

THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE DE NANTES

ECOLE DOCTORALE N° 605

Biologie Santé

Spécialité : Immunologie

Par

Jérémy MORILLE

Analyse de la différenciation lymphocytaire B dans la sclérose en plaques

Thèse présentée et soutenue à Nantes, le 7 juin 2021

Unité de recherche : CRTI INSERM UMR1064

Rapporteurs avant soutenance :

Anne Astier Chargée de recherche, INSERM UMR1291, CHU Purpan, Toulouse

Lennart Mars Chargé de recherche, INSERM Centre de recherche Lille neurosciences et cognition, Lille

Composition du Jury :

Président : Sophie Brouard

Examineurs : Hélène Zéphir

Directrice de recherche, CRTI INSERM UMR1064, Nantes

PU-PH, Université de Lille, CHU de Lille

Directeur de thèse : David Laplaud

Co-encadrant de thèse : Laure Michel

PU-PH, Université de Nantes, CHU de Nantes

MCU-PH, Université de Rennes, CHU de Rennes

Invité(s)

Laureline Berthelot

Chargée de recherche, CRTI INSERM UMR1064, Nantes

Remerciements

Arrive la conclusion de cette thèse, et avec elle la fin d'un chapitre de ma vie. J'aimerais remercier toutes les personnes qui ont eu une importance pour moi durant cette période.

Je remercie les docteurs Anne Astier et Lennart Mars d'avoir accepté d'être rapporteurs et d'évaluer ce travail. Merci aussi au Pr. Hélène Zéphir d'être examinatrice de cette thèse.

Merci également au Dr. Sophie Brouard pour m'avoir accueilli au sein de l'équipe 4 du CRTI et avoir examiné ma thèse.

Je tiens à remercier les Dr. Patricia Amé-Thomas et Nicolas Fazilleau pour leur participation à mes comités de thèse.

Je remercie le Pr. Régis Josien pour son accueil dans l'unité.

Je tiens également à remercier le Pr. Antoine Magnan qui m'a encouragé et aidé à entrer dans la voie de la recherche, sans lui je n'aurais pas eu l'idée d'écrire à David et ma vie n'aurait pas été la même.

Merci à Laure pour m'avoir encadré, depuis mon master jusqu'à la fin de ma thèse. Ça n'a pas toujours été facile, mais je te remercie pour ton encadrement, ta présence et ton investissement.

Un grand merci à David pour m'avoir donné la chance de faire de la recherche sur la sclérose en plaques. Vous avez su m'accueillir dans l'équipe et avez confirmé mon goût pour la neurologie, l'immunologie et la recherche sur la sclérose en plaques. Pour tout cela, pour votre sympathie permanente et pour votre confiance, je vous remercie.

Merci également à Laureline pour avoir suivi de près et participé à l'encadrement de ma thèse.

Je remercie bien sûr tous les membres de l'équipe SEP et tout particulièrement un grand merci à Alexandra. Même si c'était parfois compliqué entre nous, tu as été présente pendant tout ce temps et je t'en remercie.

Merci à Marion et à Stéphane pour l'aide qu'ils m'ont apporté durant cette thèse.

Merci à toutes les personnes que j'ai rencontrées au laboratoire durant cette thèse et avec qui des discussions enrichissantes ou des amitiés ont pu naître : Bryan, Maxim, Mathieu, Raphaël, Nail. Merci à tous.

Merci à Jean-Alain pour les leçons de piano et nos longues discussions autour de la musique. Sur Beethoven, Chopin ou Liszt, nos échanges auront toujours été passionnants.

Je remercie ma famille pour avoir été là pour moi. Maman, Stéphanie, Sandra, Camille, merci de faire partie de ma vie et de me soutenir depuis tout ce temps.

Enfin, Marine, je te remercie pour avoir été à mes côtés pendant la fin de cette thèse.

Articles scientifiques

Nicol B, Salou M, Vogel I, Garcia A, Dugast E, **Morille J**, et al. An intermediate level of CD161 expression defines a novel activated, inflammatory, and pathogenic subset of CD8 + T cells involved in multiple sclerosis. *Journal of Autoimmunity*. mars 2018;88:61-74.

Vallino A, Dos Santos A, Mathé CV, Garcia A, **Morille J**, Dugast E, et al. Gut bacteria *Akkermansia* elicit a specific IgG response in CSF of patients with MS. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*. mai 2020;7(3):e688.

Chapitre de revue

Morille J, Michel L. Focus sur les lymphocytes B dans la physiopathologie de la SEP. In: La sclérose en plaques - Historique, épidémiologie et pathogénie [Internet]. Elsevier. 2019. p. 170-5. Disponible sur: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/C20160025007>

Communication orale

Congrès NAT, 2018, Nantes

Posters

Congrès Labex IGO, 2018, Nantes

Journée ARSEP, 2018, 2019, Paris

Congrès ECTRIMS, 2018, Berlin

Congrès SFI, 2019, Nantes

Sommaire

Remerciements	2
Production scientifique	4
Sommaire	5
Liste des figures	7
Abréviations	8
Introduction	10
I. La sclérose en plaques	10
A. Historique et histoire naturelle de la SEP.....	10
B. Épidémiologie et étiologie de la SEP	11
1. Épidémiologie de la SEP	11
2. Facteurs environnementaux	12
3. Facteurs génétiques	13
C. La SEP, une maladie auto-immune.....	14
1. Neuropathologie de la SEP.....	14
2. Rôle de l'immunité innée.....	16
3. Rôle des lymphocytes T CD4	18
a. Les Th1	18
b. Les Th17	19
c. Les autres Th	20
d. Les LT régulateurs.....	21
4. Rôle des lymphocytes T CD8	22
5. Rôle des lymphocytes B.....	23
a. Rôle des LB en périphérie	24
b. Rôle des LB dans le LCR	25
c. Rôle des LB dans le SNC	26
d. Échange des LB entre la périphérie et le SNC	28
II. La différenciation lymphocytaire B	31
A. La lymphopoïèse B	31

B.	La réaction du centre germinatif.....	33
1.	Anatomie du centre germinatif	33
2.	Les acteurs du centre germinatif	33
a.	Les cellules folliculaires dendritiques.....	33
b.	Les lymphocytes T folliculaires auxiliaires.....	34
c.	Sélection et devenir des lymphocytes B	37
C.	La réponse humorale.....	41
1.	Structure des anticorps.....	41
2.	Mécanismes d'action de l'immunité humorale	42
III.	Différenciation lymphocytaire B et SEP	46
A.	Les plasmocytes, acteurs pathogéniques ou protecteurs dans la SEP ?.....	46
1.	La réponse humorale en périphérie.....	46
2.	La réponse humorale dans le LCR.....	47
3.	La réponse humorale dans le SNC.....	48
4.	Rôle protecteur des cellules sécrétrices d'anticorps	49
B.	Rôles des lymphocytes T folliculaires auxiliaires dans la SEP	52
	Objectifs	54
	Résultats	55
I.	Article 1 : Baisse de la production d'IgA associée à un défaut de différenciation des LB dans la SEP	55
II.	Article 2 : Les Tfh1 activés infiltrent le LCR de patients SEP en début de maladie.....	75
	Discussion et perspectives.....	96
A.	Étude de la différenciation lymphocytaire B et de la réponse humorale à IgA dans la SEP	96
B.	Caractérisation des Tfh et de leur implication dans la SEP	101
	Références	106

Liste des figures

Figure 1 : Les différentes formes cliniques de SEP.	11
Figure 2 : Exemples de lésions de la substance blanche.	15
Figure 3 : Rôles des LB dans la physiopathologie de la SEP.	30
Figure 4 : La lymphopoïèse B.	32
Figure 5 : La réaction du centre germinatif.	40
Figure 6 : Structure des anticorps.	42
Figure 7 : Rôle des plasmocytes dans la physiopathologie de la SEP.	52
Figure 8 : Hypothèse sur le rôle des plasmocytes à IgA dans la SEP.	100
Figure 9 : Hypothèse sur le rôle des Tfh dans la physiopathologie de la SEP.	105

Abréviations

ALCAM : *Activated Leukocyte Cell Adesion Molecule*

APRIL : *A Proliferation-Inducing Ligand*

BAFF : *B-cell Activating Factor*

BCR : récepteur des lymphocytes B (de l'anglais *B-cell receptor*)

BHE : Barrière Hémato-Encéphalique

BOC : Bandes Oligo-Clonales

CCR : récepteur aux chémokines de motif CC

CDR : *Complementary Determing Region*

CG : Centres Germinatifs

CLP : Cellule Lymphoïde Progénitrice

CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité

CPA : Cellule Présentatrice de l'Antigène

CXCR : récepteur aux chémokines de motif CXC

DC : Cellule dendritique (de l'anglais *Dendritic Cell*)

EAE : Encéphalomyélite Auto-immune Expérimentale

EBV : Epstein-Barr Virus

EDSS : *Expanded Disease Severity Score*

Eomes : pour Eomesodermin

Fab : *Fragment Antigen Binding*

Fc : *Fragment Crystallisable*

FDC : Cellule folliculaire dendritique (de l'anglais *Follicular Dendritic Cell*)

GALT : *Gut Associated Lymphoid Tissue*

GM-CSF : *Granulocyte-Macrophage – Colony-Stimulating Factor*

GWAS : Études d'associations pangénomiques (de l'anglais *Genome Wide Association Studies*)

HLA : *Human Leukocyte Antigen*

ICOS : *Inducible T-cell COstimulator*

IFN : Interféron

Ig : Immunoglobuline

IL : Interleukine

LB : Lymphocyte B

LCR : Liquide Céphalo-Rachidien
LT : Lymphocyte T
LT α : Lymphotoxine α
MBP : *Myelin Basic Protein*
MOG : *Myelin Oligodendrocyt Glycoprotein*
NK : Cellule tueuse naturelle (de l'anglais *Natural Killer*)
OLS : Organes Lymphoïdes Secondaires
PD1 : *Programmed cell Death*
PLP : *ProteoLipid Protein*
PP : Primaire Progressive
RAG : *Recombination Activating Gene*
RR : Récurrente-Rémittente
SCI : Syndrome Cliniquement Isolé
SEP : Sclérose En Plaques
SNC : Système Nerveux Central
SP : Secondairement Progressive
TAC1 : *Transmembrane Activator and CAML Interactor*
TCR : Récepteur des lymphocytes T (de l'anglais *T-cell receptor*)
Tfh : Lymphocyte T folliculaire auxiliaire (de l'anglais *follicular helper T cell*)
Tfr : Lymphocyte T folliculaire régulateur
TGF : *Tumor Growth Factor*
Th : Lymphocyte T auxiliaire (de l'anglais *T helper*)
TLT : Tissu Lymphoïde Tertiaire
TNF : *Tumor Necrosis Factor*
Tregs : Lymphocytes T régulateurs
VLA-4 : *Very-Late Antigen-4*

I. La sclérose en plaques

A. Historique et histoire naturelle de la SEP

Les premières descriptions de la sclérose en plaques (SEP) datent du début du XIX^{ème} siècle avec les travaux d'anatomie pathologique de Jean Cruveilhier. D'autres descriptions cliniques et pathologiques ont par la suite suivi, mais ce sont les travaux de Jean Martin Charcot qui en 1868 ont apporté une première synthèse anatomo-clinique de la SEP.

La SEP est une maladie inflammatoire chronique du système nerveux central (SNC) qui se caractérise par la formation de lésions de démyélinisation au sein de la substance blanche. Cette démyélinisation est à l'origine d'une altération de la conduction nerveuse, et la localisation de ces lésions explique les symptômes cliniques (atteintes visuelles, sensitives, motrices, etc.).

Le diagnostic de SEP est actuellement formulé en fonction des critères de McDonald révisés en 2017 et est établi en présence d'une dissémination spatiale et temporelle des lésions et/ou la présence de bandes oligoclonales d'immunoglobulines dans le liquide céphalo-rachidien (LCR) (Thompson *et al.*, 2018).

L'histoire naturelle de la SEP, c'est-à-dire l'évolution de la maladie au cours du temps chez des patients non traités, a été bien caractérisée. Différentes formes cliniques de SEP ont ainsi pu être décrites initialement en 1996 par Lublin et Reingold (Lublin et Reingold, 1996). Près de 85% des patients présentent au début de la maladie une forme dite récurrente-rémittente (RR) caractérisée par l'apparition de poussées inflammatoires de symptomatologie variée et suivies par des périodes de rémission partielles ou totales. Une accumulation progressive du handicap survient par la suite, et près de la moitié des patients évolue vers une forme secondairement progressive (SP) 20 ans après le début de la maladie. Enfin, près de 15% des patients débutent la maladie par une forme progressive d'emblée avec un handicap évoluant de manière continue sans rémission, on parle de forme primaire progressive (PP). Grâce aux avancées apportées par l'imagerie et la biologie, une révision de cette classification a été réalisée en 2013 (Lublin *et al.*, 2014). Cette nouvelle classification introduit ainsi le syndrome cliniquement isolé (SCI) comme étant la première présentation clinique d'un patient atteint d'une démyélinisation inflammatoire pouvant évoluer vers une SEP. L'apparition ou non de nouvelles lésions observées par imagerie par IRM, ainsi que la présence de nouvelles poussées permet de

distinguer les patients de forme « active » des patients de forme « non active ». Enfin, pour les patients de forme progressive (PP et SP), l'évaluation de la progression du handicap permet de distinguer les patients de forme progressive « avec » ou « sans progression ».

La figure 1 illustre les différentes formes cliniques de la maladie.

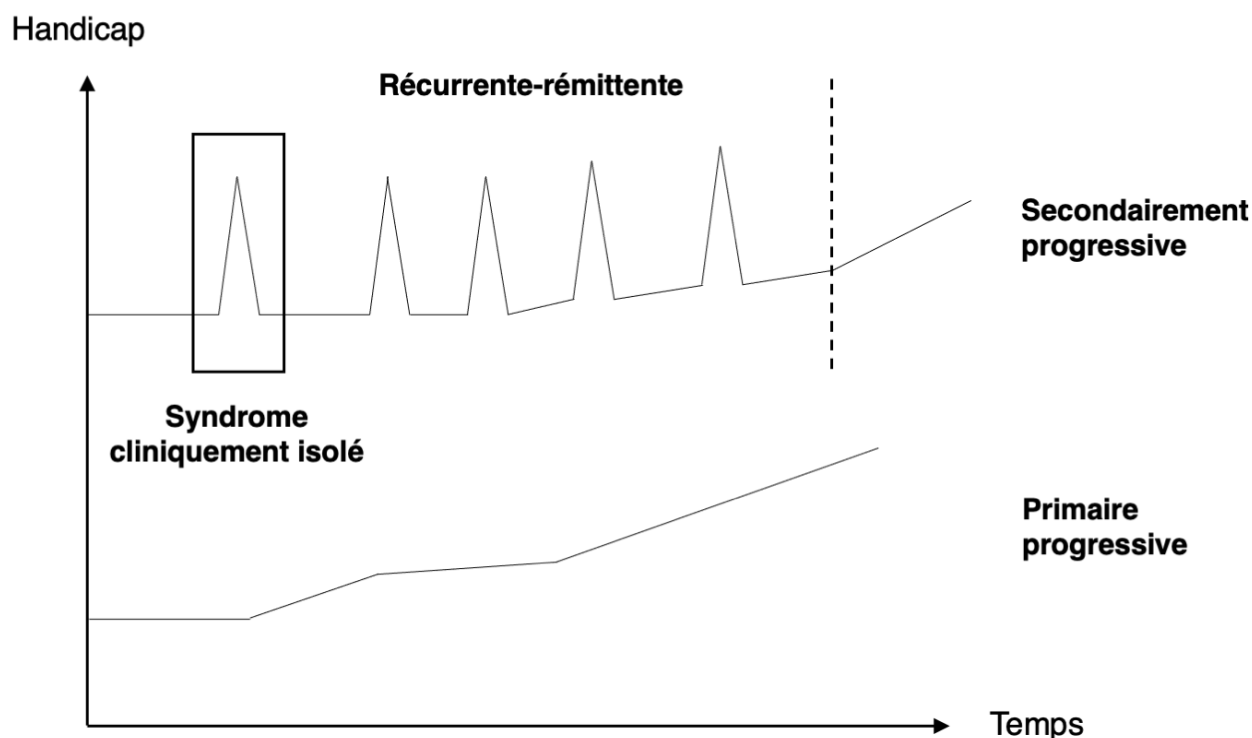


Figure 1 : Les différentes formes cliniques de SEP.

