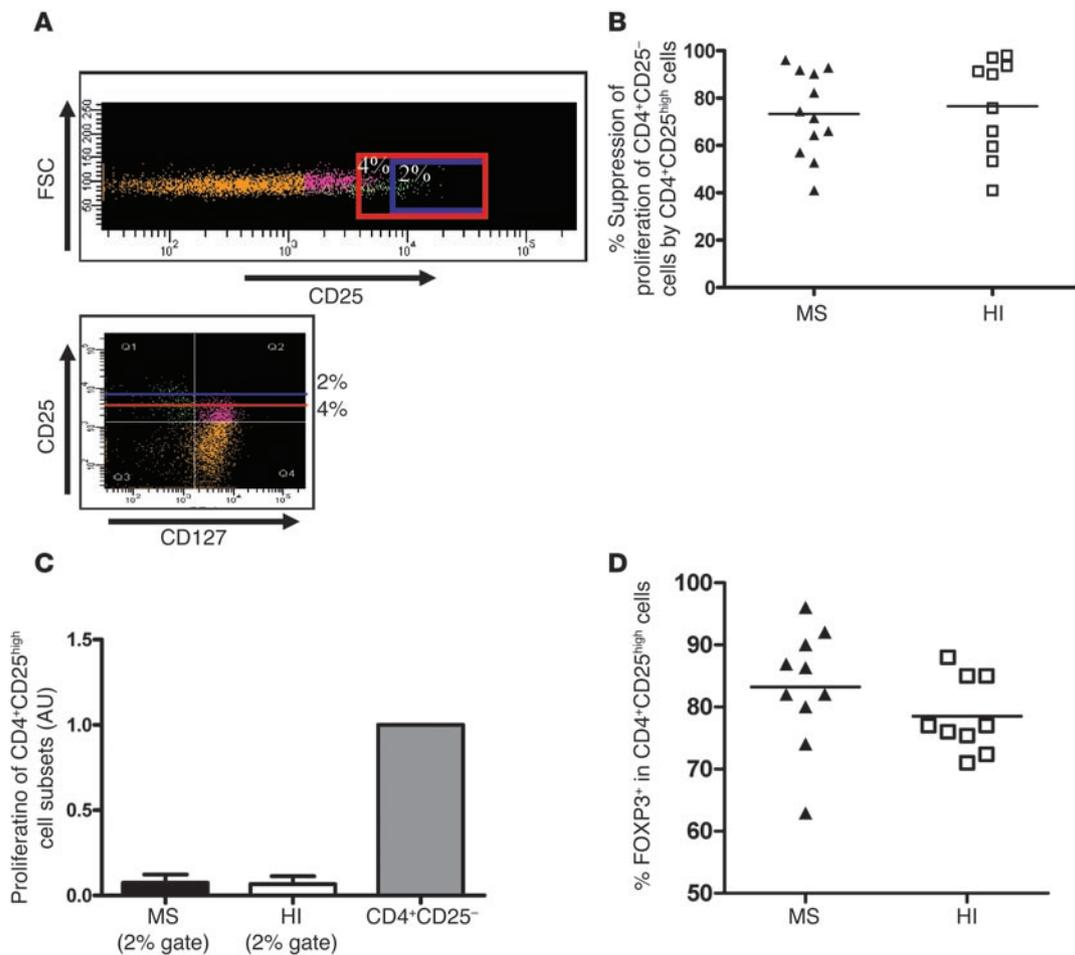
Next, in order to confirm the reported suppressive defect of the CD4⁺CD25^{high} T cell population, we sorted these cells from the peripheral blood of patients ($n = 11$) and HIs ($n = 11$) using a high-

speed FACS sorter and compared their inhibitory properties. The gate was set up to include 4% of the CD4⁺ T cells (based on a reference umbilical cord population) (Supplemental Figure 1; supplemental material available online with this article; doi:10.1172/JCI35365DS1). A regulatory function assay was then performed based on the capacity of the cells to inhibit polyclonal proliferation of autologous CD4⁺CD25⁻ cells. Figure 1B shows the results obtained under these conditions, when CD4⁺CD25^{high} T cells sorted from MS patients were added to the coculture system, indicating an apparent defective regulatory function as compared with HIs ($39.0\% \pm 28.4\%$ suppression in MS patients versus $64.7\% \pm 33\%$ in HIs; $P = 0.048$, Mann-Whitney U test). However, Figure 1C shows that under these sorting conditions, the isolated CD4⁺CD25^{high} cells of both MS patients and normal individuals were not fully anergic, with a proliferation of 32.7% in MS patients and 26.3% in HIs (the proliferation of CD4⁺CD25⁻ T cells from each group was used as the reference). The fact that the cells were not fully anergic under this gating condition led us to explore the possibility that contaminating cells were interfering with the proliferation assay. To do this, Tregs were sorted either by additionally taking into account their expression of CD127 or by using more stringent gating to select cells at the extreme end of CD25 positivity.

Similar suppressive activity of the top 2% of sorted CD4⁺CD25^{high} T cells in MS patients and HIs. Because contrasting expression of CD25 and CD127 markers has been

reported (13, 14), we sorted the CD4⁺CD25^{high} T cells using a more stringent threshold for CD25 expression (CD25^{high}; less than 2% of the CD4⁺ T cells) to compare their inhibitory properties in patients and controls. Figure 2A shows that the gating stringency was indeed associated with a disappearance of CD127^{high} T cells among the purified CD4⁺CD25^{high} T cells. Figure 2B shows that when sorting the top 2%, the suppression of CD4⁺CD25⁻ T cell proliferation was roughly similar between the 2 groups ($73.3\% \pm 17.8\%$ in MS patients, $n = 12$, and $76.5\% \pm 20.5\%$ in healthy controls, $n = 10$). Furthermore, in this sorting condition, the purified CD4⁺CD25^{high} T cells were fully anergic (Figure 2C). Finally, we analyzed the intracellular FOXP3 expression in this CD4⁺CD25^{high} subset. No significant difference was noted between MS patients ($n = 10$) and HIs ($n = 9$), with a mean expression of $83.2\% \pm 9.5\%$ in patients and $78.5\% \pm 6\%$ in HIs when gating only on the top 2% of CD4⁺CD25^{high} cells (Figure 2D).

Thus, these experiments further support the idea that in MS patients, the presence of contaminating CD127^{high} cells within the CD4⁺CD25^{high} T cell subset may explain an apparent alteration in their regulatory function.

**Figure 2**

Suppressive activity and proliferation of the top 2% of sorted CD4⁺CD25^{high} cells from MS patients and healthy controls. **(A)** CD4⁺ lymphocytes obtained from the peripheral blood of MS patients and healthy controls were stained with Pe-Cy7-conjugated anti-CD3, FITC-conjugated anti-CD8, Alexa Fluor 647-conjugated anti-CD25, and PE-conjugated anti-CD127. Sorting was performed on the CD4⁺CD25^{high}CD127^{low} and CD4⁺CD25^{high}CD127^{high} populations. Sorting was also performed on the CD4⁺CD25^{high} population with 2 different gates. In the example provided for 1 MS patient, CD4⁺CD25⁺ T cells appear in orange, CD4⁺CD25⁺CD127^{low} T cells appear in green, and CD127^{high} cells appear in violet. The presence of CD127^{high} activated cells can be observed in the CD4⁺CD25^{high} sorted T cells when the gate is not stringent enough (4% gating stringency, area above the red line), while in the case of a 2% gating stringency (area above the blue line), only a few CD127^{high} cells remain within the CD4⁺CD25^{high} T cell subset. FSC, forward scatter. **(B)** CD4⁺CD25⁻ responder cells were stimulated with anti-CD3 antibody (0.1 μg/ml) in coculture with the top 2% of CD4⁺CD25^{high} sorted cells. Data are the mean of duplicate wells. Regulatory properties of CD4⁺CD25^{high} cells are comparable in both HIs ($n = 10$) and patients ($n = 12$). **(C)** Comparison of the proliferation of the top 2% of sorted CD4⁺CD25^{high} T cells in MS patients and HIs relative to the proliferation of the CD4⁺CD25⁻ T cell subset. The proliferation of CD4⁺CD25^{high} T cells was minimal and almost null in both patients and controls. Data are mean \pm SD. **(D)** Intracellular FOXP3 staining was performed on the top 2% of sorted CD4⁺CD25^{high} T cells in 10 patients and 9 HIs. In **B** and **D**, the mean values for each group are indicated by horizontal lines.