Différentes formes cliniques de SEP ont été décrites. Pour près de 85% des patients la maladie se manifeste par l'apparition de poussées inflammatoires suivies de rémissions partielles ou totales, on parle de forme récurrente-rémittente. L'histoire naturelle de la maladie pour ces patients sera l'évolution progressive du handicap sans rémission, on parle de forme secondairement progressive. Il existe également chez près de 15% des patients une forme primaire progressive où le handicap s'installe et s'aggrave continuellement d'emblée. Le syndrome cliniquement isolé correspond quant à lui au stade de première atteinte inflammatoire démyélinisante pouvant évoluer vers une SEP.

B. Épidémiologie et étiologie de la SEP

1. Épidémiologie de la SEP

Depuis 2013, le programme « *Atlas of MS* » établit une surveillance épidémiologique de la SEP à travers le monde en partenariat avec l'OMS. Ce programme a ainsi permis de déterminer une prévalence mondiale de la maladie, estimée à 35,9 pour 100.000 en 2020, représentant environ 2,8 millions de personnes à travers le monde (Walton *et al.*, 2020). Une augmentation de la prévalence de la SEP a pu être observée depuis le lancement du programme en 2013 (Browne *et al.*, 2014). Cette augmentation peut s'expliquer par une amélioration du recueil de données

et de la méthodologie utilisée. Cependant, les données recueillies restant insuffisantes dans certaines régions du monde comme l'Afrique, la prévalence estimée de la SEP est probablement encore sous-estimée.

La distribution de la SEP est très hétérogène selon les régions, et un gradient croissant sud-nord de la prévalence a été décrit. L'Europe et l'Amérique du Nord sont ainsi les régions aux plus fortes prévalences alors que l'Afrique Sub-Saharienne et l'Asie du Sud-Est sont au contraire les régions avec les prévalences les moins élevées de la maladie. La prévalence peut donc varier de 8 pour 100.000 en Afrique du Sud à 303 pour 100.000 en Allemagne. La France se situe quant à elle dans une zone de prévalence moyenne à élevée, la prévalence de patients atteints de SEP étant estimé à 155 pour 100.000 (Walton *et al.*, 2020).

Avec un âge moyen de 32 ans au diagnostic et un sex-ratio de près de 3 femmes pour un homme, le programme « *Atlas of MS* » confirme que la SEP est une maladie affectant préférentiellement l'adulte jeune et la femme.

2. Facteurs environnementaux

L'étiologie de la SEP est à ce jour encore assez mal connue, mais il est admis qu'il s'agit d'une maladie auto-immune d'origine multifactorielle. En effet, des facteurs environnementaux et génétiques ont été identifiés comme étant protecteurs ou à risque de développer une SEP.

Il est bien connu sur le plan épidémiologique que la prévalence de la SEP suit un gradient croissant sud-nord dans le monde. Différentes études ont ainsi suggéré que ce gradient pouvait être expliqué par une insuffisance d'ensoleillement et de vitamine D dans les régions nordiques (Pierrot-Deseilligny et Souberbielle, 2017).

Parmi les facteurs de risque environnementaux de la SEP, les infections à certains virus dont le virus Epstein-Barr (EBV) ont été également étudiés. Il est intéressant de noter que la séroprévalence pour l'EBV est estimée à plus de 99% chez les patients atteints de SEP contre environ 95% dans la population générale. Une séronégativité à l'EBV a quant à elle été associée à un risque 10 fois plus faible de développer une SEP (Ascherio et Munger, 2016). Une hypothèse proposée pour expliquer ce lien entre infection à l'EBV et SEP serait un mimétisme moléculaire entre les protéines du virus et les protéines de myéline, détournant ainsi la réaction inflammatoire vers la myéline (Geginat *et al.*, 2017).

En parallèle de ces facteurs environnementaux, certains facteurs de risque évitables liés au mode de vie ont été reconnus pour de nombreuses maladies et sont suspectés pour les maladies auto-immunes comme la SEP. Parmi ces comportements évitables, le tabagisme a récemment

été confirmé comme un facteur de risque de développer une SEP, mais également un facteur de risque pour un patient de forme RR de convertir vers une forme SP (Degelman et Herman, 2017).

Enfin, plusieurs études ont montré qu'une obésité précoce était associée à un risque accru de développer une SEP (Hedström *et al.*, 2012 ; Munger *et al.*, 2013).

3. Facteurs génétiques

La SEP n'est pas une maladie héréditaire à transmission Mendélienne, mais des facteurs génétiques de prédisposition à développer une SEP ont été identifiés. Dès les premières études génétiques réalisées dans la SEP, des associations entre les variants alléliques dans les gènes du locus HLA (pour *Human Leukocyte Antigen*) codant pour le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) et un risque de développer une SEP ont été identifiés. Parmi ces variants, l'allèle HLA-DRB1*15:01 est celui qui confère le plus fort risque de SEP, avec un risque relatif supérieur à 3 (Moutsianas *et al.*, 2015 ; Thompson *et al.*, 2018). Au contraire, certains variants alléliques dans le locus HLA ont été décrits comme étant protecteurs du développement de SEP, tels que les variants HLA-A*02 :01 et HLA-B*38:01 (Moutsianas *et al.*, 2015).

Ces dernières années, des études d'association pan-génomiques (GWAS pour *genome wide association studies*) ont été réalisées sur des cohortes de patients SEP et de contrôles sains. Ces études ont permis d'identifier des facteurs génétiques associés à la maladie avec un poids plus faible que les variants du locus HLA. A ce jour, 233 variants associés à la SEP ont été retrouvés, dont 200 en dehors du locus HLA (International Multiple Sclerosis Genetics Consortium, 2019). Parmi ces variants non-HLA, des associations entre la SEP et des variants des gènes *IL2RA*, *IL7RA*, *CD58* ou *CXCR5* ont notamment été identifiés (International Multiple Sclerosis Genetics Consortium, 2007, 2019).

Il est intéressant de noter que parmi les différents facteurs génétiques identifiés, une grande partie correspond à des gènes codant pour des protéines du système immunitaire, soulignant le caractère dysimmunitaire de la maladie.

C. La SEP, une maladie auto-immune

1. Neuropathologie de la SEP

La SEP se caractérise histologiquement par la formation de lésions de démyélinisations au sein du SNC. Cette démyélinisation est en générale nette avec des bords de lésion identifiables. Une inflammation est associée, et consiste en un infiltrat de macrophages et lymphocytes T (LT) CD8⁺, mais aussi de LT CD4⁺ et de lymphocytes B (LB). Plusieurs classifications anatomopathologiques ont été utilisées pour décrire les lésions du SNC, mais aucune ne faisait réellement consensus (Bö *et al.*, 1994 ; Lassmann *et al.*, 1998 ; Lucchinetti *et al.*, 2000). Récemment, Kuhlmann *et al.* ont proposé d'uniformiser la classification histologique des lésions de SEP par une approche simple évaluant l'état de myélinisation et d'inflammation du SNC (Kuhlmann *et al.*, 2017). Les différentes lésions sont ainsi identifiées par immunohistochimie en repérant l'état de myélinisation (coloration au bleu de Luxol ou marquage de protéines de myéline comme la PLP pour *Proteolipid Protein*) puis en examinant l'infiltrat inflammatoire (marquage des macrophages CD68⁺). Cette nouvelle classification propose donc la distinction de trois grands types de lésions de la substance blanche : les lésions actives, les lésions chroniques actives, et les lésions inactives. Les lésions actives sont caractérisées par une démyélinisation avec un infiltrat immun homogène dans la lésion, constitué majoritairement de macrophages et de microglies activées CD68⁺. Les lésions chroniques actives sont caractérisées par une démyélinisation hypocellulaire en son sein mais avec un infiltrat immun situé en bordure de la lésion. Les lésions inactives sont des lésions de démyélinisations dépourvues d'infiltrat immun. Il faut également noter le cas particulier de la substance blanche d'apparence normale, retrouvée principalement chez les patients avec une durée de maladie importante et une forme progressive de SEP. Cette substance blanche d'apparence normale n'est pas démyélinisée, mais on retrouve en général un infiltrat immun de macrophages et microglie activée CD68⁺ montrant l'inflammation de ce tissu.

La figure 2 illustre les différents types de lésions de la substance blanche à l'aide d'images acquises dans notre équipe de recherche.

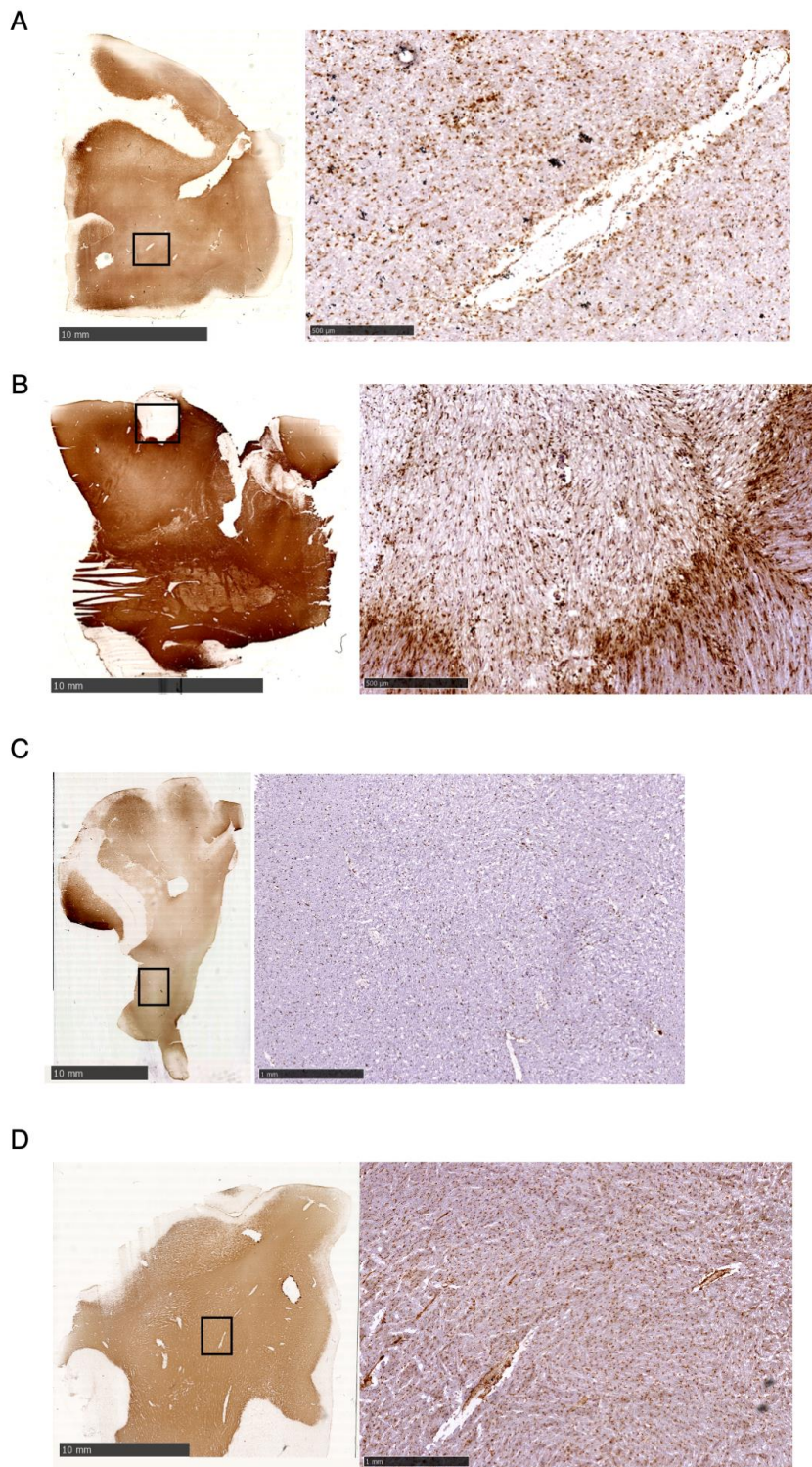


Figure 2 : Exemples de lésions de la substance blanche.

Les différentes lésions de la substance ont été caractérisées par immunohistochimie en marquant la PLP (images de gauche) pour repérer l'état de myélinisation, et le CD68 (images de droite) pour repérer l'infiltrat inflammatoire du SNC. (A) Exemple de lésion active, caractérisée par une démyélinisation avec présence d'un infiltrat immun homogène en son sein. (B) Exemple de lésion chronique active, caractérisée par une démyélinisation avec présence d'un infiltrat immun au pourtour de la lésion. (C) Exemple de lésion inactive, caractérisée par une démyélinisation avec absence d'infiltrat immun. (D) Exemple de substance blanche d'apparence normale, caractérisée par un infiltrat immun au sein d'une zone non démyélinisée.

Les exemples de lésions illustrés dans cette figure proviennent d'analyses par immunohistochimie réalisées au sein de notre équipe de recherche.

Bien que les études neuro-pathologiques de la SEP se soient longtemps consacrées aux lésions de la substance blanche, une atteinte de la substance grise est également décrite (Calabrese *et al.*, 2010). Comme pour la substance blanche, une classification des lésions corticales a été proposée. Cette classification identifie quatre types de lésions corticales. Les lésions de type 1, dites leuco-corticales, correspondent à une démyélinisation continue entre la substance blanche sous-jacente et le cortex. Les lésions de type 2, dites intra-corticales, sont des lésions atteignant le cortex sans toucher les régions sous-piales ou la substance blanche sous-corticales. Les lésions de type 3 s'étendent de la région sous-piale jusqu'aux couches moyennes du cortex. Les lésions de type 4 affectent quant à elles l'ensemble du cortex sans toucher la substance blanche adjacente (Calabrese *et al.*, 2010).

Enfin, il est intéressant de mentionner l'existence chez certains patients d'une remyélinisation des lésions. Cette remyélinisation a été retrouvée dans les différents types de lésion, mais ce processus de réparation ne parvient en général pas à rétablir le niveau de myélinisation antérieur à la lésion. De nombreuses études sont en cours pour mieux comprendre cette remyélinisation qui pourrait constituer une nouvelle piste thérapeutique (Stangel *et al.*, 2017).

Les différentes atteintes du SNC observées dans la SEP, tant au niveau de la substance blanche qu'au niveau cortical, sont marquées par une inflammation plus ou moins importante du tissu avec une activation gliale et une infiltration de cellules immunitaires (macrophages et lymphocytes) soulignant à nouveau l'importance du système immunitaire dans la physiopathologie de la maladie.

2. Rôle de l'immunité innée

Comme vu précédemment, la SEP est aujourd'hui considérée comme une maladie d'origine auto-immune. De nombreuses études ont été effectuées ces dernières années pour mieux comprendre l'implication des différents acteurs du système immunitaire dans la physiopathologie de la maladie. Dans cette partie sera revu le rôle de différents composants du système immunitaire inné dans la physiopathologie de la SEP.

Les cellules dendritiques (DC pour *dendritic cells*) sont des cellules immunes dont la fonction principale est d'être les cellules présentatrices de l'antigène (CPA) professionnelles. Dans la SEP, il a été montré que les DC circulantes des patients avaient un phénotype activé avec une surexpression de certains marqueurs comme les molécules d'activation CD40 ou CD80 (Karni *et al.*, 2006 ; Thewissen *et al.*, 2014). Certaines études ont également retrouvé une sécrétion

accrue de cytokines pro-inflammatoires par les DC de patients atteints de SEP (Huang *et al.*, 1999 ; Vaknin-Dembinsky *et al.*, 2006 ; Thewissen *et al.*, 2014).

Les cellules tueuses naturelles (NK pour *natural killer*) représentent une population de lymphocytes dont les principales fonctions passent par une cytotoxicité et une sécrétion de cytokines pro ou anti-inflammatoires. Dans la SEP, nous disposons d'assez peu de preuves de l'implication de ces cellules. Mais un potentiel rôle protecteur des NK, ou de certaines populations de NK est suspectée. En effet, une augmentation des taux de NK régulateurs CD56^{bright} chez les patients SEP traités par différents immunomodulateurs a pu être observée, suggérant pour ces traitements un possible mécanisme d'action reposant en partie sur la fonction protectrice de ces cellules (Bielekova *et al.*, 2006 ; Saraste *et al.*, 2007). Récemment, une population de cellules NK exprimant le marqueur CD8 à leur surface et nommée NK8 a été identifiée. Ces cellules ont été décrites comme ayant des fonctions régulatrices en supprimant la prolifération et l'activation de LT CD4⁺, et une expansion de cette population a pu être associée à un meilleur pronostic de la maladie (McKinney *et al.*, 2021).

Les cellules gliales constituent l'ensemble des cellules non neuronales du système nerveux. Ces cellules interviennent dans la nutrition neuronale, supportent la transmission nerveuse, et maintiennent une protection du SNC. Ces dernières années, de nombreux travaux ont permis de mettre en évidence que les cellules gliales étaient des acteurs pouvant participer directement à l'inflammation du SNC observée dans la SEP. Différents arguments attestent en effet du rôle des cellules gliales dans l'inflammation : profil anormalement activé, sécrétion accrue de cytokines pro-inflammatoires, activation du système du complément, profil de CPA pouvant activer *in situ* les lymphocytes T infiltrant (Schirmer *et al.*, 2021).

Parmi les cellules gliales, la microglie constitue une population de macrophages résidents aux fonctions phagocytaires et de CPA, formant ainsi la principale défense du SNC. Comme vu précédemment, les macrophages et les cellules de la microglie activée sont les principales cellules retrouvées au sein des lésions du SNC des patients atteints de SEP (Lassman *et al.*, 2007 ; Kuhlmann *et al.*, 2017). De plus, une phagocytose par ces cellules des débris de myéline a pu être décrite montrant leur rôle effecteur dans la pathogénie de la maladie (Kuhlmann *et al.*, 2017). Sur le plan phénotypique, les cellules microgliales retrouvées au sein des lésions du SNC ont un profil activé avec une probable fonction de présentation de l'antigène aux LT infiltrant (O'Loughlin *et al.*, 2018).

Les astrocytes sont des cellules gliales du SNC ayant des fonctions très variées : rôle dans le maintien de la barrière hémato-encéphalique, rôle dans la nutrition et le métabolisme du SNC, rôle synaptique, etc. Par la sécrétion de différentes cytokines et chémokines, ces cellules

participent également à maintenir une régulation immune dans le SNC. Dans la SEP, une sécrétion anormale de cytokines et chémokines pro-inflammatoires (CXCL10, CXCL12, IFN γ , TNF α) par les astrocytes a été retrouvée, montrant que ces cellules participent activement à l'inflammation du SNC et au recrutement de cellules immunitaires (Ludwin *et al.*, 2016 ; Schirmer *et al.*, 2021).

3. Rôle des lymphocytes T CD4

Malgré une implication des différents composants de l'immunité innée dans la physiopathologie de la maladie, la grande majorité des données recueillies à ce jour témoigne d'une part prépondérante de l'immunité adaptative, avec un rôle important des lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺, et des lymphocytes B.

Les LT CD4⁺ ont été historiquement les premières cellules impliquées dans la physiopathologie de la SEP. Cette population lymphocytaire constitue un acteur clé de l'immunité adaptative dont la fonction passe par la reconnaissance de l'antigène via leur récepteur aux cellules T (TCR pour *T-cell receptor*). Cette reconnaissance de l'antigène nécessite une présentation *via* le CMH de classe II exprimé à la surface des CPA et codé par les HLA-DP/DQ/DR. Comme expliqué précédemment, le facteur de risque génétique le plus fortement associé à la SEP est le variant HLA-DRB1*15:01, soulignant ainsi le rôle important des LT CD4⁺ dans la physiopathologie de la maladie (Thompson *et al.*, 2018). Les LT CD4⁺ différenciés sont dits LT auxiliaires (Th pour *helper*), et plusieurs sous-populations ont été décrites selon le type de cytokines qu'ils sécrètent lorsqu'ils sont activés (Th1, Th2, Th9, Th17, Th22).

a. Les Th1

L'activation de LT CD4⁺ naïfs en présence d'IL-12 permet leur différenciation en Th1. Ces cellules expriment le facteur de transcription T-bet et sécrètent de l'IFN γ . Cette population de LT CD4⁺ a été la première à être impliquée dans la physiopathologie de la SEP.

En effet, un essai clinique publié en 1987 qui testait l'efficacité d'un traitement de la SEP par IFN γ a montré le rôle pathogène de cette cytokine puisque 7 patients sur 18 traités ont présenté une exacerbation des symptômes (Panitch *et al.*, 1987). Depuis, une corrélation positive a été identifiée entre les taux sériques d'IFN γ et le score clinique de la maladie (EDSS pour *Expanded Disease Severity Score*) faisant ainsi de l'IFN γ un marqueur de sévérité de la SEP (Dettke *et*

al., 1997 ; Petereit *et al.*, 2000). Des concentrations élevées d'IFN γ et d'IL-12 ont également été retrouvées dans le LCR et le SNC des patients atteints de SEP, ces concentrations augmentées étaient par ailleurs associées à la sévérité de la maladie (Khaibullin *et al.*, 2017 ; Magliozzi *et al.*, 2018).

Enfin, dans le modèle d'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE), un modèle animal de neuro-inflammation utilisé pour étudier la SEP, il a été montré que des souris déficientes en T-bet étaient protégées et ne développaient pas d'EAE, suggérant ainsi l'importance des Th1 dans la physiopathologie de la maladie (Bettelli *et al.*, 2004 ; Nath *et al.*, 2006).

b. Les Th17

L'activation de LT CD4⁺ naïfs en présence d'IL-6 et d'IL-23 permet leur différenciation en Th17. Ces cellules expriment le facteur de transcription RoR γ T et sécrètent plusieurs cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-17A, l'IL-21 ou l'IL-22.

De manière intéressante, il a été montré qu'un transfert adoptif de Th17 spécifiques de peptides de myéline permettait d'induire une EAE chez les souris receveuses, le potentiel pathogénique étant dépendant en partie de la production d'IL-17 par ces cellules (Langrish *et al.*, 2005).

Chez les patients, plusieurs arguments attestent d'une implication des Th17 dans la physiopathologie de la maladie. En effet, l'ARNm de l'IL-17 a été retrouvé en plus forte quantité dans le sang et le LCR de patients SEP que de témoins sains (Matusevicius *et al.*, 1999). La fréquence des Th17 a également été retrouvée augmentée dans le sang de patients SEP de forme RR active par rapport à des patients ayant une forme RR inactive (Durelli *et al.*, 2009). Les Th17 ont par ailleurs été décrits comme ayant une forte capacité de migration vers le SNC dans des modèles *in vitro* et *in vivo*, et sont retrouvés au sein de lésions du SNC de patients SEP (Kebir *et al.*, 2007). De plus, en 2008 Tzartos *et al.* ont identifié que plus de 80% des LT CD4⁺ infiltrant les lésions actives du SNC de patients SEP sécrétaient de l'IL-17, soulignant la potentielle pathogénicité de ces cellules (Tzartos *et al.*, 2008).

Enfin, un essai clinique testant l'efficacité du secukinumab, un anticorps monoclonal ciblant l'IL-17A, chez des patients atteints de SEP RR a montré une efficacité dans la réduction de l'activité lésionnelle des patients traités soulignant donc le rôle pathogène de cette molécule (Havrdova *et al.*, 2016).

c. Les autres Th

Ces dernières années, une plasticité dans la différenciation des LT CD4⁺ a pu être observée. Une population de LT CD4⁺ a ainsi été identifiée comme partageant des caractéristiques des Th1 et des Th17 : ces cellules co-expriment les facteurs de transcription T-bet et RoRγT, et sécrètent à la fois de l'IFNγ et de l'IL-17. Par la suite, ces cellules seront nommées Th1.17.

Cette population de Th1.17 semble impliquée dans la physiopathologie de la SEP. En effet, dans le modèle animal d'EAE, il a été montré qu'une partie des LT CD4⁺ infiltrant le SNC de ces souris sécrétaient à la fois l'IFNγ et l'IL-17A (Hirota *et al.*, 2011).

De la même manière, des LT CD4 co-exprimant les facteurs de transcription T-bet et RoRγT et sécrétant de l'IFNγ et de l'IL-17 ont été identifiés dans le SNC de patients atteints de SEP (Kebir *et al.*, 2009). Ces cellules pourraient donc jouer un rôle important dans la physiopathologie de la maladie, comme le suggère une étude ayant retrouvé une fréquence accrue de ces cellules ainsi que de leur sécrétion d'IFNγ et de GM-CSF dans le LCR de patients SEP comparativement au sang apparié (van Langelaar *et al.*, 2018). Par ailleurs, cette population aux fonctions pro-inflammatoires importantes a récemment été identifiée comme infiltrant le SNC des patients et présentant une résistance aux corticoïdes (Koetzier *et al.*, 2020). En 2019, par l'utilisation de la cytométrie en masse, une technologie permettant l'exploration de plus de 30 marqueurs phénotypiques exprimés par des cellules, Galli *et al.* ont identifié une nouvelle population de LT CD4⁺ surreprésentée dans le sang des patients SEP de forme RR par rapport à des témoins sains. Ces cellules avaient pour signature une sécrétion élevée de GM-CSF, mais également d'IL-2, de TNF et d'IFNγ. De plus, cette population de LT CD4⁺ sécréteurs de GM-CSF avaient majoritairement un profil de LT CD4⁺ effecteurs et exprimaient à leur surface le marqueur CXCR4. Enfin dans cette même étude, ces cellules ont été retrouvées en fréquence accrue dans le LCR des patients par rapport au sang apparié, et un infiltrat au sein des lésions du SNC a pu être décrit (Galli *et al.*, 2019). Ces résultats suggèrent donc l'importance potentielle de cette population de LT CD4⁺ exprimant CXCR4 et sécrétant le GM-CSF dans la physiopathologie de la SEP.

Différentes études ont été menées afin d'identifier un ou des auto-antigènes reconnus par les LT CD4⁺ des patients SEP. Ainsi, une reconnaissance par les LT CD4⁺ d'antigènes du SNC a pu être décrite chez les patients SEP (Harp *et al.*, 2008 ; Harp *et al.*, 2010 ; Fraussen *et al.*, 2016 ; Jelcic *et al.*, 2018 ; Wang *et al.*, 2020). De manière intéressante, la plupart de ces études ont mis en évidence une sécrétion d'IFNγ par ces LT CD4⁺ autoréactifs, relevant l'importance de la polarisation Th1 ou Th1.17 des LT CD4⁺ dans la physiopathologie de la maladie (Harp *et*

al., 2008 ; Harp *et al.*, 2010 ; Fraussen *et al.*, 2016 ; Jelcic *et al.*, 2018 ; Wang *et al.*, 2020). Enfin, de récents travaux ont également décrit une réactivité de LT CD4⁺ infiltrant le LCR de patients SEP contre des antigènes issus du microbiote intestinal, soulignant un probable mimétisme moléculaire entre des antigènes microbiens et du SNC (Planas *et al.*, 2018 ; Wang *et al.*, 2020).

d. Les LT régulateurs

Les LT régulateurs (Tregs) sont une population de LT CD4 caractérisés par l'expression du facteur de transcription Foxp3 et aux fonction immuno-régulatrices.

Différentes études réalisées dans des modèles animaux d'EAE ont montré l'importance des Tregs dans la limitation de la neuro-inflammation (Kohm *et al.*, 2002 ; McGeachy *et al.*, 2005). Foxp3 étant un facteur de transcription, les caractérisations fonctionnelles des Tregs sont rendues difficiles chez l'homme. Bien que la fréquence des Tregs ne semble pas altérée chez les patients SEP, différentes études ont rapporté une fonction suppressive amoindrie de ces cellules chez les patients (Viglietta *et al.*, 2004 ; Haas *et al.*, 2005 ; Kumar *et al.*, 2006 ; Frisullo *et al.*, 2009). Il faut toutefois noter que certaines études définissaient les Tregs comme étant des LT CD4⁺CD25^{hi}. En éliminant les cellules activées CD127⁺ parmi les LT CD4⁺CD25^{hi}, aucune différence dans la fonction suppressive des Tregs n'a ainsi pu être identifiée entre les patients SEP et des témoins sains (Michel *et al.*, 2008).

Il est également intéressant de noter l'existence de LT CD4⁺ régulateurs induits en périphérie et n'exprimant pas le facteur de transcription Foxp3, ces cellules ont été nommées Tr1 (Kitz *et al.*, 2018). La sécrétion d'IL-10 ainsi que la fonction suppressive des Tr1 ont été retrouvées amoindries chez les patients SEP, suggérant l'importance de cette population de Tregs particuliers dans la physiopathologie de la maladie (Astier *et al.*, 2006 ; Martinez-Forero *et al.*, 2008).

Les Tregs ne sont pas retrouvés dans les lésions du SNC des patients atteints de SEP, suggérant que ces cellules n'interviennent pas localement pour réguler l'inflammation (Tzartos *et al.*, 2008). Mais de manière intéressante, une certaine plasticité des Tregs a été décrite : en contexte inflammatoire ces cellules seraient capables d'acquérir un profil inflammatoire, notamment par la sécrétion de cytokines comme l'IL-17 (Beriou *et al.*, 2009). Ainsi, le fait de ne pas retrouver de Tregs dans le SNC des patients pourrait être lié à une orientation de ces cellules vers un profil inflammatoire et à une perte de leurs fonctions régulatrices. C'est en effet ce que suggère l'étude de Dominguez-Villar *et al.* en retrouvant chez des patients SEP une fréquence accrue

de Tregs sécréteurs d'IFN γ avec une fonction suppressive réduite (Dominguez-Villar *et al.*, 2011). La mise en culture de Tregs en présence d'IL-12 semble suffisante pour orienter ces cellules vers une polarisation Th1, les conduisant à sécréter de l'IFN γ et à perdre leur fonction suppressive (Dominguez-Villar *et al.*, 2011 ; Kitz *et al.*, 2018). Certaines études ayant mis en évidence des taux anormalement élevés d'IL-12 dans le LCR et SNC des patients SEP, on peut donc penser que dans ce contexte les Tregs acquièrent un profil inflammatoire les empêchant de réguler l'inflammation locale (Khaibullin *et al.*, 2017 ; Magliozzi *et al.*, 2018).

4. Rôle des lymphocytes T CD8

Les LT CD8⁺ ou cytotoxiques sont des cellules de l'immunité adaptative dont la fonction est d'éliminer les cellules cibles (cellules infectées ou tumorales). Cette fonction nécessite une reconnaissance de l'antigène présenté par le CMH de classe I exprimé par toutes les cellules et codé par le HLA-A/B/C.

Comme pour le CMH-II, des associations ont été observées entre variants du CMH-I et risque de développer une SEP. On peut citer par exemple le variant HLA-A*02:01 qui a été identifié comme protecteur alors que le variant HLA-A*03:01 a quant à lui été identifié comme à risque de développer la maladie (Fogdell-Hahn *et al.*, 2000 ; Moutsianas *et al.*, 2015).

Un des arguments majeurs de l'implication des LT CD8⁺ dans la physiopathologie de la SEP est leur présence majoritaire dans le SNC des patients par rapport aux LT CD4⁺ (Hauser *et al.*, 1986 ; Babbe *et al.*, 2000 ; Machado-Santos *et al.*, 2018). Par ailleurs, certaines études réalisées dans des modèles animaux ont permis de mettre en évidence un rôle direct des LT CD8⁺ dans la dégradation de la myéline par une lyse des oligodendrocytes, suggérant l'importance que peuvent avoir ces cellules dans la pathogénie de la SEP (Saxena *et al.*, 2008 ; Sobotka *et al.*, 2009). De plus, de nombreuses études ont mis en évidence une expansion oligoclonale des LT CD8⁺ dans le LCR et le SNC des patients atteints de SEP, suggérant ainsi une restriction locale du TCR de ces cellules pour un ou plusieurs antigènes (Babbe *et al.*, 2000 ; Skulina *et al.*, 2004 ; Junker *et al.*, 2007 ; Salou *et al.*, 2015 ; Beltrán *et al.*, 2019).

Récemment, une étude a mis en évidence que les LT CD8⁺ infiltrant les lésions du SNC des patients SEP avaient un profil de LT résidents-mémoires, suggérant que ces cellules persistent de manière chronique au sein du SNC où ils peuvent alors se réactiver et être responsables d'une cytotoxicité locale (Machado-Santos *et al.*, 2018).