Similar frequency and suppressive activity of CD4⁺CD25^{high}CD127^{low} cells in MS patients and HIs. Because CD25 is not a specific marker of Tregs (activated and memory T cells can also express CD25), we used expression of CD127 to discriminate activated and memory T cells (CD4⁺CD25^{high}CD127^{high} T cells) from regulatory cells (CD4⁺CD25^{high}CD127^{low} T cells) among the CD4⁺CD25^{high} subset (13). We compared the regulatory properties of CD127-depleted CD25^{high} T cells from MS patients and age-matched individuals. T cells were thus labeled with anti-CD127, and the CD4⁺CD25^{high}CD127^{low} cells were sorted (Figure 2A). Figure 3A shows that there was no difference in the percentage of CD25^{high}CD127^{low} cells within the CD4⁺ T cell populations of MS patients compared with HIs, with a mean frequency of $6.8\% \pm 1.8\%$

for MS patients and $6.2\% \pm 1.6\%$ for HIs ($P = \text{NS}$, Mann-Whitney U test). The cells were then tested for their ability to suppress the proliferation of CD4⁺CD25⁻ cells in response to irradiated autologous PBMC and anti-CD3 activation over 5 days. Under these conditions, no significant difference in suppression of autologous CD4⁺CD25⁻ proliferation was observed between the CD4⁺CD25^{high}CD127^{low} cells of RR-MS patients ($n = 25$) and those of healthy controls ($n = 23$) (Figure 3B). Proliferation of CD4⁺CD25⁻ T cells was inhibited by a mean of $75.3\% \pm 20.9\%$ in MS patients and $78.3\% \pm 15.0\%$ in age-matched HIs. Thus, an improvement in the suppressive function of this cell subset was observed in both MS patients and HIs, as compared with the use of CD25 alone as a marker of Tregs. The proliferation of these cell subsets was then tested and compared with

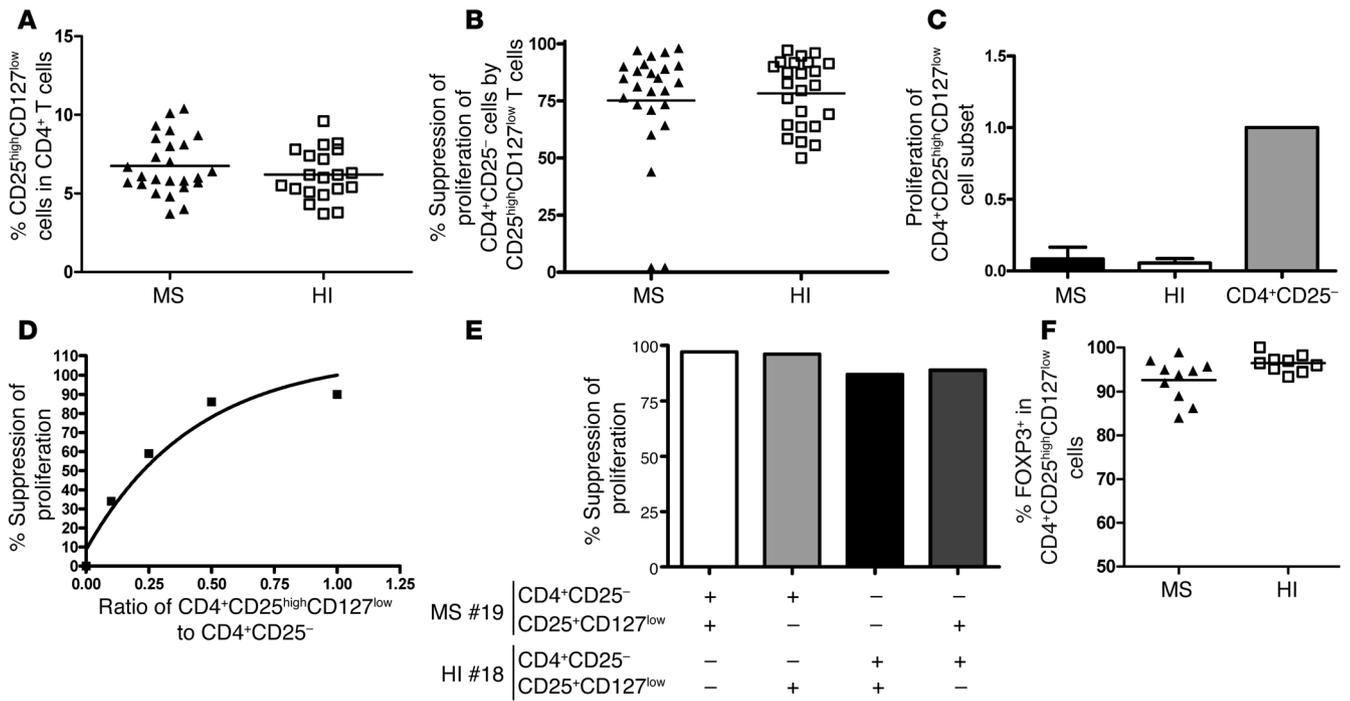


Figure 3

Frequency, proliferation, and suppressive activity of CD4⁺CD25^{high}CD127^{low} cells from MS patients and healthy controls. (A) Percentages of CD25^{high}CD127^{low} cells within the total CD4⁺ T cell population were determined by flow cytometry analysis of PBMCs. No statistical difference was found between the groups (25 patients and 20 HIs). (B) Regulatory properties of CD4⁺CD25^{high}CD127^{low} cells were comparable in both HIs (*n* = 24) and patients (*n* = 25). (C) Comparison of the proliferation of CD4⁺CD25^{high}CD127^{low} T cells in MS patients and HIs normalized against the proliferation of the CD4⁺CD25⁻ T cell subset. The proliferation of CD4⁺CD25^{high}CD127^{low} T cells was minimal and approaching 0 in both patients and controls. (D) Example in 1 patient of variations of the suppression of proliferation by CD4⁺CD25^{high}CD127^{low} cells in the cocultures at varying ratios of CD4⁺CD25^{high}CD127^{low} to CD4⁺CD25⁻. Decreasing the number of CD4⁺CD25^{high}CD127^{low} T cells resulted in less suppressor activity. (E) CD4⁺CD25^{high}CD127^{low} T cells from 1 patient with MS inhibited proliferation of responder T cells isolated from either the autologous individual or the healthy control. Conversely, Tregs from 1 HI were cocultured with responder T cells from the same subject or those from the MS patient. MS#19, MS patient 19; HI#18, HI subject 18. (F) Intracellular FOXP3 staining was performed on CD4⁺CD25^{high}CD127^{low} T cells in 10 patients and 9 HIs. In A, B, and F, mean values are indicated by horizontal lines.

their CD4⁺CD25⁻ counterparts. Figure 3C shows that in these new conditions, the basal proliferation of the CD4⁺CD25^{high}CD127^{low} T cells was very low or absent (a representative example is shown in Supplemental Figure 2) and clearly differed from that of the top 4% of sorted CD4⁺CD25^{high} cells. In addition, this lack of proliferation was totally reversed by the addition of IL-2 (data not shown), suggesting a state of anergy. The suppressive activity was dose dependent in that dilution of the CD4⁺CD25^{high}CD127^{low} T cells (over a range of 1:1 to 1:10) decreased their suppressive function (Figure 3D). Finally, CD4⁺CD25^{high}CD127^{low} Tregs from MS patients were able to suppress effector CD4⁺CD25⁻ cells from HIs to the same extent as the CD4⁺CD25^{high}CD127^{low} cells from HIs on CD4⁺CD25⁻ T cells from MS patients (Figure 3E).

Finally, we analyzed intracellular FOXP3 expression in the CD4⁺CD25^{high}CD127^{low} cells. No significant difference was noted between patients (*n* = 10) and HIs (*n* = 9), with a mean expression of 92.6% ± 4.8% in MS patients and 96.4% ± 2% in HIs (Figure 3F).

Further, when considering the production of IFN-γ or IL-2 by CD4⁺CD25⁻ responder cells after 3 days of polyclonal stimulation in the presence of irradiated autologous PBMCs, the same suppressive capacity of CD4⁺CD25^{high}CD127^{low} T cells was observed in patients and controls (*n* = 4; Figure 4). An 84% and an 83% reduction in IFN-γ production was observed in MS patients and

HIs, respectively. Similarly, the reduction in IL-2 production was 88% and 87% in MS patients and HIs, respectively.

Taken together, these data indicate that CD4⁺CD25^{high}CD127^{low} Tregs from MS patients do not display a defect in their suppressive properties and that activated CD127^{high} cells within the CD4⁺CD25^{high} T cell population interfere with the proliferation assay.

Significantly higher proliferation of activated CD4⁺CD25^{high}CD127^{high} T cells in MS patients versus HIs. In order to know whether the apparently impaired suppressive function of the CD4⁺CD25^{high} cell subset (not depleted of CD127^{high} cells) from MS patients (Figure 1B) could be due to the presence of activated CD127^{high} cells, we first compared the frequency of CD4⁺CD25^{high}CD127^{high} cells between MS patients and HIs. No difference was observed between the 2 groups (9.2% ± 4.8% in MS patients and 8.2% ± 4.6% in controls) (Figure 5A). Next, the proliferation of the CD4⁺CD25^{high}CD127^{high} T cells of both MS patients (*n* = 20) and HIs (*n* = 20) was compared with that of CD4⁺CD25^{high}CD127^{low} T cells. The data were normalized against the proliferation of CD4⁺CD25⁻ T cells in order to compare individuals, as the absolute values of proliferation under CD3 stimulation can be variable. This type of presentation has been reported before (14). The raw data expressed in cpm are provided in Supplemental Figures 3–5. Figure 5B shows no difference in proliferation of the CD4⁺CD25^{high}CD127^{low} subset between MS patients and HIs, with a

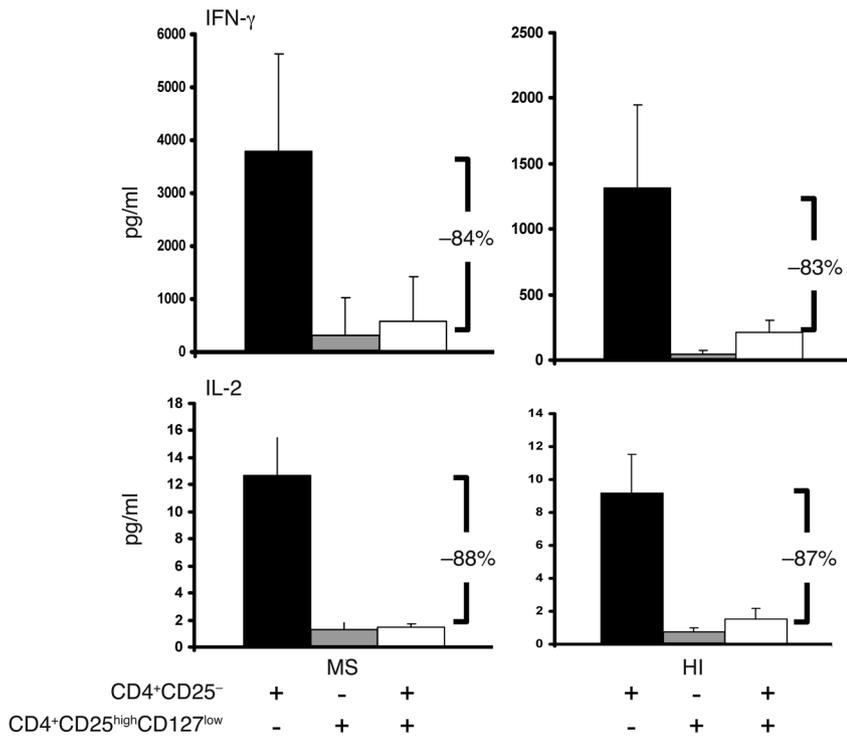


Figure 4 Suppression of cytokine production by CD4⁺CD25^{high}CD127^{low} T cells in patients and controls. Cytokines (IL-2 and IFN- γ) were measured in supernatants taken from each well 3 days after the initiation of coculture (CD4⁺CD25⁻ T cells/CD4⁺CD25^{high}CD127^{low} T cells at a 1:1 ratio) using a multiplex fluorescent bead immunoassay. Three days after initiation of the coculture, the same percentage suppression of IFN- γ (top panels) and IL-2 (bottom panels) production by CD4⁺CD25^{high}CD127^{low} was observed in the cocultures from 4 patients and 4 HIs. Data are mean \pm SD.

very low proliferation in both groups. On the contrary, the proliferation of CD4⁺CD25^{high}CD127^{high} T cells in MS patients was 1.9-fold higher (4.2 ± 3.9 relative to the proliferation of CD4⁺CD25⁻ T cells) than in controls (2.2 ± 2.8 ; $P = 0.017$, Mann-Whitney U test; Figure 5B). This observation further supports the possibility that the CD127^{high} T cells within the CD4⁺CD25^{high} subset might interfere in the apparent defective regulation of CD4⁺CD25^{high} T cells in MS patients. This CD127^{high} contamination can be prevented using a selective sorting of CD127^{low} cells or more stringent gating sorting conditions of CD4⁺CD25^{high} cells (Figure 2A). The contribution of these activated cells to the apparent alteration in regulatory properties of the CD4⁺CD25^{high} cells was also demonstrated by the significant inverse correlation observed between the suppressive function of CD4⁺CD25^{high} cells and the presence of CD127^{high} T cells within this cell subset (Pearson correlation coefficient of $r = -0.51$; $P = 0.006$, linear regression test; Figure 5C). Finally, we analyzed intracellular FOXP3 expression in the CD4⁺CD25^{high}CD127^{high} cells. No significant difference was noted between MS patients ($n = 10$) and HIs ($n = 9$), with a mean expression of $17.7\% \pm 10.8\%$ in patients and $16.8\% \pm 8.6\%$ in controls (Figure 5D).