Enfin, il a été montré que les LT CD8⁺ infiltrant le SNC des patients SEP pouvaient sécréter de l'IL-17 ou de l'IFN γ , relevant ainsi le potentiel inflammatoire de ces cellules (Tzartos *et al.*, 2008 ; Annibali *et al.*, 2011 ; Nicol *et al.*, 2018).

5. Rôle des lymphocytes B

Cette partie a été adaptée du sous-chapitre « Focus sur les lymphocytes B » écrit pour le chapitre « Immunologie de la sclérose en plaques » paru dans le livre « La sclérose en plaques – Historique, épidémiologie et pathogénie » (2019).

Les lymphocytes B (LB) sont des acteurs majeurs de l'immunité adaptative dont la fonction principale est la production d'anticorps. Les LB portent à leur surface un récepteur à l'antigène, le BCR (pour *B-cell Receptor*) qui est une immunoglobuline (Ig) membranaire. Chaque LB porte un BCR unique qui lui est propre, et ce récepteur reconnaît un épitope, motif moléculaire d'un antigène donné. Bien que les LB aient été initialement décrits comme de véritables usines de synthèse des anticorps, de récentes études ont permis d'identifier des fonctions plus variées. En effet, il est maintenant admis que les LB ont la capacité de sécréter des cytokines pro-inflammatoires (IL-6, LT α , TNF α , GM-CSF) ou anti-inflammatoires (IL-10, IL-35). Les LB ont également un rôle important dans l'activation des LT CD4⁺, soit en présentant l'antigène à ces derniers, soit en permettant l'activation finale des LT CD4⁺ par co-stimulation *via* une interaction nécessitant un contact cellulaire (CD40/CD40L).

Bien que longtemps considérée comme étant principalement médiée par les LT, de nombreux arguments ont pu attester d'un rôle des LB dans la physiopathologie de la SEP. Ainsi, en 2008, un premier essai clinique de phase II/III a testé l'efficacité du rituximab (un anticorps monoclonal anti-CD20 éliminant les LB) chez des patients atteints de SEP de forme RR et a démontré une efficacité importante du traitement sur l'inflammation radiologique (Hauser *et al.*, 2008). Par la suite, d'autres essais ont pu confirmer l'efficacité remarquable anti inflammatoire des anticorps anti-CD20 dans la SEP de forme rémittente mais aussi une efficacité partielle sur la progression dans la SEP de forme PP (Bar-Or *et al.*, 2008 ; Naismith *et al.*, 2010 ; Kappos *et al.*, 2011 ; Bar-Or *et al.*, 2014 ; Sorensen *et al.*, 2014 ; Hauser *et al.*, 2017 ; Montalban *et al.*, 2017 ; Bar-Or *et al.*, 2018 ; Hauser *et al.*, 2020).

Pour la suite l'implication des LB dans la physiopathologie de la SEP sera détaillée par compartiments : en périphérie, dans le LCR et au sein du SNC en insistant également sur la

circulation et les échanges entre ces différents compartiments. L'implication précise des plasmocytes et de la réponse humorale dans la SEP seront revues dans un chapitre différent par la suite.

a. Rôle des LB en périphérie

Il n'existe pas d'anomalies de la fréquence des LB en périphérie dans la SEP ni de franche disparité de répartition des différentes sous populations (matures naïves, mémoires, transitionnelles) (Michel *et al.*, 2014). Cependant, quelques auteurs ont rapporté une augmentation de la fréquence des plasmablastes (CD27⁺CD38^{hi}) en périphérie chez des patients de forme secondairement progressive et plus récemment chez des patients ayant présenté une myélite transverse en premier évènement inflammatoire (Romme Christensen *et al.*, 2013 ; Rivas *et al.*, 2017)

Différentes études ont également montré que les LB de patients SEP sur-exprimaient certains marqueurs tels que CD40 ou CD80, attestant ainsi d'une activation accrue de ces cellules chez les patients (Genç *et al.*, 1997 ; Mathias *et al.*, 2017).

De plus, des études ont mis en évidence la capacité des LB mémoires des patients atteints de SEP à présenter des antigènes de la myéline (MBP pour *myelin basic protein*, MOG pour *myelin oligodendrocyte glycoprotein*) aux LT CD4⁺, induisant leur activation, leur prolifération et leur polarisation en cellules Th1 sécrétant de l'IFN γ (Harp *et al.*, 2008 ; Harp *et al.*, 2010 ; Fraussen *et al.*, 2016). En 2018, par une approche élégante, Jelcic *et al.*, ont démontré que les LB mémoires de patients SEP entraînaient une auto-prolifération de LT CD4⁺ Th1 spécifiques d'un antigène exprimé dans les lésions corticales, soulignant une nouvelle fois le potentiel pathogénique de ces cellules par l'activation et la présentation d'antigènes du SNC aux LT (Jelcic *et al.*, 2018).

Il est désormais reconnu que la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires et immuno-régulatrices est une fonction importante des LB. En contexte physiologique, on considère qu'il existe un équilibre entre inflammation et régulation, mais dans le cadre des maladies auto-immunes telles que la SEP, un déséquilibre en faveur de cytokines pro-inflammatoires est suspecté. Ces dernières années, certains auteurs ont ainsi pu mettre en évidence une sécrétion amoindrie d'IL-10, une cytokine régulatrice, par les LB de patients SEP (Duddy *et al.*, 2007 ; Knippenberg *et al.*, 2011 ; Piancone *et al.*, 2016 ; Okada *et al.*, 2018 ; Cencioni *et al.*, 2020). Récemment, une étude a également mis en évidence que les patients SCI avec évolution de la maladie présentait une fréquence réduite de LB sécréteurs d'IL-10 par rapport aux patients dont

la maladie n'évoluait pas, mettant ainsi en avant la probable importance de cette fonction régulatrice des LB dans la gestion de l'inflammation dès les phases précoces de la maladie (Guerrier *et al.*, 2018).

A l'inverse, de nombreuses études ont montré une sécrétion anormalement accrue de cytokines pro-inflammatoires (LT α , TNF α , GM-CSF, IL-6) par les LB des patients atteints de SEP (Schneider *et al.*, 2011 ; Barr *et al.*, 2012 ; Li *et al.*, 2015 ; Piancone *et al.*, 2016 ; McWilliam *et al.*, 2018). Dans un travail paru en 2015, Li *et al.* ont décrit une nouvelle population de LB mémoires aux propriétés pro-inflammatoires importantes caractérisées par une co-sécrétion de GM-CSF, TNF α et IL-6. Par la sécrétion de ces cytokines, en particulier le GM-CSF, cette population de LB était fonctionnellement responsable d'une activation de cellules myéloïdes pro-inflammatoires. Dans cette même étude, les auteurs ont identifié que cette population de LB inflammatoires était anormalement plus fréquente chez les patients atteints de SEP que des témoins sains, cela étant associé à une plus forte activation de cellules myéloïdes pro-inflammatoires chez les patients. De manière intéressante, chez les patients traités par rituximab, les LB reconstitués après déplétion retrouvaient un équilibre entre LB inflammatoires sécréteurs de GM-CSF et LB régulateurs sécréteurs d'IL-10, mettant donc en évidence un des mécanismes d'action de ce traitement (Li *et al.*, 2015).

Enfin, une étude parue en 2017 a retrouvé chez des patients atteints de SEP, mais pas chez des témoins sains, une toxicité induite par le surnageant de culture de LB sur des cultures d'oligodendrocytes et neurones issus d'hommes et de rats, soulignant une possible implication directe des LB dans le développement des lésions de démyélinisation au sein du SNC des patients SEP (Lisak *et al.*, 2017).

b. Rôle des LB dans le LCR

Une des particularités du LCR des patients atteints de SEP est la présence de bandes oligoclonales d'Igs (BOC). Ces Igs sont retrouvées dans le LCR de plus de 90% des patients atteints de SEP, et leur présence fait partie des critères diagnostics de SEP depuis la révision 2017 des critères de McDonald (Andersson *et al.*, 1994 ; Thompson *et al.*, 2018). Leur présence et leur classe ont été corrélées à l'activité de la maladie, et ont été plus récemment associées à une augmentation des lésions corticales ainsi qu'à une inflammation plus importante du LCR (Joseph *et al.*, 2009 ; Farina *et al.*, 2017). Ainsi, Villar *et al.* ont associé la présence d'IgM dans le LCR à une conversion plus rapide en forme SP, à une évolution plus rapide du score EDSS, et à des formes plus graves de la maladie ; alors que l'absence de ces IgM est, elle, associée à

des formes de SEP plus bénignes (Villar *et al.*, 2003). Par ailleurs, l'absence de BOC dans le LCR est liée à une évolution du handicap plus retardée (Annunziata *et al.*, 2006). La spécificité de ces anticorps a longuement été étudiée et sera revue plus en détail dans le chapitre consacré aux plasmocytes.

Le LCR des patients atteints de SEP contient des taux élevés de CXCL13, une chémokine attirant les LB (Krumbholz *et al.*, 2006). Des taux élevés de CXCL13 dans le LCR ont pu être corrélés avec la présence d'IgM, l'infiltrat de LB dans le LCR, et ont été associés à une conversion plus précoce vers un diagnostic définitif de SEP, ainsi qu'à un risque accru de poussée inflammatoire dans l'année (Ferraro *et al.*, 2015).

En 2004, Corcione *et al.* ont caractérisé les populations de LB retrouvées dans le LCR de patients SEP. Ils ont ainsi identifié des cellules au phénotype de centroblastes, cellules habituellement retrouvées dans les organes lymphoïdes secondaires (OLS) et des LB mémoires activés ayant subi leur commutation isotypique. Ces résultats suggèrent qu'il existe probablement une différenciation lymphocytaire B dans le SNC, ici retrouvée dans le LCR des patients atteints de SEP (Corcione *et al.*, 2004). Ceci a par la suite été confirmé par plusieurs études mettant en évidence la présence d'une majorité de LB mémoires CD19⁺CD27⁺ et de plasmablastes CD19⁺CD27^{hi}CD38^{hi} dans le LCR des patients (Cepok *et al.*, 2005 ; Lee-Chang *et al.*, 2011 ; Wurth *et al.*, 2017 ; Eggers *et al.*, 2017 ; Ramesh *et al.*, 2020). La prédominance des LB dans le LCR des patients (ratio LB/monocytes) est aussi associée à une évolution plus rapide de la maladie (Cepok *et al.*, 2001) alors que la fréquence des plasmablastes est, elle, corrélée à l'inflammation radiologique (Cepok *et al.*, 2005).

Deux études récentes ont mis en évidence que les BOC et les clones de LB retrouvés dans le LCR des patients SEP persistaient au cours du temps malgré la prise de traitements (Tomescu-Baciu *et al.*, 2019 ; Greenfield *et al.*, 2019). Ces clones de LB étaient majoritairement retrouvés dans les cellules mémoires ayant subies une commutation de classe.

Enfin, de récents travaux ont mis en évidence une expansion clonale de LB mémoires et plasmablastes/plasmocytes à IgM ou IgG1 dans le LCR des patients SEP, l'analyse transcriptomique de ces cellules révélant un profil pro-inflammatoire (Ramesh *et al.*, 2020).

c. Rôle des LB dans le SNC

Les analyses anatomopathologiques des lésions du SNC des patients SEP ont montré qu'elles étaient constituées d'un infiltrat de cellules immunitaires, composé essentiellement de macrophages et de LT. Les LB et les plasmocytes sont quant à eux retrouvés en plus faible

quantité au sein des lésions de démyélinisation (Lucchinetti *et al.*, 2000 ; Lasmann *et al.*, 2007). En 2009, Frischer *et al.* ont cependant montré que les LB étaient retrouvés au sein des lésions actives et des méninges des patients de forme rémittente ou progressive, cet infiltrat étant corrélé à l'inflammation et la dégénérescence axonale. Bien qu'en faible quantité, l'infiltrat plasmocytaire a lui été retrouvé plus prononcé chez les patients de forme PP et SP (Frischer *et al.*, 2009). De plus, il a été récemment mis en évidence que les LB infiltraient le SNC des patients atteints de SEP à tous les stades de la maladie, y compris dans des phases précoces (Machada-Santos *et al.*, 2018).

De nombreuses études ont montré la présence de dépôts d'Igs au sein des lésions de démyélinisation, ainsi que la présence d'Igs et de protéines du complément dans le cytoplasme de certaines cellules identifiées comme étant des macrophages (Esiri, 1980 ; Storch *et al.*, 1998 ; Lucchinetti *et al.*, 2000 ; Barnett et Prineas, 2004). Les macrophages contenant également des protéines de la myéline, ces résultats laissent supposer qu'il y a eu une destruction de la myéline induite par le complément, lui-même étant initialement activé par les anticorps retrouvés au niveau de la myéline (Esiri, 1980 ; Storch *et al.*, 1998 ; Barnett et Prineas, 2004). Plus récemment, Barnett *et al.* ont également retrouvé ces Igs et protéines du complément au sein des lésions de démyélinisation et dans le cytoplasme des cellules phagocytaires. Mais en les retrouvant en quantité égale dans d'autres maladies neurologiques (inflammatoires ou non-inflammatoires), la spécificité de ces dépôts d'Igs à la SEP a été remise en question (Barnett *et al.*, 2009).

Ces dernières années, des auteurs ont pu identifier des amas de cellules immunitaires riches en LB dans les méninges de patients atteints de SEP de forme SP. Ces amas ayant des caractéristiques proches des OLS : à savoir des LB en prolifération, la présence de plasmocytes, des LT et des cellules aux caractéristiques proches de cellules folliculaires dendritiques, ils ont été nommés tissus lymphoïdes tertiaires (TLT) (Serafini *et al.*, 2004). Les TLT ne sont pas spécifiques à la SEP et ont été longuement caractérisés dans d'autres pathologies tels que la polyarthrite rhumatoïde, la maladie de Crohn, ou dans certains cancers. Leur présence a ainsi pu être corrélée à un bon pronostic pour l'évolution de certains cancers, alors qu'elle est corrélée à une sévérité accrue dans certaines maladies auto-immunes comme le Syndrome de Sjögren (Hiraoka *et al.*, 2016 ; Bombardieri *et al.*, 2017).

Dans la SEP, la présence de TLT a ainsi été retrouvée chez 40 à 50% des patients de forme SP, mais n'a pas été retrouvée chez des patients de forme PP ni des patients de forme RR (Serafini *et al.*, 2004 ; Howell *et al.*, 2011 ; Bell *et al.*, 2020). La présence de TLT a été corrélée à une inflammation méningée plus diffuse, une activation de la microglie plus importante, et surtout

la présence de lésions corticales (Magliozzi *et al.*, 2007). Cliniquement, ces follicules sont associés à un plus jeune âge au début de la maladie et à une évolution de la maladie plus rapide (Magliozzi *et al.*, 2007 ; Howell *et al.*, 2011). L'atteinte corticale associée suggère une possible diffusion de médiateurs cytotoxiques (facteurs solubles ? cytokines ? anticorps ?) des méninges vers le cortex (Magliozzi *et al.*, 2007 ; Magliozzi *et al.*, 2010 ; Howell *et al.*, 2011 ; Haider *et al.*, 2016). Les TLT ainsi identifiés chez les patients de forme SP ont été retrouvés principalement au niveau des sillons profonds des cortex temporaux, frontaux, insulaires, et cingulaires (Serafini *et al.*, 2004 ; Magliozzi *et al.*, 2007 ; Howell *et al.*, 2011). Plus récemment, des TLT ont aussi pu être identifiés dans les méninges de la moelle épinière de patients de forme SP. A l'instar de ce qui avait été décrit au niveau cérébral, la présence de ces follicules dans la moelle est associée à une inflammation médullaire et une perte axonale plus importantes, montrant une fois de plus l'importance des LB dans l'inflammation et la progression de la maladie (Reali *et al.*, 2020).

Une inflammation méningée caractérisée par un infiltrat de cellules immunitaire sans présence de TLT a également été identifiée chez certains patients. En 2011, l'étude de Lucchinetti *et al.* a retrouvé une inflammation corticale avec des LB péri-vasculaires chez 27% des patients étudiés. De plus, une inflammation méningée avec un infiltrat de LB a été corrélée à une démyélinisation corticale sous-jacente (Lucchinetti *et al.*, 2011). Cette inflammation méningée constituée d'agrégats de LB a également été retrouvée chez des patients de forme PP, mais à des fréquences plus faibles que chez les patients de forme SP. Cette inflammation méningée a par ailleurs été corrélée à une démyélinisation corticale sous-jacente et à une sévérité accrue de la maladie (Choi *et al.*, 2012).