Cytokine secretion by the CD4⁺CD25^{high}CD127^{high}, CD4⁺CD25⁻, and CD4⁺CD25^{high}CD127^{low} populations in MS patients and HIs. The cytokines TNF- α , IFN- γ , and IL-2 were also measured in the supernatants of the proliferation assays from the CD4⁺CD25^{high}CD127^{high}, CD4⁺CD25^{high}CD127^{low}, and CD4⁺CD25⁻ cell populations and their

cocultures after 24 hours of proliferation. No significant difference was observed between patients ($n = 10$) and HIs ($n = 10$) for the 3 cell subsets (data not shown) after 24 hours. However, CD4⁺CD25^{high}CD127^{high} cells from MS patients secreted significantly higher levels of cytokines than CD4⁺CD25^{high}CD127^{low} and CD4⁺CD25⁻ T cells (Figure 6A; $P = 0.011$, $P = 0.0001$, and $P = 0.0005$ when compared with CD4⁺CD25⁻ for IFN- γ , TNF- α , and IL-2, respectively; and $P = 0.0031$, $P = 0.0039$, and $P < 0.0001$ when compared with CD4⁺CD25^{high}CD127^{low} for IFN- γ , TNF- α , and IL-2, respectively; Mann-Whitney U test), suggesting that these cells had a proinflammatory potential. In addition, CD4⁺CD25^{high}CD127^{low} T cells did not produce IL-2 or IFN- γ when stimulated by anti-CD3, as would be expected from their regulatory phenotype.

Hence, to study their production of cytokines, CD4⁺CD25^{high}CD127^{high} cells from MS patients ($n = 4$) and HIs ($n = 4$) were cultured under CD3 polyclonal stimulation in the presence of irradiated PBMCs for 3 days. IFN- γ and TNF- α were subsequently measured using a multiplex fluorescent bead assay. As shown in Figure 6B, $6,580 \pm 2,093$ pg/ml of IFN- γ was detected in the cultures of MS patient cells as compared with $2,567 \pm 1,092$ pg/ml for HIs. Concerning TNF- α production, the cells from MS patients produced $3,107 \pm 346$ pg/ml compared with $1,571 \pm 629$ pg/ml for HIs. IL-2 production was also increased in MS patients as compared with HIs (14 ± 3 versus 6 ± 2 pg/ml, respectively). The CD4⁺CD25^{high}CD127^{high}

cells from MS patients produced nearly 2-fold more proinflammatory cytokines compared with the same cells from HIs. While statistical significance was not achieved, a trend toward significance was observed (IFN- γ , $P = 0.06$, Mann-Whitney U test; TNF- α , $P = 0.09$; IL-2, $P = 0.1$) despite the very low number of patients and controls studied ($n = 4$).

FOXP3 content of CD4⁺CD25^{high} and CD4⁺CD25^{high}CD127^{low} populations in MS patients and HIs. We compared intracellular FOXP3 expression between CD4⁺CD25^{high} and CD4⁺CD25^{high}CD127^{low} cell subsets in patients ($n = 10$) and controls ($n = 9$). The use of anti-CD127 antibody provided a purified CD4⁺CD25^{high}CD127^{low} population expressing more FOXP3 in MS patients and HIs ($92.6\% \pm 4.8\%$ and $96.4\% \pm 2\%$, respectively), as compared with $83.2\% \pm 9.5\%$ in patients and $78.5\% \pm 6\%$ in HIs when gating only on the top 2% of the CD4⁺CD25^{high} population ($P < 0.0001$, Mann-Whitney U test; Figure 7).

Discussion

CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ regulatory T lymphocytes have been shown to play a key role in controlling potentially harmful responses to self-determinants in mice (24) and humans (1). Recently, a possible defect in the function of CD4⁺CD25^{high} cells has been reported in patients with RR-MS (1, 19–21). In this paper, we revisited this observation by analyzing the properties of subpopulations of CD4⁺CD25^{high} T cells, taking into consideration the recent findings that activated/memory cells expressing CD127 are also present

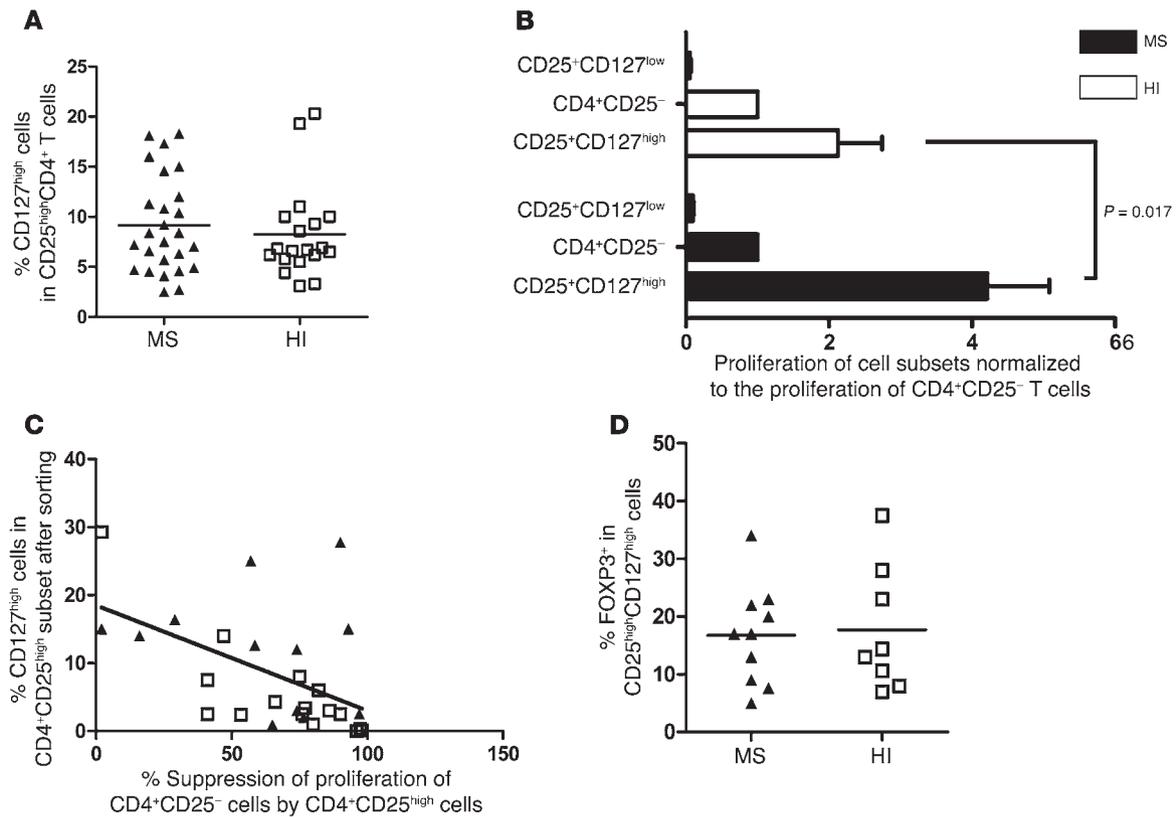
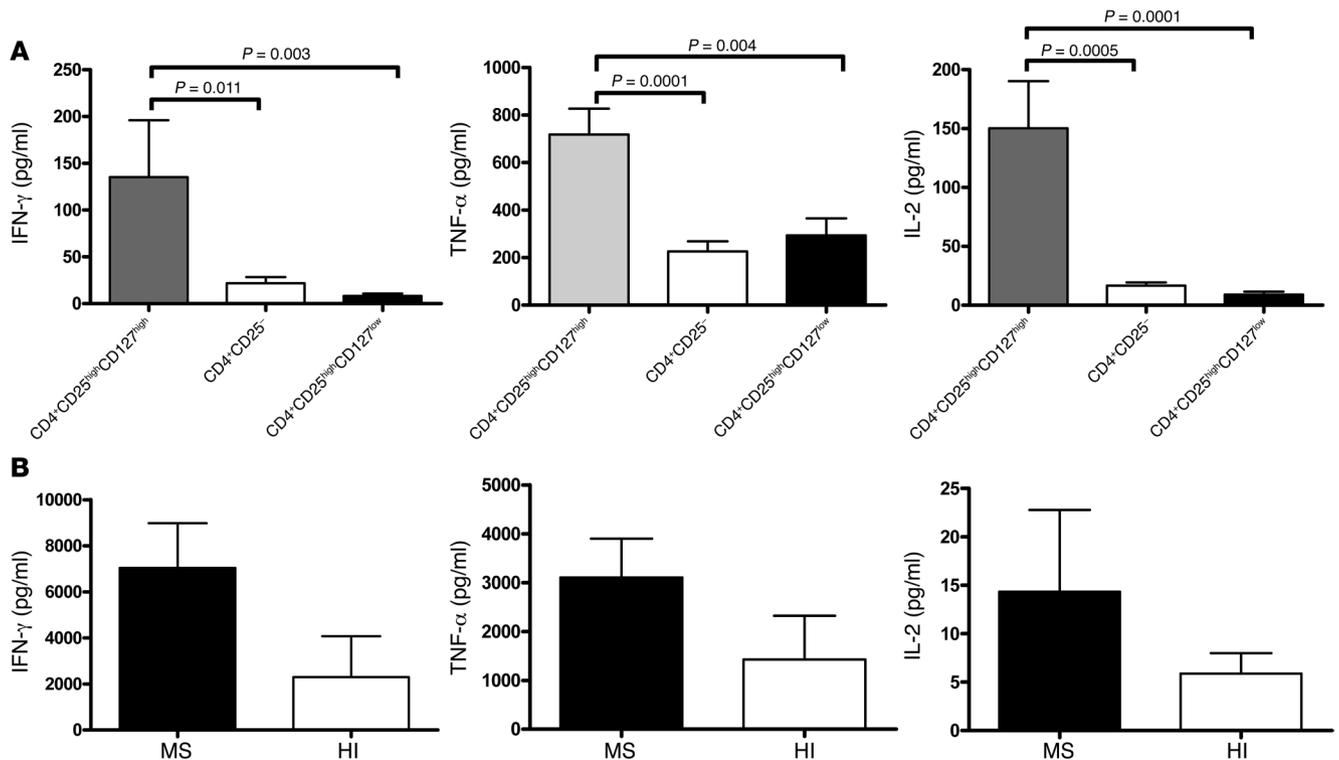