En 2011, Lovato *et al.* ont effectué une analyse du répertoire du BCR des LB issus des TLT méningés et infiltrant les lésions parenchymateuses correspondantes chez des patients de forme SP. Cette équipe a ainsi pu montrer que les clones de LB des TLT méningés étaient aussi retrouvés dans le parenchyme cérébral (Lovato *et al.*, 2011). Il semble donc exister des échanges entre les différents compartiments du SNC.

d. Échange des LB entre la périphérie et le SNC

Une des questions non résolues concernant la réponse immunitaire B dans la SEP est de savoir où les LB rencontrent leur antigène. De récentes études ont montré l'existence d'échanges bidirectionnels de LB entre le SNC et la périphérie. Le séquençage à haut débit du répertoire

des Igs des LB retrouvés dans le LCR ou le sang périphérique de patients SEP a identifié chez certains patients un groupe restreint de clones de LB ayant effectué des échanges bidirectionnels à travers la barrière hémato-encéphalique (BHE) (von Büdingen *et al.*, 2012 ; Eggers *et al.*, 2017). La même équipe a retrouvé une clonalité partagée entre le LCR et le sang périphérique des LB mémoires et des plasmablastes chez 6 patients SEP étudiés sur 8 (Palanichamy *et al.*, 2014).

En 2014, Stern *et al.* ont séquencé les Igs des LB retrouvés au sein des ganglions cervicaux et le parenchyme cérébral de patients atteints de SEP. Des clones partagés entre ces deux compartiments ont également été retrouvés. Les clones primitifs ont été plus fréquemment retrouvés dans les ganglions cervicaux, suggérant ainsi une activation initiale des LB en périphérie (Stern *et al.*, 2014).

Certaines études ont par ailleurs relevé la capacité de certaines populations de LB retrouvés dans le SNC de patients SEP à migrer à travers des modèles *in vitro* de BHE (van Langelaar *et al.*, 2019 ; Michel *et al.*, 2019). L'étude de van Langelaar *et al.* a ainsi mis en évidence que les LB CXCR3⁺IgG1⁺ ont une capacité de migration et une fonction de présentation de l'antigène aux LT dépendante de l'IFN γ , soulignant ainsi une étroite collaboration entre LT et LB (van Langelaar *et al.*, 2019). La migration de cellules immunitaires vers le SNC est dépendante de l'expression et l'interaction de molécules d'adhésion entre les cellules immunitaires et les cellules endothéliales de la BHE. Bloquer certaines molécules d'adhésion par des anticorps monoclonaux afin de limiter l'infiltrat immun a ainsi permis le développement du natalizumab, un anticorps monoclonal ciblant l'intégrine VLA-4 (pour *very late antigen-4*), et dont l'efficacité dans la prise en charge de la SEP est attestée. Une autre molécule d'adhésion, ALCAM (pour *activated leukocyte cell adesion molecule*), a été retrouvée sur-exprimée par les LB de patients SEP, ces LB ALCAM⁺ constituant par ailleurs un réservoir de LB sécrétant des cytokines pro-inflammatoires. Selon un modèle d'étude *in vitro*, la migration des LB à travers la BHE était dépendante d'ALCAM. Ainsi, dans un modèle murin d'EAE, bloquer ALCAM par un anticorps monoclonal a permis de réduire l'infiltrat de LB dans le SNC des souris et la progression de la maladie faisant d'ALCAM une potentielle cible thérapeutique dans la SEP (Michel *et al.*, 2019).

Ces différents résultats suggèrent que les LB ont la capacité de migrer à travers la BHE de la périphérie vers le SNC, mais aussi du SNC vers la périphérie. Une des hypothèses est donc que les LB rencontrent initialement leur antigène dans un ganglion lymphatique cervical drainant puis migrent au sein du SNC, des clones pourraient ensuite retourner dans le ganglion subir une nouvelle différenciation, à l'origine de LB plus matures et plus affins pour leur antigène.

Les LB infiltrant le SNC auraient ainsi un profil mémoire et pro-inflammatoire, et leurs fonctions pathogènes dans le SNC passeraient par une présentation de l'antigène aux LT, une sécrétion de cytokines faisant du SNC un milieu inflammatoire propice à l'infiltrat de cellules phagocytaires, mais aussi la sécrétion d'anticorps spécifiques d'antigènes de la myéline dont la reconnaissance par les LT CD8⁺ et les cellules phagocytaires conduirait à la destruction de la myéline observée chez les patients atteints de SEP.

La figure 3 synthétise les différentes implications des LB dans la physiopathologie de la SEP.

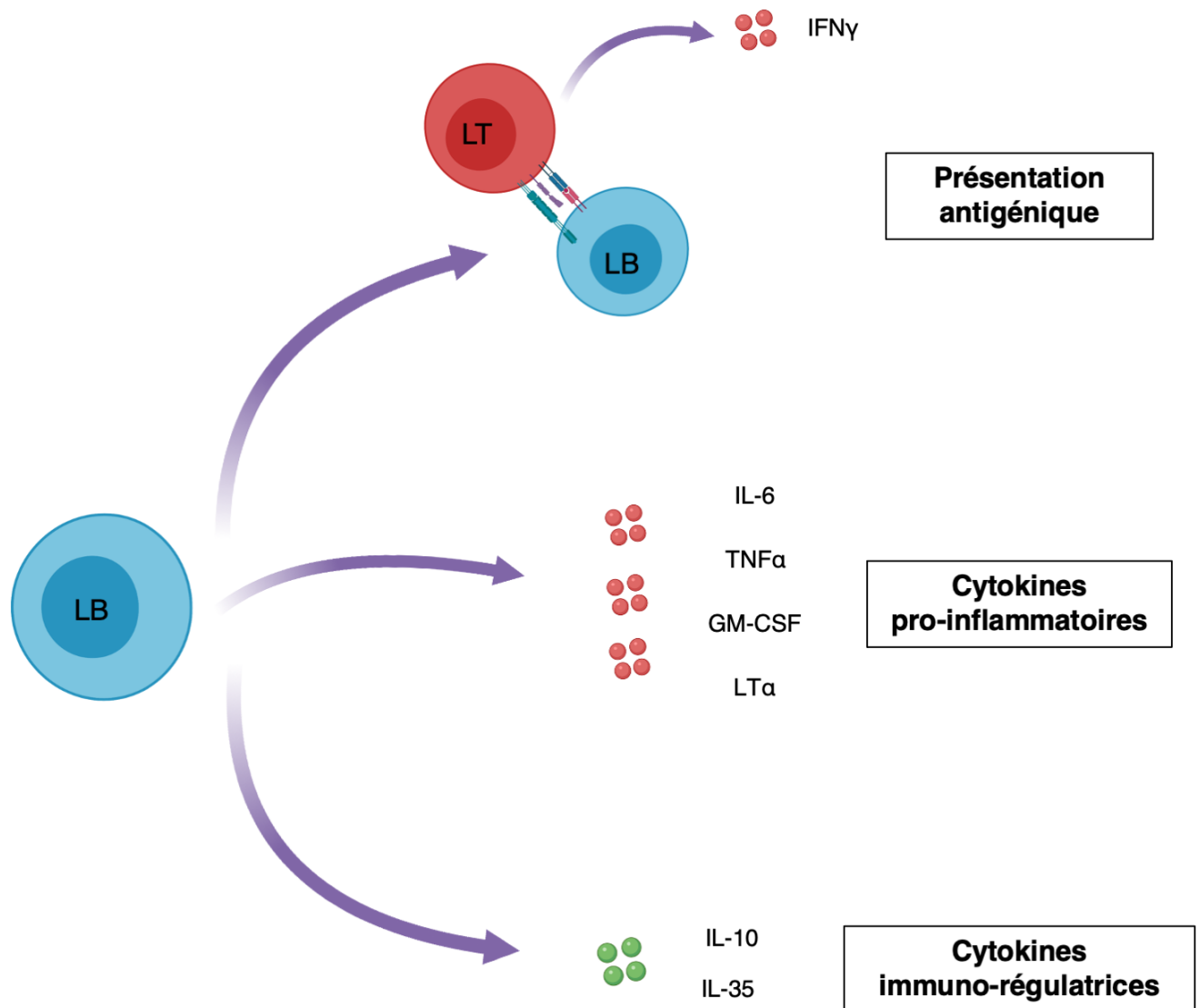


Figure 3 : Rôles des LB dans la physiopathologie de la SEP.

De nombreuses études ont décrit l'implications des LB dans la pathogénie de la SEP. Celle-ci passerait par une présentation anormale d'antigènes du SNC aux LT CD4⁺, induisant une réponse Th1 de ces derniers par la sécrétion d'IFN γ . Des sécrétions anormalement élevées de cytokines pro-inflammatoires (IL-6, TNF α , GM-CSF, LT α) mais amoindries de cytokines immuno-régulatrices (IL-10, IL-35) par les LB de patients SEP ont pu être décrits. L'ensemble de ces données démontre un rôle inflammatoire des LB qui semble principalement retrouvé au sein des LB mémoires.

Cette figure a été réalisée à l'aide de BioRender.

Cependant, comme nous avons pu le voir il existe des différences fonctionnelles au sein des LB selon leur phénotype. Ainsi les LB mémoires semblent constituer un réservoir inflammatoire pouvant être pathogène dans la maladie alors que d'autres populations de LB (LB transitionnels, plasmocytes) pourraient au contraire y jouer un rôle protecteur. Pour mieux comprendre ces disparités et développer à l'avenir des traitements qui cibleraient uniquement les populations inflammatoires de LB, il faut s'intéresser au développement physiologique des LB et à leur différenciation en LB mémoires ou plasmocytes.

II. La différenciation lymphocytaire B

A. La lymphopoïèse B

La génération des lymphocytes B, ou lymphopoïèse B, est un processus ayant lieu dans la moelle osseuse. Cette génération débute par la différenciation d'une cellule souche hématopoïétique en cellule lymphoïde progénitrice (CLP), cette dernière étant à l'origine des lignées lymphoïdes (LT, LB et cellules NK). Dans le cadre de la lymphopoïèse B, la CLP donne un précurseur B, la cellule pro-B. La cellule pro-B est une cellule lymphoïde ne possédant pas encore de BCR à sa surface. Sous l'influence de différents signaux apportés par son environnement (IL-7, cellules stromales de la moelle osseuse), la cellule pro-B subira plusieurs étapes de différenciation pour donner un lymphocyte B.

La première étape de cette différenciation se manifeste pour la cellule pro-B en l'expression d'un complexe formé d'une chaîne lourde d'Ig μ H et d'une pseudo-chaîne légère constituant un pré-BCR à la surface de ces cellules. Les cellules exprimant ce pré-BCR sont nommées cellules pré-B, et se différencient en LB matures en exprimant un BCR complet constitué de deux chaînes lourdes et deux chaînes légères.

Lors de la lymphopoïèse B, les gènes codant pour les chaînes lourdes et légères du BCR sont remaniés par les enzymes RAG1 et RAG2 (pour *recombination activating gene 1 et 2*). Cette recombinaison génétique a lieu dans les segments VDJ pour les chaînes lourdes, et VJ pour les chaînes légères des locus codant pour le BCR. Cette recombinaison a lieu dès le stade pro-B et se fait tout au long de la lymphopoïèse B, permettant ainsi l'expression d'un BCR mature. La recombinaison génétique des immunoglobulines offre également une très grande diversité du répertoire BCR (LeBien et Tedder, 2008).

A la fin de la lymphopoïèse B, les LB matures vont entrer en contact avec des antigènes du soi : les cellules réagissant sont neutralisées tandis que celles ne réagissant pas au soi vont pouvoir

exprimer à leur surface un BCR de type IgM et un BCR de type IgD. Ces LB matures sont dits naïfs car ils n'ont pas encore rencontré l'antigène contre lequel leur BCR est spécifique. A ce stade, les LB matures naïfs quittent la moelle osseuse et circulent entre la périphérie et les organes lymphoïdes secondaires (OLS) à la recherche de leur antigène (LeBien et Tedder, 2008 ; Pieper *et al.*, 2013).

La figure 4 illustre la lymphopoïèse B au sein de la moelle osseuse.

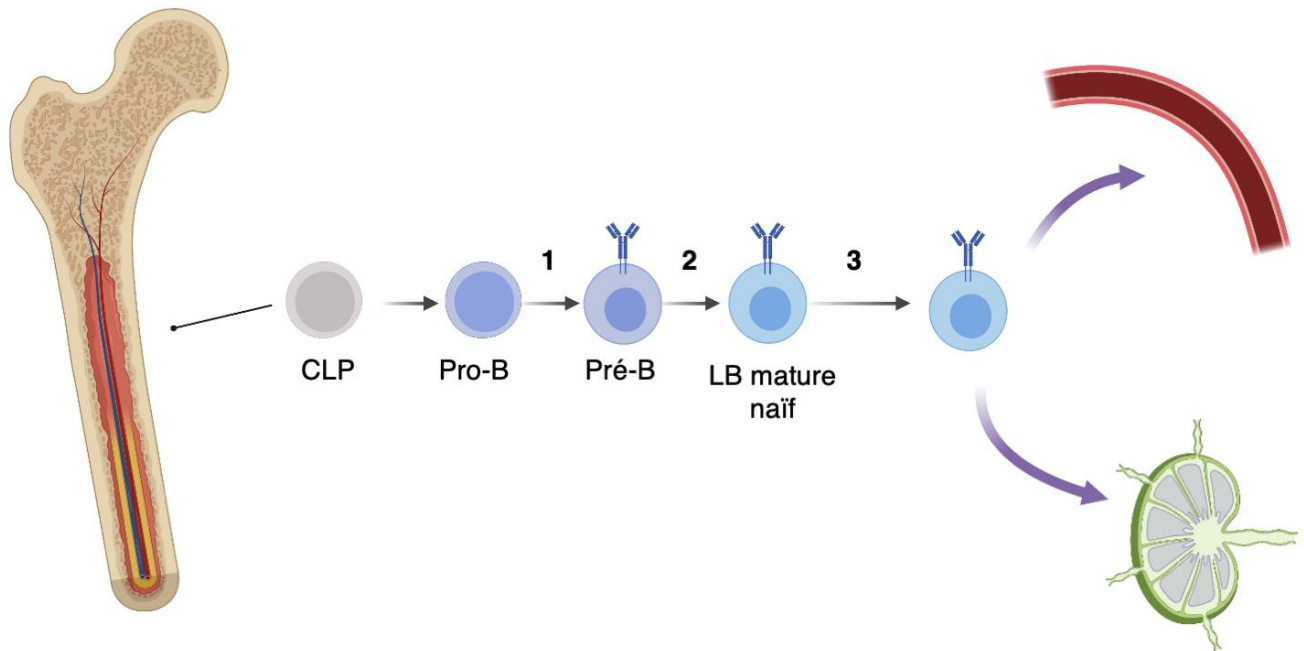


Figure 4 : La lymphopoïèse B.

L'ontogénèse des LB a lieu dans la moelle osseuse où une cellule souche hématopoïétique se différencie en cellule lymphoïde progénitrice (CLP), cellule à l'origine des différentes lignées lymphoïdes. Cette CLP se différenciera en cellule pro-B, cellule progénitrice des LB n'exprimant pas encore de BCR à sa surface. Sous l'influence d'IL-7 notamment la cellule pro-B se mettra à exprimer un pré-BCR, on parle alors de cellule pré-B. Lorsque ces dernières expriment un BCR complet à leur surface, on parle de LB matures naïfs, car n'ayant pas encore rencontré leur antigène. Ces LB expriment un BCR de type IgM et IgD, et quitteront la moelle osseuse pour circuler entre la périphérie et les OLS à la recherche de leur antigène.

Cette figure a été réalisée à l'aide de BioRender.

Au sein des OLS, les LB vont se positionner dans des follicules B où ils chercheront à rencontrer leur antigène. L'antigène peut soit être reconnu directement par le BCR à la surface du LB, soit être présenté par une cellule (cellule folliculaire dendritique, DC, macrophages). Le LB ayant rencontré son antigène est alors activé et va migrer vers la zone T de l'OLS où il entrera en contact avec un lymphocyte T folliculaire auxiliaire (Tfh pour *follicular helper T cell*). Le LB présentera l'antigène rencontré au Tfh qui en échange apportera des signaux de co-stimulation au LB. Cette activation permet alors d'initier la réaction du centre germinatif (Pieper *et al.*, 2013).