Figure 5
 Comparison of the proliferation of CD4⁺CD25^{high}CD127^{low} T cells and CD4⁺CD25^{high}CD127^{high} T cells. **(A)** CD4⁺ lymphocytes obtained from the peripheral blood of MS patients and healthy controls were stained with Pe-Cy7-conjugated anti-CD3, FITC-conjugated anti-CD8, Alexa Fluor 647-conjugated anti-CD25, and PE-conjugated anti-CD127. No statistically significant difference was observed in the frequency of CD4⁺CD25^{high}CD127^{high} T cells between MS patients (*n* = 25) and healthy controls (*n* = 19). Mean value is indicated for each group. **(B)** CD4⁺CD25^{high}CD127^{low} T cells or CD4⁺CD25^{high}CD127^{high} T cells were cocultured with irradiated autologous PBMCs and stimulated with anti-CD3 antibody. CD25^{high}CD127^{low} cells were isolated from 25 patients and 23 HIs. CD25^{high}CD127^{high} cells were isolated from 20 patients and 20 HIs. A significant difference was observed in the proliferation of CD25^{high}CD127^{high} T cells between MS patients and HIs (*P* = 0.017, Mann-Whitney *U* test). Bar graphs indicate the mean ± SD. **(C)** Suppression of proliferation of CD4⁺CD25⁻ cells by CD4⁺CD25^{high} cells was calculated in 13 patients and 15 HIs. The percentage of CD127^{high} cells present in the sorted CD4⁺CD25^{high} T cells was estimated in the same manner. A correlation was found between this percentage and the regulatory properties of CD4⁺CD25^{high} cells with a Pearson coefficient of *r* = -0.50 (*P* = 0.006, linear regression test). Black triangles represent data obtained from MS patients, and white squares represent data from HIs. **(D)** Intracellular FOXP3 staining was performed on CD4⁺CD25^{high}CD127^{high} T cells in 10 patients and 9 HIs. In **B** and **D**, horizontal lines indicate the mean.

within the CD4⁺CD25⁺ T cell population and can potentially interfere in the classical functional assays for measuring CD4⁺CD25^{high} Treg suppressive properties (13, 14, 25). To our knowledge, this is the first study using CD127 to discriminate Tregs in MS patients and showing that this CD4⁺CD25^{high}CD127^{low} T cell subset actually has the same regulatory potency in patients and in age-matched control subjects. The frequency of the CD4⁺CD25^{high} T cells also appeared to be similar between MS patients and HIs, as reported previously (18). However, several studies have reported a defective suppressive function in CD4⁺CD25^{high} T cells from MS patients under polyclonal (21) or antigen-based stimulation (19, 20), suggesting that this defect might be involved in the pathophysiology of MS (26, 27). At the time of these studies, CD127^{low} staining was not available for the CD4⁺CD25^{high} Tregs. Our investigations suggest that CD4⁺CD25^{high} Treg function may not be altered in MS, since CD4⁺CD25^{high}CD127^{low} T cells display a normal suppressive function. Rather, a discrete population of CD4⁺CD25^{high}CD127^{high} cells in patients is likely to interfere with the coculture assay by a trend

for hyperproliferation and for producing more proinflammatory cytokines able to enhance CD25⁺ T cell proliferation. Our data shed new light on the heterogeneity of the CD4⁺CD25^{high} T cell population and suggest a possible role for CD4⁺CD25^{high}CD127^{high} cells in MS. These findings are indirectly supported by recent genomic studies in MS suggesting alterations in *IL2RA* and *IL7RA* genes (28–30). As expected, we first confirmed a defective suppressive function of the CD4⁺CD25^{high} T cells in MS patients (39% in MS patients versus 69% in age-matched HIs, *P* < 0.05). However, because CD25 is not specific for Tregs but is also expressed by activated T cells (1, 31–33), it was important to take into consideration other markers that distinguish activated/memory cells not endowed with regulatory function. Another difficulty in assessing Treg function by studying CD4⁺CD25⁺ cells comes from the fact that the CD4⁺CD25^{high} population is difficult to distinguish from the CD4⁺CD25^{int} population (thought to contain activated T cells) because there is no clear and stereotyped cut-off between high and intermediate CD25 expression in humans (1, 2). In fact, our data show that changing the gat-

**Figure 6**

Cytokines secreted by the CD4⁺CD25^{high}CD127^{high}, CD4⁺CD25⁻, and CD4⁺CD25^{high}CD127^{low} populations in MS patients and HIs. (A) The supernatants from each well of the proliferation assays were removed 24 hours after the beginning of the incubation. The cytokines TNF- α , IFN- γ , and IL-2 were measured from 10 MS patients in the following 3 cell subsets: CD4⁺CD25^{high}CD127^{high}, CD4⁺CD25⁻, and CD4⁺CD25^{high}CD127^{low}. Mann-Whitney *U* tests were performed to compare the 3 cell subsets. (B) Comparison of cytokine production by CD4⁺CD25^{high}CD127^{high} T cells under CD3 polyclonal stimulation between MS patients (*n* = 4) and HIs (*n* = 4). Supernatants were removed 3 days after the beginning of the incubation. The results are the mean \pm SD from 4 patients and 4 healthy controls.

ing stringency when sorting these cells dramatically affects the suppressive capacity of the CD4⁺CD25^{high} T cells in the proliferation assay, probably by introducing activated T cells in the coculture assay. Using too low a stringency sorting threshold may thus result in an apparent defect in regulatory function in the CD4⁺CD25^{high} T cell subset in MS patients as in HIs, but not in the same proportion (see Figure 1C and Figure 2B for the difference obtained in percentage of suppression when using a 2% or a 4% gating stringency both in patients or controls). Indeed, the same cells obtained from MS patients using a more stringent sorting threshold did not present abnormal regulatory function. It is thus difficult to compare the results obtained in different studies when Tregs are purified based solely on their expression of CD4 and CD25.

Recently, CD127 has been shown to be negatively correlated with FOXP3 expression in CD4⁺CD25^{high} T cells, enabling improved sorting of viable Tregs (13, 14). Thus, we used anti-CD127 to discriminate the properties of CD127^{high}-depleted cells among the CD4⁺CD25^{high} T cell subset in MS patients and HIs and found that the suppressive function of the CD4⁺CD25^{high}CD127^{low} cells was similar between the 2 groups. Furthermore, 94% of the CD4⁺CD25^{high}CD127^{low} T cells expressed FOXP3 protein compared with 82% in CD4⁺CD25^{high} cells (*P* < 0.0001, Mann-Whitney *U* test; Figure 7), indicating that the cells sorted using the CD127 marker are a purer population than those obtained using only CD25. The comparable high FOXP3⁺ score in the CD127-depleted CD25^{high} cells and the comparable regulatory function observed

in MS patients and HIs also suggests that MS patients have no defect in their Tregs. Hence, when comparing the production of IFN- γ by CD4⁺CD25⁻ cells under polyclonal stimulation in the presence or absence of CD4⁺CD25^{high}CD127^{low} cells, a similar suppressive property was found for this Treg subset, confirming the data observed with the proliferation assays. This observation of a similar regulatory function between MS patients and HIs suggests that contaminating CD127^{high} T cells interfere in the suppression assays. The presence of activated CD127^{high} T cells within the CD4⁺CD25^{high} T cells of patients with MS could explain the discrepancy observed between the 2 groups despite a similar frequency of CD4⁺CD25^{high}CD127^{high} cells in MS patients and HIs. An enhanced proliferation of this T cell subset was observed compared with the proliferation of CD25⁻ cells, suggesting that this subpopulation may exhibit an abnormal activation state in MS patients. This would at least partly explain the defect in suppressive function observed with the CD4⁺CD25^{high} T cells. In addition, in our experiments the CD4⁺CD25^{high}CD127^{high} T cells exhibited a proinflammatory profile as measured by the levels of IL-2, IFN- γ , and TNF- α produced in the supernatants of the proliferation assays as compared with the responder CD4⁺CD25⁻ cell subset. Hence, when compared with HIs, this subset of cells from MS patients seemed to produce more proinflammatory cytokines (IFN- γ , TNF- α , and IL-2). The extent to which this increased production of T cell mitogenic cytokines (such as IL-2 and IFN- γ ; ref. 34) may play a role in the proliferation of the CD25⁻ T cell subset within the coculture system

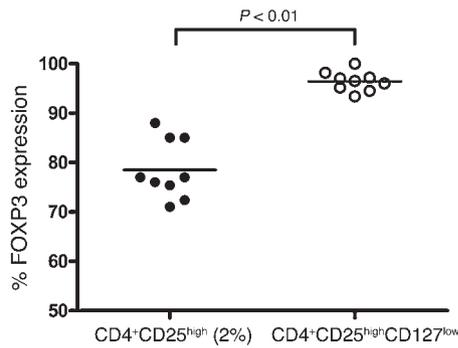


Figure 7

Comparison of FOXP3 expression in CD4⁺CD25^{high} T cells and CD4⁺CD25^{high}CD127^{low} cells. Intracellular FOXP3 staining was performed in 9 HIs. A significant difference was observed between the top 2% of sorted CD4⁺CD25^{high} and CD4⁺CD25^{high}CD127^{low} T cells ($P < 0.0001$, Mann-Whitney U test). The horizontal lines indicate the mean values for each group.

requires further investigation. Recently, CD4⁺CD25^{high}CD127^{high} cells have also been suggested to play a role in allograft rejection in humans. Grafts infiltrated by CD4⁺CD25^{high}CD127^{high} T cells contained allospecific CD4⁺ T cells and also secreted effector cytokines such as TNF- α and IFN- γ (35). Altogether, it is possible that this CD4⁺CD25^{high}CD127^{high} T cell subset plays a role in MS or other inflammatory processes. Our observations also indirectly corroborate the results of 3 recent studies on risk alleles associated with MS, which revealed an alteration of 2 genes, *IL2RA* and *IL7RA* (28–30). Recently, Venken and colleagues also used CD127 to discriminate memory and naive Tregs in MS patients (36). They still found a defective suppressive function of the Tregs in MS patients, even after a sorting strategy based on CD127^{low} cells. However, they also used the counterpart CD4⁺CD25^{high}CD127^{high} cells as responders. Our data suggest that these cells are different between MS patients and HIs, since we show here that CD4⁺CD25^{high}CD127^{high} cells may be hyperproliferative and produce more proinflammatory cytokines, also resulting in an apparent defect in regulation.

To conclude, using 2 different parameters (suppression of proliferation and cytokine production), our work suggests that the inhibitory function of the regulatory CD4⁺CD25^{high} T cell subset may not actually be altered in MS when contaminating CD127^{high} cells are removed. In addition, the counterpart CD4⁺CD25^{high}CD127^{high} T cell subpopulation in MS patients may proliferate more or produce more mitogenic cytokines, at least partly explaining the previous observation of a decreased suppressive property of CD4⁺CD25^{high} cells in MS patients. This CD4⁺CD25^{high}CD127^{high} T cell subset will be the subject of future investigations, since it might play a role in the inflammatory process observed in MS.

Methods

Patients. Thirty-four patients with definite MS according to the McDonald criteria (37) were enrolled in the study. All patients presented RR-MS and did not receive disease-modifying therapy (including corticosteroid boluses) for at least 3 months prior to testing. The patients were between the ages of 19 and 60 (mean, 35.9 \pm 9.5 years), and their Kurtzke Expanded Disability Status Scale (EDSS) scores (38) were between 0 and 6.5 (mean, 1.75 \pm 1.6). The disease duration ranged from 6 months to 17 years (mean, 4.5 \pm 4.9 years). MS patients 1–25 were used for suppression and proliferation experiments concerning the different T cell subsets studied, while MS patients 25–34 were used for experiments concerning cytokine production. The characteristics of all patients are available in Supplemental Table 1.

Twenty-five HIs, matched for age with MS patients, between the ages of 21 and 60 (mean, 34.5 \pm 8.7 years) and with no history of autoimmune diseases or recent infection episodes, were also enrolled in this study. All patients and HIs gave written informed consent prior to the study.

Isolation of CD4⁺CD25[−], CD4⁺CD25^{high}, CD4⁺CD25^{high}CD127^{low}, and CD4⁺CD25^{high}CD127^{high} T cell populations. PBMCs were isolated from 100 ml of EDTA whole blood by density centrifugation over Ficoll-Paque (Eurobio). Freshly-isolated cells (1.5×10^8) from each experiment were incubated for 20 minutes in PBS with 30 μ l FITC-conjugated anti-CD8, 30 μ l PE-conjugated anti-CD127, 20 μ l PE-Cy7-conjugated anti-CD3 (BD Biosciences), and 5 μ l Alexa Fluor 647-conjugated anti-CD25 (anti-CD25 from Immunotech coupled to the fluorochrome using a molecular probe kit from Invitrogen). Human CD4⁺CD25^{high}, CD4⁺CD25[−], CD4⁺CD25^{high}CD127^{low}, and CD4⁺CD25^{high}CD127^{high} T cells were then separated from PBMCs using a high-speed cell sorter (FACSAria; BD Biosciences). Purity was systematically greater than 98% for CD4⁺CD25[−] T cells and greater than 95% for CD4⁺CD25^{high}CD127^{low} cells. For sorting, parameters were set once and automatic compensations were performed using FACSDiva software (BD Biosciences). Because we performed anti-CD3 staining for the sorting procedure, we checked that this staining had no influence on further experiments. We compared the proliferation of CD4⁺CD25[−] and CD4⁺CD25^{high}CD127^{low} cells as well as their coculture when the sorting was performed with or without anti-CD3. We did not find any difference in terms of proliferation or suppression (data not shown).