B. La réaction du centre germinatif

1. Anatomie du centre germinatif

Les centres germinatifs (CG) sont localisés au centre des follicules B dans les OLS. Les CG sont des structures transitoires, et servent de site de sélection et différenciation des LB en cellules à mémoire et plasmocytes. Les CG sont composés d'une zone sombre et d'une zone claire.

A l'interface de la zone T de l'OLS, la zone sombre est appelée ainsi en raison de la forte prolifération des LB donnant une apparence obscure sur les coupes histologiques observées en microscopie. Au contraire, dans la zone claire les LB sont moins denses et séparés par un réseau de cellules folliculaires dendritiques (FDC pour *follicular dendritic cells*), donnant un aspect plus clair (Victoria et Nussenzweig, 2012).

Différentes populations cellulaires occupent les CG : on y retrouve ainsi en premier lieu les LB du CG, des Tfh, des FDC, mais également des macrophages et des DC conventionnelles.

2. Les acteurs du centre germinatif

a. Les cellules folliculaires dendritiques

Les cellules folliculaires dendritiques font partie des cellules stromales des OLS et forment de grands réseaux dans la zone claire des CG.

Malgré leur nom, les FDC ne sont pas des cellules dendritiques d'origine hématopoïétique comme les DC conventionnelles, mais des cellules stromales d'origine mésenchymateuse. Ce nom de cellules dendritiques leur a été donné en raison de leur morphologie de cellules avec de grands prolongements.

Les FDC sécrètent du CXCL13, permettant d'attirer les LB et Tfh exprimant à leur surface CXCR5, le récepteur de cette chémokine. Des modèles expérimentaux de déplétion spécifique des FDC ont montré qu'en leur absence les follicules perdaient leur morphologie classiquement ronde au profit de larges bandes désorganisées de LB. Ces travaux ont ainsi mis en évidence le rôle essentiel des FDC dans la bonne organisation structurelle et fonctionnelle des OLS et CG (Heesters *et al.*, 2014). Mais ces cellules n'ont pas une fonction uniquement architecturale et sont au contraire importantes dans la différenciation des LB. En effet, par la sécrétion de

cytokines telles que l'IL-6 ou BAFF (pour *B-cell activating factor*), les FDC apportent des signaux qui sont nécessaires à la survie des LB dans les OLS et lors de la réaction du CG.

Les FDC ont de plus une capacité unique à retenir des antigènes intacts ou sous formes de complexes immuns pendant de longues périodes. Cette rétention de l'antigène se fait par les récepteurs au complément CD21 et CD35 qui vont fixer des antigènes opsonisés par les protéines du complément, permettant ensuite la présentation de l'antigène aux LB. Ainsi, dans la zone claire du CG les FDC présentent l'antigène aux LB activés, ce qui conduit à une sélection des LB de forte affinité pour l'antigène. Ces derniers pourront soit poursuivre un autre cycle de sélection dans le CG afin de poursuivre la maturation d'affinité de leur BCR, soit le quitter sous forme de LB mémoire ou plasmocyte (Heesters *et al.*, 2014).

Les FDC ont également une fonction importante dans la prévention de l'auto-immunité. En effet, en présentant des auto-antigènes aux LB naïfs, les FDC permettent de repérer les cellules auto-réactives et induisent par différents signaux l'apoptose de ces cellules.

Les LB n'étant pas sélectionnés par les FDC ne reçoivent pas de signaux de survie et meurent par apoptose. Or, il a été montré dans le cas du lupus qu'une accumulation de corps apoptotiques pouvait conduire à la libération d'auto-antigènes et à la génération de cellules auto-réactives (Mahajan *et al.*, 2016 ; Nagata, 2018). Les FDC jouent là encore un rôle dans la prévention de l'auto-immunité puisqu'ils évitent cette accumulation de corps apoptotiques en recrutant les macrophages des CG qui vont phagocyter les débris cellulaires (Mahajan *et al.*, 2016).

Malgré ces différents rôles de prévention de l'auto-immunité, il peut arriver que les FDC participent directement à la réponse auto-immune en recrutant des Tfh auto-réactifs et en présentant des auto-antigènes aux LB, générant ainsi des LB mémoires et plasmocytes auto-réactifs. Les FDC peuvent enfin participer aux réponses auto-immunes de manière indirecte en n'éliminant pas correctement les LB auto-réactifs ou les corps apoptotiques de LB du CG (Aguzzi *et al.*, 2014).

b. Les lymphocytes T folliculaires auxiliaires

Les lymphocytes T folliculaires auxiliaires, ou Tfh, représentent une autre population importante des OLS et des CG. Les Tfh sont des LT CD4⁺ caractérisés par l'expression du facteur de transcription Bcl6. Lorsqu'une CPA capte un antigène sur un site infecté, elle va migrer dans un OLS afin de présenter cet antigène à un LT CD4⁺ naïf spécifique de cet antigène. Cette présentation de l'antigène, associée aux signaux présents dans l'environnement, orientera la différenciation du LT en cellule folliculaire ou non. Les LT ne se différenciant pas en Tfh

migrent vers le tissu infecté tandis que les Tfh restent dans les OLS. Différents signaux permettant la différenciation des LT CD4⁺ en Tfh ont pu être identifiés ces dernières années chez l'homme. Il semble ainsi qu'un milieu riche en IL-6, IL-12, IL-21, IL-23, TGF- β , mais pauvre en IL-2 est propice à la différenciation des Tfh (Wu *et al.*, 2018). Les LT CD4⁺ recevant ces différents signaux vont exprimer le facteur de transcription Bcl6 qui induit à son tour l'expression du récepteur de chémokine CXCR5 à la surface des Tfh. Le ligand de CXCR5 étant CXCL13, les Tfh vont être attirés par les zones riches en CXCL13, et vont ainsi migrer à la bordure des zones T et B des OLS (Vinuesa *et al.*, 2016). Une fois dans cette bordure T/B, les Tfh vont interagir avec des LB activés. Cette interaction est un véritable échange mutuel entre ces cellules puisqu'elle consiste en une présentation de l'antigène par le LB au Tfh permettant l'activation de ce dernier qui à son tour apporte des signaux de co-stimulation au LB. A ce stade, une véritable compétition pour obtenir l'aide du Tfh a lieu entre les LB. Le choix des cellules remportant cette compétition est déterminé par la fréquence et l'affinité des LB pour leur antigène. Les clones rares avec une faible affinité pour l'antigène auront moins de chance d'être sélectionnés par les Tfh et finiront par mourir par apoptose. Au terme de cette interaction, le CG peut se former et les Tfh activés vont alors migrer dans la zone claire du CG. Les Tfh du CG ont un phénotype particulier : ce sont des LT CD4⁺ exprimant fortement Bcl6, CXCR5, PD1 (pour *programmed cell death 1*) et ICOS (pour *inducible T-cell costimulator*) (Vinuesa *et al.*, 2016).

Dans la zone claire du CG, les Tfh apportent des signaux de survie et de différenciation aux LB. L'aide apportée par les Tfh aux LB se fait par des interactions nécessitant un contact cellulaire (interactions ICOS/ICOS-L, CD40-L/CD40) et des interactions indépendantes de contact cellulaire, via la sécrétion de cytokines telles que l'IL-2, l'IL-4, l'IL-10 ou l'IL-21 (Crotty, 2014). Il a en effet été montré que l'IL-2 est une cytokine importante dans la survie et la prolifération des LB, tandis que l'IL-4 et l'IL-10 ont un rôle majeur dans la différenciation des LB en LB mémoires ou plasmocytes. Par la sécrétion de CXCL13, les Tfh attirent et retiennent les LB au sein du CG, permettant de les aider dans leur différenciation. Par l'expression de FAS-L qui interagirait avec son récepteur FAS, les Tfh pourraient aussi avoir la possibilité de conduire directement à l'apoptose des LB non sélectionnés lors de la réaction du CG (Crotty, 2011). Par ces interactions, les Tfh conduisent les LB sélectionnés à une forte prolifération dans la zone sombre du CG, puis éventuellement une nouvelle sélection dans la zone claire. Selon l'intensité de l'interaction et les signaux donnés, les LB se différencieront soit en LB mémoire soit en plasmocytes.

Une population de LT folliculaires au phénotype proche des Tfh mais exprimant le facteur de transcription Foxp3 a pu être décrite, ces cellules ont alors été nommées LT folliculaires régulateurs (Tfr). Les premières études fonctionnelles des Tfr ont mis en évidence une capacité de régulation de la réaction du CG en limitant l'activation des LB et Tfh (Sage et Sharpe, 2015). Cependant, d'autres études ont par la suite montré que, notamment par la sécrétion d'IL-10, les Tfr pouvaient promouvoir la différenciation des LB au cours de la réaction du CG (Xie et Dent, 2018). Le rôle précis des Tfr dans la promotion ou la régulation de la différenciation des LB reste encore à mieux déterminer, mais par leur fonction régulatrice, les Tfr ont probablement un rôle dans la prévention de l'auto-immunité en limitant ou éliminant la génération et prolifération de Tfh et LB auto-réactifs durant la réaction du CG (Sage et Sharpe, 2020).

Après la réaction du CG, certains Tfh acquièrent une mémoire et peuvent quitter l'OLS pour devenir des cellules circulantes. En devenant des cellules circulantes ces Tfh mémoires obtiennent un nouveau phénotype caractérisé par une expression faible ou intermédiaire des molécules Bcl6, CXCR5, PD1 et ICOS. Il semblerait que ces Tfh mémoires puissent être mobilisés lors d'une nouvelle stimulation par l'antigène afin de reformer rapidement des CG et aider à nouveau la différenciation de LB (Crotty, Immunity 2019).

Ces dernières années, de nombreuses études ont été menées pour mieux caractériser les Tfh, leur phénotype et leur fonction. Ainsi, à l'instar des LT CD4⁺ non folliculaires, une polarisation des Tfh a été observée et par analogie une classification en Tfh1, Tfh2 et Tfh17 a été établie. Les Tfh1 expriment à la fois les facteurs de transcription Bcl6 et T-Bet, et sont caractérisés par une expression en surface du récepteur CXCR3 mais pas CCR6. Les Tfh2 co-expriment les facteurs de transcription Bcl6 et GATA3 et n'expriment ni CXCR3 ni CCR6 à leur surface. Les Tfh17 quant à eux co-expriment les facteurs de transcription Bcl6 et RoR γ T et expriment à leur surface le récepteur CCR6 mais pas CXCR3. Enfin, on peut aussi identifier une population co-exprimant à leur surface les récepteurs CXCR3 et CCR6 que l'on nommera par la suite Tfh1.17 (Morita *et al.*, 2011). En plus de leur différence phénotypique, ces populations de Tfh semblent aussi avoir des différences fonctionnelles. Ainsi, toutes ces cellules peuvent sécréter de l'IL-21, mais les Tfh1 ont aussi la capacité de sécréter de l'IFN γ , les Tfh2 sécrètent de l'IL-4, IL-5 et IL-13, et les Tfh17 sécrètent de l'IL-17a et IL-22. Les Tfh1.17 peuvent quant à eux sécréter à la fois de l'IL-21, de l'IL17a et de l'IFN γ (Morita *et al.*, 2011). Concernant leur capacité d'aide aux LB, les premières études à ce sujet montraient que les Tfh2 et Tfh17 étaient les plus à même d'aider les LB dans leur différenciation tandis que les Tfh1 semblaient inefficaces (Morita *et al.*, 2011 ; Bentebibel *et al.*, 2013 ; Schmitt *et al.*, 2014 ; Ueno *et al.*, 2015). Cependant, de récentes études tendent à montrer que les Tfh1 ne sont pas aussi inefficaces pour

aider les LB que ce qui était initialement pensé. En effet, l'aide des Tfh1 pourrait être apportée spécifiquement aux LB mémoires lors d'une réactivation de ces cellules tandis que les Tfh2 et Tfh17 auraient la capacité d'aider des LB naïfs (Bentebibel *et al.*, 2013 ; Ueno *et al.*, 2015). De plus, il a récemment été montré que la signalisation apportée par l'IFN γ aux LB était nécessaire à la formation spontanée de CG auto-réactifs et à la sélection de LB auto-réactifs (Domeier *et al.*, 2016). Or les Tfh1 étant la principale source de sécrétion d'IFN γ parmi les Tfh, ils pourraient avoir un rôle primordial dans les réponses auto-immunes (Morita *et al.*, 2011).

Ainsi, en sélectionnant des clones B de forte affinité, mais avec un probable garde-fou que sont les Tfr, les Tfh ont un rôle majeur dans la différenciation des LB. Mais, comme pour les FDC, les Tfh et Tfr peuvent échouer et promouvoir une auto-immunité, soit directement par la sélection de LB auto-réactifs par les Tfh et Tfr, soit indirectement par l'absence d'inhibition de la différenciation de cellules auto-réactives par les Tfr.

c. Sélection et devenir des lymphocytes B

Pour rappel, après sa rencontre avec l'antigène, le LB naïf va être activé et va migrer vers la zone T de l'OLS pour rencontrer un Tfh. Cette interaction consiste en une présentation de l'antigène par le LB au Tfh et un apport de signaux d'activation et de survie au LB par le Tfh. A l'issue de cette interaction, les LB activés vont rejoindre un CG. Cependant, une partie de ces LB activés par les Tfh ne rejoindront pas le CG : certains se différencieront directement en plasmablastes à courte durée de vie sécrétant rapidement des anticorps de faible affinité contre l'antigène tandis que d'autres se différencieront en LB mémoires sans passer par le CG. Cette différenciation directe des LB en dehors d'un CG permet d'apporter une première réponse humorale assez rapidement en quelques jours sans attendre la fin de la réaction du CG qui peut quant à elle prendre plusieurs semaines (De Silva et Klein, 2015).

Au sein du CG, les LB sont histologiquement définis comme des centroblastes ou des centrocytes. Les centroblastes sont de gros lymphocytes activés qui prolifèrent intensément, ces cellules sont retrouvées dans la zone sombre du CG. Les centrocytes sont quant à eux des lymphocytes plus petits ayant une capacité de prolifération beaucoup moins importante, on les retrouve dans la zone claire du CG (Victora et Nussenzweig, 2012).

La réaction du CG pour le LB va ainsi être une succession de cycles de proliférations clonales intenses dans la zone sombre et de sélection d'affinité par les FDC et Tfh dans la zone claire.

L'hypermutation somatique et la commutation isotypique sont deux mécanismes moléculaires importants ayant lieu lors de la réaction du CG, et sont en partie dépendants d'une enzyme : l'AID (pour *activation induced cytidine deaminase*) (Feng *et al.*, 2020).

L'hypermutation somatique a lieu dans les centroblastes de la zone sombre. Ce processus correspond à de nombreuses mutations aléatoires du BCR des LB permettant d'accroître la diversité du répertoire B. Cette diversification va aussi conduire à une variation de l'affinité du BCR pour l'antigène : elle pourra être augmentée, diminuée et dans certains cas ce phénomène peut donner naissance à des BCR auto-réactifs. Les LB étant sélectionnés selon leur affinité pour l'antigène par des FDC et Tfh dans la zone claire, les cellules ayant une faible affinité ou un BCR auto-réactif sont éliminées. Ainsi, l'hypermutation somatique permet *in fine* d'obtenir une grande diversité du répertoire B et augmente l'affinité du BCR pour l'antigène, améliorant la réponse humorale (Feng *et al.*, 2020).

La commutation isotypique se fera quant à elle lors de la sélection du LB dans la zone claire. Sous l'influence des signaux reçus, des recombinaisons des gènes codant la chaîne lourde du BCR ont lieu. Ces recombinaisons vont aboutir au remplacement de la partie constante initiale par une autre, changeant ainsi la classe d'immunoglobuline du BCR. Ainsi le BCR qui était une IgM sera par exemple remplacé par une IgG, IgE ou IgA (Feng *et al.*, 2020). La commutation permet donc d'augmenter une nouvelle fois la diversité du répertoire B. Les signaux que reçoit le LB lors de la sélection orientent le choix de la nouvelle classe d'Ig. Chaque classe d'Ig ayant des fonctions propres, la commutation permet de diversifier et spécifier la réponse humorale apportée contre l'antigène.