Proliferation assay. All experiments were performed on fresh peripheral blood lymphocytes. To assess the functional activity of the different subsets of cells (CD4⁺CD25^{high} and CD4⁺CD25^{high}CD127^{low}), 2×10^4 responder cells (CD4⁺CD25[−] T cells) were cocultured for 5 days with 2×10^4 CD4⁺CD25^{high} cells or CD4⁺CD25^{high}CD127^{low} cells (ratio 1:1) and 1×10^5 autologous irradiated PBMCs in complete RPMI 1640 medium supplemented with HEPES, L-glutamine, penicillin, streptomycin, sodium pyruvate, nonessential aminoacids, and 10% human AB serum. All experiments were run in duplicate in 96-well plates bound with anti-CD3 (Orthoclone OKT3; Janssen-Cilag) at 1 μ g/ml as described previously (39). Anti-CD3 antibody was used as a polyclonal T cell stimulus. Cultures were incubated at 37 $^{\circ}$ C in a humidified atmosphere. After 5 days of culture, the cells were pulsed with 1 μ Ci per well of ³H-thymidine (Amersham Biosciences) for 16 hours. The cells were then harvested and counted in a scintillation counter. ³H-thymidine incorporation was measured as cpm. The percentage of suppression of the responding cell proliferation was determined as $1 - (\text{proliferation of coculture} / \text{proliferation of responder population alone}) \times 100$, where proliferation was expressed as cpm.

In order to compare the proliferation of each cell subpopulation and among individuals, and because of variability in proliferation from one patient to another, the proliferation of the T cell subsets (CD4⁺CD25^{high}, CD4⁺CD25^{high}CD127^{low}, and CD4⁺CD25^{high}CD127^{high}) was normalized to the proliferation of the CD4⁺CD25[−] subset in each patient or control. In each case, baseline proliferation in absolute cpm was checked, and several representative examples are provided. All data concerning the proliferation of each subpopulation of T cells for each patient and HI are available in Supplemental Figures 1–4.

Measurement of cytokine production. Cytokines (IL-2, TNF- α , and IFN- γ) were measured in supernatants taken from each well 24 hours after the initiation of coculture using a multiplex fluorescent bead immunoassay (Lincplex) together with a Luminex device. To assess the suppression of IL-2 and IFN- γ production by CD4⁺CD25[−] T cells, these cytokines were measured after 3 days in the cocultured supernatants of CD4⁺CD25^{high}CD127^{low} and



CD4⁺CD25⁻ responder cells (ratio 1:1) and 1×10^5 autologous irradiated PBMCs under the CD3 polyclonal stimulation as described above.

For comparison of cytokine production by CD4⁺CD25^{high}CD127^{high} T cells from patients and controls, CD4⁺CD25^{high}CD127^{high} T cells were cocultured with irradiated PBMCs as described above together with anti-CD3. Supernatants were removed 3 days after the beginning of the assay, and IFN- γ , TNF- α , and IL-2 were measured using the multiplex fluorescent bead immunoassay as above. For this experiment, 4 more patients and HIs were randomly included in the study according to the criteria set out in the patients section.

FACS analysis. PBMCs (10^6 per sample) were stained with PE-Cy7-conjugated anti-CD3, FITC-conjugated anti-CD8, PE-Cy5-conjugated anti-CD25, and PE-conjugated anti-CD127 (all from BD Biosciences), followed by intracellular staining with human FOXP3 (APC conjugate) staining assay kit (Imgenex).

Statistics. Statistical analyses were performed using GraphPad Prism 4.0. Parametric statistical analysis (mean and SEM) was performed using standard methods. Significant differences were calculated using the nonparametric Mann-Whitney *U* test, and linear regression analysis was performed using the Pearson correlation test. For all tests, *P* values of less than 0.05 were considered significant.

1. Baecher-Allan, C., and Hafler, D.A. 2006. Human regulatory T cells and their role in autoimmune disease. *Immunity*. **21**:203–216.
2. Tang, Q., and Bluestone, J.A. 2006. Regulatory T-cell physiology and application to treat autoimmunity. *Immunity*. **21**:217–237.
3. Asano, M., Toda, M., Sakaguchi, N., and Sakaguchi, S. 1996. Autoimmune disease as a consequence of developmental abnormality of a T cell subpopulation. *J. Exp. Med.* **184**:387–396.
4. Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M., and Toda, M. 1995. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor α -chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J. Immunol.* **155**:1151–1164.
5. Fontenot, J.D., Gavin, M.A., and Rudensky, A.Y. 2003. Foxp3 programs the development and function of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *Nat. Immunol.* **4**:330–336.
6. Khattri, R., Cox, T., Yasayko, S.A., and Ramsdell, F. 2003. An essential role for Scurfin in CD4⁺CD25⁺ T regulatory cells. *Nat. Immunol.* **4**:337–342.
7. Hori, S., Nomura, T., and Sakaguchi, S. 2003. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science*. **299**:1057–1061.
8. Allan, S.E., et al. 2005. The role of 2 FOXP3 isoforms in the generation of human CD4⁺ Tregs. *J. Clin. Invest.* **115**:3276–3284.
9. Morgan, M.E., et al. 2005. Expression of FOXP3 mRNA is not confined to CD4⁺CD25⁺ T regulatory cells in humans. *Hum. Immunol.* **66**:13–20.
10. Ziegler, S.F. 2007. FOXP3: not just for regulatory T cells anymore. *Eur. J. Immunol.* **37**:21–23.
11. Dieckmann, D., Plottner, H., Berchtold, S., Berger, T., and Schuler, G. 2001. Ex vivo isolation and characterization of CD4⁽⁺⁾CD25⁽⁺⁾ T cells with regulatory properties from human blood. *J. Exp. Med.* **193**:1303–1310.
12. Thornton, A.M., and Shevach, E.M. 2000. Suppressor effector function of CD4⁺CD25⁺ immunoregulatory T cells is antigen nonspecific. *J. Immunol.* **164**:183–190.
13. Seddiki, N., et al. 2006. Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells. *J. Exp. Med.* **203**:1693–1700.
14. Liu, W., et al. 2006. CD127 expression inversely corre-
- lates with FoxP3 and suppressive function of human CD4⁺ T reg cells. *J. Exp. Med.* **203**:1701–1711.
15. Hohlfeld, R., and Wekerle, H. 2004. Autoimmune concepts of multiple sclerosis as a basis for selective immunotherapy: from pipe dreams to (therapeutic) pipelines. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**(Suppl. 2):14599–14606.
16. Sospedra, M., and Martin, R. 2005. Immunology of multiple sclerosis. *Annu. Rev. Immunol.* **23**:683–747.
17. Hellings, N., et al. 2001. T-cell reactivity to multiple myelin antigens in multiple sclerosis patients and healthy controls. *J. Neurosci. Res.* **63**:290–302.
18. Putheti, P., Pettersson, A., Soderstrom, M., Link, H., and Huang, Y.M. 2004. Circulating CD4⁺CD25⁺ T regulatory cells are not altered in multiple sclerosis and unaffected by disease-modulating drugs. *J. Clin. Immunol.* **24**:155–161.
19. Haas, J., et al. 2005. Reduced suppressive effect of CD4⁺CD25^{high} regulatory T cells on the T cell immune response against myelin oligodendrocyte glycoprotein in patients with multiple sclerosis. *Eur. J. Immunol.* **35**:3343–3352.
20. Kumar, M., et al. 2006. CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ T lymphocytes fail to suppress myelin basic protein-induced proliferation in patients with multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.* **180**:178–184.
21. Vigieta, 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.
22. Venken, K., et al. 2008. Compromised CD4⁺CD25^(high) regulatory T-cell function in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis is correlated with a reduced frequency of FOXP3-positive cells and reduced FOXP3 expression at the single-cell level. *Immunology*. **123**:79–89.
23. Huan, J., et al. 2005. Decreased FOXP3 levels in multiple sclerosis patients. *J. Neurosci. Res.* **81**:45–52.
24. Sakaguchi, S., et al. 2006. Foxp3⁺ CD25⁺ CD4⁺ natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease. *Immunity*. **21**:28–27.
25. Mazzucchelli, R., and Durum, S.K. 2007. Interleukin-7 receptor expression: intelligent design. *Nat. Rev. Immunol.* **7**:144–154.
26. Roncarolo, M.G., and Battaglia, M. 2007. Regulatory T-cell immunotherapy for tolerance to self antigens and alloantigens in humans. *Nat. Rev. Immunol.* **7**:585–598.
27. McFarland, H.F., and Martin, R. 2007. Multiple sclerosis: a complicated picture of autoimmunity. *Nat. Immunol.* **8**:913–919.
28. Hafler, D.A., et al. 2007. Risk alleles for multiple sclerosis identified by a genomewide study. *N. Engl. J. Med.* **357**:851–862.
29. Lundmark, F., et al. 2007. Variation in interleukin 7 receptor α chain (IL7R) influences risk of multiple sclerosis. *Nat. Genet.* **39**:1108–1113.
30. Gregory, S.G., et al. 2007. Interleukin 7 receptor α chain (IL7R) shows allelic and functional association with multiple sclerosis. *Nat. Genet.* **39**:1083–1091.
31. Baecher-Allan, C., Brown, J.A., Freeman, G.J., and Hafler, D.A. 2001. CD4⁺CD25^{high} regulatory cells in human peripheral blood. *J. Immunol.* **167**:1245–1253.
32. Baecher-Allan, C.M., and Hafler, D.A. 2005. Functional analysis of highly defined, FACS-isolated populations of human regulatory CD4⁺CD25⁺ T cells. *Clin. Immunol.* **117**:192; discussion 193.
33. Beissert, S., Schwarz, A., and Schwarz, T. 2006. Regulatory T cells. *J. Invest. Dermatol.* **126**:15–24.
34. Josien, R., et al. 1999. Recombinant IFN- γ abrogates allograft tolerance induced by donor-specific blood transfusion by restoring alloantibody production. *Eur. J. Immunol.* **29**:317–326.
35. Codarri, L., et al. 2007. Expansion and tissue infiltration of an allospecific CD4⁺CD25⁺CD45RO⁺IL-7R α ^{high} cell population in solid organ transplant recipients. *J. Exp. Med.* **204**:1533–1541.
36. Venken, K., et al. 2008. Natural naive CD4⁺CD25⁺CD127^{low} regulatory T cell (Treg) development and function are disturbed in multiple sclerosis patients: recovery of memory Treg homeostasis during disease progression. *J. Immunol.* **180**:6411–6420.
37. McDonald, W.I., et al. 2001. Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Ann. Neurol.* **50**:121–127.
38. Kurtzke, J.F. 1983. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology*. **33**:1444–1452.
39. Braudeau, C., et al. 2007. Variation in numbers of CD4⁽⁺⁾CD25^(high)FOXP3⁽⁺⁾ T cells with normal immunoregulatory properties in long-term graft outcome. *Transpl. Int.* **20**:845–855.

Acknowledgments

We would like to thank Joanna Ashton-Chess for her help in manuscript editing. This work was supported by a grant from the Collège des Enseignants de Neurologie et les Journées de Neurologie de Langue Française (to L. Michel) and a grant from the Association pour la Recherche sur la Sclérose en Plaques (to L. Berthelot).

Received for publication February 18, 2008, and accepted in revised form July 16, 2008.

Address correspondence to: Jean-Paul Soulillou, INSERM U643, 20 Bd J. Monnet, F-44093 Nantes Cedex, France. Phone: 33-2-40-08-74-10; Fax: 33-2-40-08-74-11; E-mail: Jean-Paul.Soulillou@univ-nantes.fr.

Sophie Brouard, Jean-Paul Soulillou, and David-Axel Laplaud are co-senior authors.

Laure Michel, Laureline Berthelot, and Ségolène Pettré contributed equally to this work.

Analyse de la régulation lymphocytaire dans la sclérose en plaques

La Sclérose En Plaques (SEP) est considérée comme une maladie auto-immune démyélinisante du Système Nerveux Central (SNC), dépendante des LT CD4⁺ auto-réactifs. La fréquence de ces cellules a été abondamment étudiée dans la littérature mais leur augmentation par rapport aux individus sains reste controversée. Cependant, que leur fréquence soit ou non augmentée, une question reste en suspens : **Comment ces cellules auto-réactives s'activent-elles et échappent-elles aux mécanismes de tolérance périphérique dans la SEP ?** Un des mécanismes proposés serait un défaut de régulation en périphérie. Plusieurs études ont ainsi impliqué les LT et B régulateurs dans le développement et la rémission de l'Encéphalite Auto-immune Expérimentale (EAE). Chez l'homme, la fréquence et la fonction de ces cellules restent cependant controversées. Nous avons choisi, dans ce travail, d'explorer la fréquence et la fonction des LT régulateurs naturels Foxp3⁺ (Tregs), et des LB régulateurs (Bregs) chez des patients atteints de SEP non traités. Nous n'avons pas mis en évidence de défaut de fréquence ou de fonction de ces deux sous populations dans notre cohorte de patients. L'implication des populations régulatrices T et B ne peut cependant pas être exclue dans la physiopathologie de la maladie, en raison de la connaissance encore limitée des Bregs chez l'homme, mais aussi en raison de la description récente de nouvelles sous populations de Tregs. Ces cellules peuvent par ailleurs représenter des cibles thérapeutiques intéressantes en rétablissant une homéostasie immunitaire déficiente.

Mots-clés : Régulation - Sclérose en plaques - Lymphocytes

Analysis of lymphocyte regulation in multiple sclerosis

Multiple Sclerosis (MS) is considered as an autoimmune demyelinating disease of the Central Nervous System (CNS), mediated by autoreactive CD4⁺ T cells. The frequency of these cells has been extensively studied in the literature but their increase compared to healthy individuals remains controversial. However, whether their frequency is increased or not, a question remains: How are these autoreactive cells activated and how do they escape peripheral tolerance in MS? One mechanism proposed could be a lack of regulation in periphery. Several studies have implicated T and B regulatory cells in the development and remission of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE), the animal model of MS. However, in human, the frequency and function of these cells remain controversial. We decided, in this work, to explore the frequency and function of Foxp3⁺ natural regulatory T cells (Tregs) and regulatory B cells (Bregs) in untreated MS patients. We did not reveal any defect in frequency or function of these two subpopulations within our cohort. Nonetheless, the involvement of regulatory T and B populations cannot be excluded in the pathophysiology of the disease, due to the still limited knowledge of Bregs in humans, but also because of the recent description of new subsets of Tregs. These cells may also represent interesting therapeutic targets by restoring a deficient immune homeostasis.

Key words: Regulation - Multiple sclerosis - Lymphocytes