Au terme de la réaction du CG, les LB sélectionnés se différencient soit en LB à mémoire soit en plasmocytes.

Les LB mémoires quitteront le CG et circuleront entre la périphérie et les OLS à la recherche de leur antigène. Ces cellules ayant déjà rencontré leur antigène une première fois, elles permettent d'apporter très rapidement une réponse humorale effective lors d'une nouvelle rencontre en se différenciant en plasmablastes et en initiant une nouvelle réaction du CG (Kurosaki *et al.*, 2015).

Les LB différenciés en plasmocytes vont quitter le CG et l'OLS pour rejoindre la périphérie puis migreront dans la moelle osseuse. Dans la moelle osseuse ils termineront leur maturation et deviendront des plasmocytes à longue durée de vie. La moelle osseuse constitue une vraie niche nécessaire à la survie des plasmocytes. Le rôle de cette niche dépend des cellules stromales de la moelle ainsi que d'éosinophiles qui apportent des signaux de survie aux plasmocytes (APRIL (pour *a proliferation-inducing ligand*), IL-6). Dans la moelle les

plasmocytes ont une importante longévité leur permettant la sécrétion continue d'anticorps de forte affinité contre l'antigène dont ils sont spécifiques (Nutt *et al.*, 2015).

Grâce à leur grande longévité, les LB mémoires et les plasmocytes maintiennent une protection humorale quasi indéfiniment.

La figure 5 illustre la réaction du centre germinatif, de l'activation du LB folliculaire à la différenciation des plasmocytes et LB mémoires.

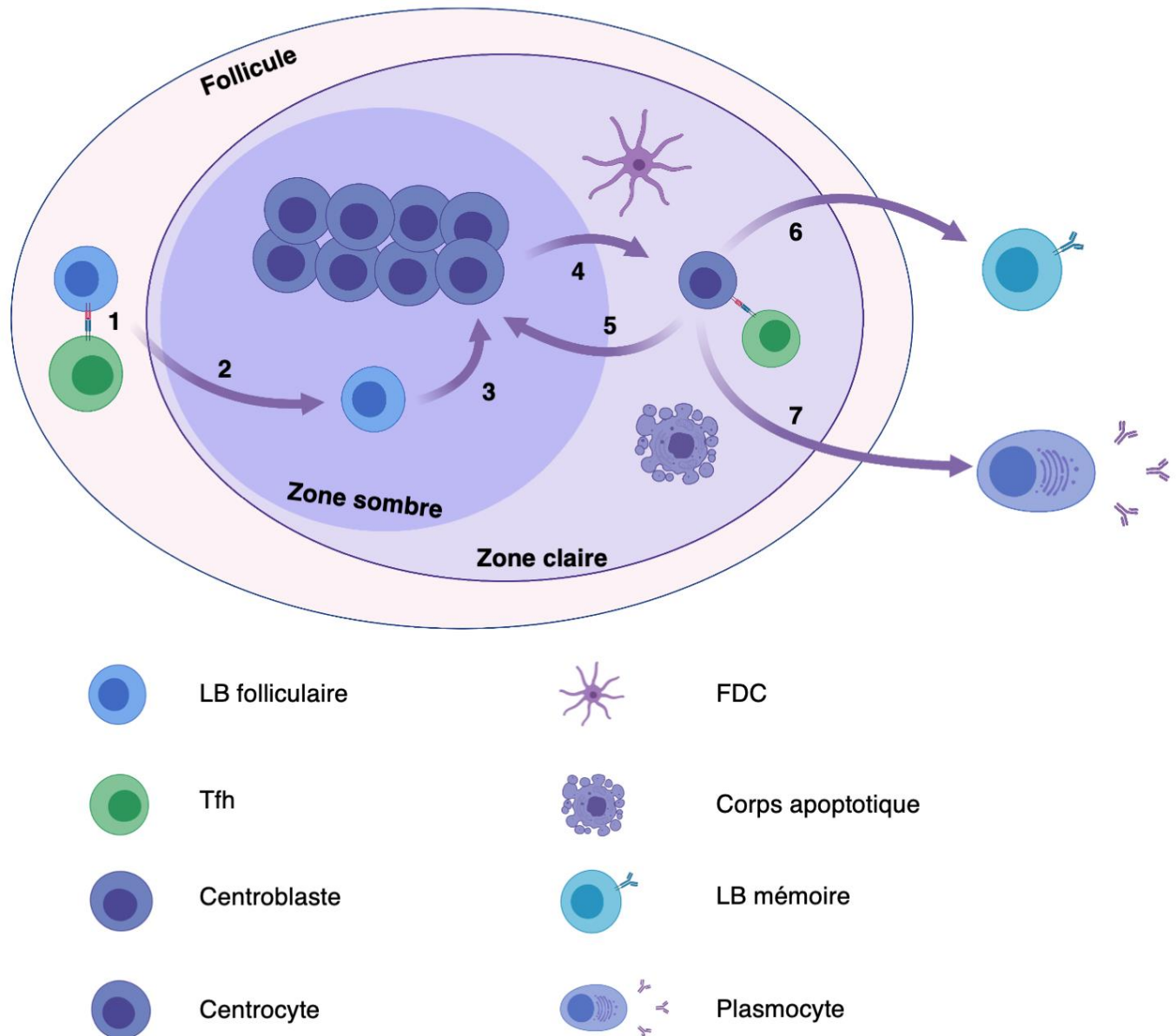


Figure 5 : La réaction du centre germinatif.

Après avoir rencontré son antigène dans la zone B d'un OLS, le LB folliculaire est activé et va à l'interface T/B rencontrer un Tfh. Cette rencontre est marquée par une présentation de l'antigène par le LB au Tfh, qui en retour apportera des signaux d'activation et de survie au LB (1). A la suite de cet échange, le LB activé va rejoindre la zone sombre d'un centre germinatif (2). Le LB va alors proliférer de manière intense, devenant un centroblaste (3). Cette étape de prolifération clonale du LB est marquée par l'hypermutation somatique, correspondant à de nombreuses mutations aléatoires du BCR, augmentant alors la diversité du répertoire B et améliorant l'affinité du récepteur à l'antigène. Après cette étape, le LB quitte la zone sombre pour rejoindre la zone claire et cesse de proliférer, il devient alors un centrocyte (4). Dans la zone claire le centrocyte recevra différents signaux de survie et/ou différenciation apportés par des FDC et Tfh. Selon les signaux reçus, le LB pourra soit mourir par apoptose, soit retourner dans la zone sombre pour subir à nouveau un cycle de prolifération et hypermutation somatique (5), soit se différencier directement en LB mémoire (6) ou plasmocyte (7). La sélection des LB au sein de la zone claire est aussi marquée par la commutation isotypique, permettant au LB de changer de classe d'Ig et ainsi augmenter la diversité des réponses apportées. Les mécanismes d'hypermutation somatique et commutation de classe se font sous l'influence d'une enzyme, l'AID.

Cette figure a été réalisée à l'aide de BioRender.

C. La réponse humorale

A l'issue de leur différenciation, les plasmablastes et plasmocytes assurent leur fonction de cellules sécrétrices d'anticorps. La structure biochimique et les mécanismes effecteurs des anticorps sont décrits ci-dessous.

1. Structure des anticorps

Biochimiquement, les anticorps sont des glycoprotéines appartenant à la superfamille des immunoglobulines. Les anticorps correspondent à la forme sécrétée du BCR, qui est le récepteur de l'antigène à la membrane des LB.

Les anticorps sont des complexes de quatre chaînes polypeptidiques réparties en deux chaînes lourdes (H) identiques et deux chaînes légères (L) identiques. Chacune de ces chaînes est composée d'une région variable (V) et d'une région constante (C), divisée en 3 à 4 domaines C pour les chaînes lourdes. Chaque chaîne légère est liée à une chaîne lourde et les deux chaînes lourdes sont liées entre elles par des ponts disulfures, le tout donnant aux anticorps leur forme caractéristique en « Y ». Historiquement, on distingue après clivage enzymatique deux parties importantes des anticorps : la région Fab et la région Fc. La région Fab (pour *fragment antigen binding*) est la partie de l'anticorps responsable de la reconnaissance antigénique et est composée d'une chaîne légère entière associée au domaine V et au premier domaine C d'une chaîne lourde. Le fragment Fc (pour *fragment crystallisable*) est composé des autres domaines C de la chaîne lourde et est responsable de la plupart des fonctions biologiques des anticorps. Chaque anticorps est ainsi composé de deux fragments Fab identiques reconnaissant l'antigène et d'un fragment Fc responsable de l'activité biologique des anticorps. Les régions variables V des chaînes lourdes et légères sont divisées en 3 régions hypervariables CDR (pour *complementary determining region*), la région CDR3 étant la plus variable des trois, son rôle est primordial dans la reconnaissance de l'antigène (Chiu *et al.*, 2019).

La structure des anticorps est illustrée dans la figure 6.

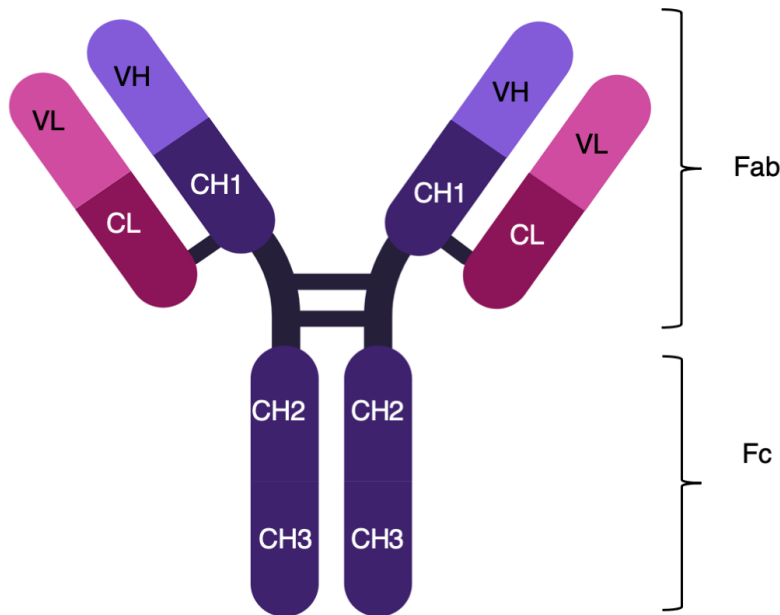


Figure 6 : Structure des anticorps.

Les anticorps sont des complexes de 4 chaînes polypeptidiques : 2 chaînes lourdes (notées H) et 2 chaînes légères (notées L). Chaque chaîne est composée d'un domaine variable (VL et VH) et de domaines constants (CL et CH). On distingue deux parties importantes de l'anticorps : le fragment Fab correspondant à une chaîne légère associée au domaine variable et au premier domaine constant d'une chaîne lourde, et le fragment Fc correspondant aux autres domaines constants des chaînes lourdes. Le fragment Fab correspond à la partie de l'anticorps permettant la reconnaissance de l'antigène, tandis que le fragment Fc permettra la plupart des activités biologiques des anticorps.

Cette figure a été réalisée à l'aide de BioRender.

Il existe deux types de chaînes légères, appelées κ et λ . Ces deux types diffèrent dans leurs régions constantes, mais leurs fonctions semblent similaires. Il existe également cinq types de chaînes lourdes, qui diffèrent elles-aussi par leurs régions constantes. Ces cinq types sont nommés μ , δ , γ , α et ϵ . Chaque chaîne légère peut s'associer à un de ces cinq types de chaînes lourdes, mais un anticorps est formé d'un seul type de chaîne légère et lourde. Le type de chaîne lourde d'un anticorps constitue sa classe ou isotype, indépendamment de la chaîne légère. Ainsi, on distingue les IgM, IgD, IgG, IgA et IgE. On distingue également des sous-classes pour les IgA et IgG qui sont respectivement nommés IgA1 et IgA2 pour les IgA, et IgG1, IgG2, IgG3 et IgG4 pour les IgG. Les isotypes d'anticorps se différencient par leur composition, leurs propriétés physiques, leur localisation et par leurs fonctions (Chiu *et al.*, 2019).

2. Mécanismes d'action de l'immunité humorale

L'effet protecteur des anticorps agit selon différents mécanismes d'action : la neutralisation, l'opsonisation, la cytotoxicité dépendante des anticorps, et l'activation du complément.

La neutralisation correspond à la capacité de l'anticorps de fixer grâce à ses fragments Fab son antigène, ce qui dans le cas d'un agent infectieux va permettre de limiter l'infection ou sa propagation. L'obtention d'anticorps neutralisant est ainsi la réponse recherchée lors d'une vaccination puisque ceux-ci empêcheront l'infection en neutralisant le pathogène. La neutralisation est une fonction particulière pour les anticorps, puisque contrairement aux autres fonctions des anticorps, elle n'est pas dépendante de leur fragment Fc (Chiu *et al.*, 2019).

L'opsonisation correspond à la capacité des anticorps à recouvrir leur cible tout en exposant leur fragment Fc. Ce regroupement de fragments Fc pourra alors se lier à un de leurs récepteurs situés à la surface de cellules phagocytaires (macrophages, neutrophiles). L'opsonisation conduit ainsi à la liaison de nombreux fragments Fc à leur récepteur, activant la cellule qui peut par la suite phagocyter la cible opsonisée. L'opsonisation est un mécanisme de défense important face à certains pathogènes comme les bactéries encapsulées qui échappent à la phagocytose en absence d'anticorps.

De la même manière que pour l'opsonisation, il peut arriver que les anticorps ciblent des cellules de l'hôte et les recouvrent. Les fragments Fc de ces anticorps se lient ensuite à leurs récepteurs situés sur des cellules effectrices, la plupart du temps des NK. Les cellules effectrices étant activées par cette liaison tuent la cellule cible, on parle alors de cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps. Ce mécanisme a récemment été décrit comme étant à l'origine de l'efficacité de certains traitements par anticorps monoclonaux, comme le rituximab, un anti-CD20 éliminant les LB (Battella *et al.*, 2016).

Enfin, les anticorps permettent également d'activer le système du complément aboutissant à la formation du complexe d'attaque membranaire, un polymère de protéines du complément permettant la lyse de la cellule cible. Une fois activé, la fonction finale du système du complément est l'élimination de sa cible par le complexe d'attaque membranaire (Daha *et al.*, 2011). Cependant, le système du complément a d'autres fonctions, et ses membres sont de vrais médiateurs de l'inflammation. Ainsi l'activation du complément permet le recrutement de cellules immunitaires comme les neutrophiles qui vont pouvoir phagocyter leur cible. Le complément a également un rôle fondamental dans la réponse humorale puisqu'il peut d'une part stimuler directement les LB, et d'autre part la liaison de protéines du complément aux antigènes permet d'accroître l'efficacité de présentation de l'antigène par les FDC dans les OLS lors de la sélection des LB, améliorant ainsi la production finale d'anticorps (Batista et Harwood, 2009).

La commutation isotypique des LB ayant lieu lors de leur sélection dans les CG permet la production d'anticorps de différents isotypes : IgM, IgG, IgA et IgE. Ces isotypes varient par

la composition des régions constantes de leurs chaînes lourdes. Les fragments Fc étant différents selon les isotypes, leurs réponses biologiques le sont aussi. Des fonctions spécifiques à certains isotypes ont ainsi pu être identifiées.

Les IgE sont en grand nombre liées à leur récepteur de haute affinité FcεRI situé à la surface des basophiles et mastocytes. La fixation de leur antigène conduit à l'activation et la dégranulation de médiateurs inflammatoires de ces cellules. Les IgE et cette réponse inflammatoire sont importantes dans la défense contre les helminthes, mais aussi dans les réactions d'hypersensibilité immédiate. La fonction d'activation du système du complément est spécifique aux IgM et à certains IgG (IgG1 et IgG3). Grâce aux différents récepteurs aux IgG (FcγR) présents à la surface de nombreuses cellules, les IgG sont l'isotype d'anticorps ayant la plus grande diversité de fonctions. Ainsi, en plus de l'activation du complément, ils sont impliqués dans la neutralisation, l'opsonisation et la cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps. Par leur récepteur inhibiteur FcγRIIb situé à la surface des LB, les IgG ont également un rôle de régulateur de la réponse humorale puisque la fixation à ce récepteur limite l'activation des LB. Enfin, les IgA ont une fonction importante d'immunité associée aux muqueuses décrite plus bas (Cyster et Allen, 2019).

Les IgA sont en effet essentielles dans l'immunité des différentes muqueuses (orales, génitales, pulmonaires), mais c'est dans l'intestin où cette fonction est primordiale. Dans la *lamina propria* de l'intestin, on retrouve des tissus lymphoïdes associés aux intestins (GALT, pour *gut associated lymphoid tissue*). Ces GALT sont des OLS importants pour l'immunité associée aux muqueuses. En effet, dans ces GALT, l'environnement riche en TGF-β associé aux molécules BAFF et APRIL induit une différenciation des LB en plasmocytes à IgA. Les IgA y sont retrouvées en grande majorité par rapport aux autres isotypes, expliquant son rôle important dans l'immunité des muqueuses. Par la taille de la muqueuse intestinale, l'IgA est même la principale Ig sécrétée devant les IgG qui sont pourtant majoritaires dans le sang. Il existe deux sous-classes d'IgA : l'IgA1 qui est majoritaire dans le sang, et l'IgA2 qui est majoritaire dans l'intestin. Pour assurer leur fonction dans l'intestin, les IgA doivent être transportées de la *lamina propria* vers la lumière intestinale. Ce transport se fait grâce à un récepteur au Fc particulier, le récepteur aux Ig polymériques (pIgR) situé au pôle basal des cellules épithéliales qui fixe des Ig polymériques. Les IgA se présentent sous forme dimériques reliées par une petite protéine, la chaîne J. La fixation des IgA au pIgR entraîne une endocytose du complexe IgA-récepteur qui est transporté au pôle apical de la cellule. La cellule sécrète alors dans la lumière intestinal un complexe composé des IgA dimériques, la chaîne J et un fragment du pIgR appelé composant sécrétoire. Ce complexe sécrété est appelé IgA sécrétoire et permet l'immunité

associée aux muqueuses (Li *et al.*, 2020). Les fonctions des IgA dans la lumière intestinale sont alors multiples : neutralisation de virus et toxines, blocage de l'adhérence ou la migration de bactéries, participation à l'homéostasie de l'épithélium intestinal (Macpherson *et al.*, 2018 ; Bunker et Bendelac, 2018 ; de Sousa-Pereira et Woff, 2019).

Les IgA sont aussi présentes dans le sérum où elles sont le deuxième isotype sécrété après les IgG. Les fonctions des IgA sont alors dépendantes de leur récepteur Fc α RI (CD89) exprimé à la surface de cellules immunitaires telles que des macrophages, monocytes ou neutrophiles. Il a été montré que la liaison d'IgA sous forme monomérique ou dimérique au récepteur CD89 induit une réponse inhibitrice sur ces cellules, permettant le maintien d'une régulation de l'inflammation. Mais dans certains cas, notamment lors d'infections, la liaison au récepteur CD89 de complexes immuns formés d'IgA avec leur antigène active alors les cellules cibles, induisant une réponse inflammatoire (Hansen *et al.*, 2019 ; de Sousa-Pereira et Woff, 2019). Selon le contexte et leur forme complexée ou non, les IgA peuvent donc induire une réponse régulatrice ou inflammatoire. Enfin, il est intéressant de noter que le déficit sélectif en IgA, un déficit immunitaire primitif, est une maladie caractérisée par un déficit en IgA, mais pas en IgG et IgM, et est associée à des manifestations auto-immunes soulignant l'importance des IgA dans leur rôle immuno-régulateur (Singh *et al.*, 2014).

Comme nous venons de le voir dans ce chapitre, la différenciation lymphocytaire B est un long processus qui va conduire une cellule souche hématopoïétique à devenir un plasmocyte sécréteur d'anticorps. Ce processus se fait par des différenciations successives et crée une diversité de populations au sein des LB. La fonction finale étant la production de plasmocytes à longue durée de vie qui sécrètent des anticorps durant toute la vie de l'hôte, générant ainsi une protection humorale efficace. Tout au long de leur différenciation, les LB font face à certains garde-fous contre la génération de cellules auto-réactives. Cependant, comme nous l'avons vu il arrive que ces moyens de défense échouent et laissent des LB auto-réactifs se différencier en plasmocytes sécrétant des auto-anticorps.

Les plasmocytes et leur pathogénicité ont été longuement étudiés dans les maladies auto-immunes. La SEP ne faisant pas exception, l'implication des plasmocytes dans la physiopathologie de la maladie est revue dans le chapitre suivant. Étant donné le rôle important des Tfh dans l'aide apportée lors de la différenciation des LB en LB mémoires et plasmocytes, les études portant sur le rôle de ces cellules dans la SEP seront aussi revues dans ce chapitre.

III. Différenciation lymphocytaire B et SEP

A. Les plasmocytes, acteurs pathogéniques ou protecteurs dans la SEP ?

Les premières études portant sur l'implication des plasmocytes dans la pathogénie de la SEP se sont intéressées aux auto-anticorps et ont tenté de répondre aux questions suivantes : sont-ils présents dans la SEP ? sont-ils pathogènes ? quels sont les auto-antigènes cibles de ces anticorps ?

Les différents aspects de la réponse humorale et de son implication dans la SEP seront revus selon les données obtenues en périphérie, dans le LCR et dans le SNC. Enfin, l'aspect protecteur dans la maladie des cellules sécrétrices d'anticorps sera également abordé.

1. La réponse humorale en périphérie

Des auto-anticorps dirigés contre des antigènes du SNC ont ainsi été identifiés dans le sérum de patients atteints de SEP (Wanleenuwat et Iwanowski, 2019 ; Yu *et al.*, 2020). Parmi les auto-anticorps retrouvés, certains étaient spécifiques de peptides de la myéline, tels que la MOG ou la MBP. Bien qu'initialement des taux anormalement élevés de ces anticorps ont été décrits chez les patients SEP, des études ultérieures n'ont pas trouvé d'association entre la présence de ces anticorps et le diagnostic de SEP (Zhou *et al.*, 2006 ; Kuhle *et al.*, 2007 ; Reindl et Waters, 2019). Néanmoins, par l'utilisation de puces permettant de tester la spécificité antigénique d'anticorps sériques contre plus de 200 antigènes d'intérêt, une récente étude a retrouvé une réactivité plus importante du sérum de patients SEP par rapport à des témoins sains contre 64 antigènes myéliniques. Après stimulation de LB, une réactivité accrue des anticorps sécrétés par les cellules des patients contre des antigènes myéliniques a également été détectée. Cependant, bien qu'une réactivité antigénique ait été retrouvée augmentée chez les patients, la réplication de ces tests dans différentes cohortes n'a pas permis d'identifier d'auto-antigènes partagés entre les patients, suggérant que la réponse humorale dirigée contre le SNC est hétérogène entre les patients atteints de SEP (Kuerten *et al.*, 2020).

En parallèle, des antigènes du SNC non myéliniques ont été proposés comme des cibles potentielles d'auto-anticorps. Parmi ceux-ci, le canal potassique KIR4.1 exprimé dans le SNC à la surface des astrocytes a été identifié en 2012 comme la cible d'auto-anticorps chez près de 50% des patients SEP alors qu'il était absent chez les témoins sains, relevant son potentiel rôle

d'auto-antigène dans la SEP (Srivastava *et al.*, 2012). Cependant, les différentes études répliquant ce travail n'ont pas retrouvé des taux aussi élevés de cet auto-anticorps chez les patients SEP, certaines ne retrouvant même pas de différence entre patients et témoins sains (Nerrant *et al.*, 2014 ; Brickshawana *et al.*, 2014 ; Pröbstel *et al.*, 2016 ; Chastre *et al.*, 2016). L'implication de ces différents auto-anticorps dans la physiopathologie de la maladie reste à ce jour controversée (Li *et al.*, 2018).

Différentes questions restent à élucider : ces auto-anticorps sont-ils des marqueurs de l'inflammation ayant lieu au sein du SNC ? Ont-ils un rôle pathogénique direct ?

2. La réponse humorale dans le LCR

Pour rappel, le LCR des patients SEP est un milieu inflammatoire dans lequel une sécrétion de bandes oligoclonales d'immunoglobulines (BOC) a été décrite. La détection de ces BOC est même un critère diagnostique de SEP (Thompson *et al.*, 2018). Les Igs oligoclonales sont plus souvent des IgG, mais la présence d'IgM oligoclonales, bien que moins fréquente a été associée à une sévérité accrue de la maladie, tandis que l'absence de BOC a quant à elle été associée à une évolution plus lente du handicap (Villar *et al.*, 2003 ; Villar *et al.*, 2005 ; Annunziata *et al.*, 2006 ; Magliozzi *et al.*, 2020). Différentes études ont retrouvé des infiltrats de plasmablastes et plasmocytes oligoclonaux dans le LCR des patients SEP (Owens *et al.*, 2007 ; Wings *et al.*, 2007 ; Ramesh *et al.*, 2020). Les analyses portant sur la sécrétion d'anticorps de ces plasmocytes infiltrant le LCR ont montré qu'ils étaient à l'origine de la sécrétion des Igs oligoclonales (Obermeier *et al.*, 2008 ; von Büdingen *et al.*, 2010). Enfin, différentes études ont été menées pour identifier la spécificité antigénique de ces BOC et leur potentielle pathogénicité. En produisant des anticorps monoclonaux dérivés des plasmablastes ou plasmocytes infiltrant le LCR des patients puis en testant leur spécificité antigénique, certaines équipes ont ainsi retrouvé une spécificité de ces anticorps contre la myéline (von Büdingen *et al.*, 2008 ; Brennan *et al.*, 2011 ; Blauth *et al.*, 2015). Dans un travail publié en 2015, une équipe américaine a produit des anticorps IgG1 monoclonaux recombinants dérivés de plasmablastes issus du LCR de patients SEP. Ces anticorps mis en contact avec des cultures de moelle épinière de souris entraînaient une démyélinisation induite par le complément mettant en évidence la pathogénicité directe de ces anticorps (Blauth *et al.*, 2015). Cependant des travaux similaires n'ont pas retrouvé de spécificité antigénique contre la myéline de ces anticorps (Owens *et al.*, 2009). Plus récemment, une spécificité des BOC contre des antigènes viraux ou intracellulaires non spécifiques au SNC a été retrouvée (Brandle *et al.*, 2016 ; Graner *et al.*, 2020). A l'heure

actuelle les différentes études menées sur les auto-anticorps en périphérie ou au sein du LCR des patients n'ont pas permis de retrouver un ou des auto-antigènes partagés entre les patients SEP. L'identification d'une spécificité contre des antigènes viraux ou intracellulaires peut suggérer que la réponse humorale mise en place serait secondaire à une inflammation initiale du SNC libérant par la suite des antigènes stimulant la réponse humorale. Ces anticorps, qu'ils soient produits initialement ou en réponse à une réaction inflammatoire peuvent diriger ou accentuer la réaction immunitaire observée dans le SNC des patients.

3. La réponse humorale dans le SNC

Bien qu'en quantité moindre que les LT, des infiltrats de plasmocytes ont pu être décrits dans le SNC des patients (Frischer *et al.*, 2009 ; Pollok *et al.*, 2017 ; Machada-Santos *et al.*, 2018). Les plasmocytes infiltrant le SNC sont des cellules ayant subies une commutation isotypique, avec une grande majorité de cellules sécrétant des IgG et IgA, bien que des plasmocytes à IgM soient aussi présents (Zhang *et al.*, 2005 ; Pollok *et al.*, 2017). Des dépôts d'Igs ont été décrits dans le SNC des patients, mais comme dans le sérum ou le LCR, la spécificité antigénique de ces anticorps n'est pas connue (Lucchinetti *et al.*, 2000). Néanmoins, ces dépôts d'Igs sont retrouvés au niveau des lésions de démyélinisation, et certaines études ont montré que des débris de myéline étaient phagocytés avec des Igs et parfois des protéines du complément par des macrophages, laissant suggérer une possible destruction de la myéline induite par les anticorps (Esiri, 1980 ; Storch *et al.*, 1998 ; Barnett et Prineas, 2004 ; Barnett *et al.*, 2009).

Ainsi, malgré une hétérogénéité de la réponse humorale entre patients, des auto-anticorps ont pu être observés en périphérie, dans le LCR et au sein des lésions du SNC des patients SEP. Une spécificité contre des antigènes myéliniques a été décrite, mais également contre d'autres antigènes du SNC, des antigènes viraux ou intracellulaires, suggérant que la réponse humorale pourrait être un témoin de l'inflammation plutôt qu'un facteur initiant la maladie. Différentes études histopathologiques semblent tout de même indiquer que ces auto-anticorps jouent un rôle direct dans la démyélinisation à l'origine de la maladie.

Malgré l'implication controversée des auto-anticorps dans la maladie, il est intéressant de noter l'efficacité clinique des échanges plasmatiques dans la prise en charge des poussées sévères de SEP résistantes aux corticoïdes. Ces échanges plasmatiques permettent d'éliminer les anticorps circulants, et élimineraient ainsi de probables auto-anticorps pathogènes pendant une poussée. Il faut toutefois considérer que les échanges plasmatiques éliminent aussi d'autres substances inflammatoires (cytokines, complexes immuns), l'élimination de ces substances plutôt que celle

d'auto-anticorps pourrait donc expliquer l'efficacité de ce traitement dans la prise en charge des poussées de SEP (Tumani, 2008).

4. Rôle protecteur des cellules sécrétrices d'anticorps

Les traitements par anticorps monoclonaux anti-CD20 (rituximab, ocrelizumab, ofatumumab) ont pour conséquence l'élimination des LB mais épargnent les plasmocytes. Ces traitements ayant montré une grande efficacité dans la prise en charge de la SEP, il semblait intéressant, comme pour d'autres maladies auto-immunes, de cibler par une nouvelle voie thérapeutique les plasmocytes. Ainsi, en 2014 un essai clinique a été mené pour tester l'efficacité de l'atacept, une protéine de fusion entre le récepteur TACI (pour *transmembrane activator and CAML interactor*) et une Ig. Ce traitement conduit à une mise en compétition pour la liaison de BAFF et APRIL au récepteur TACI situé à la surface des LB, bloquant alors leur maturation en plasmablastes et plasmocytes. De manière surprenante cet essai a été rapidement arrêté car non seulement il n'était pas efficace dans la prise en charge de la maladie, mais en plus il l'exacerbait en provoquant une augmentation du taux annuel de poussées chez les patients traités (Kappos *et al.*, 2014). Cet essai clinique a permis de mettre en avant une certaine dichotomie quant à l'implication des LB dans la physiopathologie de la SEP avec d'un côté des fonctions clairement pathologiques qui sont corrigées par les anticorps monoclonaux anti-CD20, mais de l'autre côté un rôle probablement protecteur des plasmocytes dans la maladie. Pour tenter de comprendre cet effet protecteur, il faut s'intéresser aux études menées sur des modèles animaux qui ont mis en évidence ces dernières années l'existence de plasmocytes régulateurs sécrétant d'IL-10 (Fillatreau, 2018). Il est connu depuis longtemps que certains LB ont des fonctions régulatrices, mais des divergences importantes existent quant au phénotype de ces cellules (Dasgupta *et al.*, 2020).

Mais récemment, différentes études ont rapporté l'existence de plasmocytes aux fonctions régulatrices, démontrée *in vitro* et *in vivo* comme dépendante de la sécrétion d'IL-10 (Matsumoto *et al.*, 2014 ; Shen *et al.*, 2014 ; Lino *et al.*, 2018 ; Rojas *et al.*, 2019).

Quand on s'intéresse aux voies de signalisation conduisant un LB à sécréter de l'IL-10, il apparaît que ces signaux et facteurs de transcription sont également nécessaires pour leur différenciation en plasmocytes. Par exemple, l'expression des facteurs de transcription BLIMP1 et IRF4 semble nécessaire à la sécrétion d'IL-10 par les LB, or les cellules exprimant le plus fortement ces facteurs de transcription sont les plasmocytes (Fillatreau, 2018). Selon

certaines études, les plasmocytes constitueraient même la source principale de sécrétion d'IL-10 au sein des LB (Matsumoto *et al.*, 2014 ; Shen *et al.*, 2014 ; Lino *et al.*, 2018).

En 2014, Shen *et al.* ont montré que des souris déficientes en LB sécréteurs d'IL-35 développaient une EAE plus sévère que celles le sécrétant, montrant que ces cellules sécrétrices d'IL-35 ont des fonctions régulatrices importantes dans la gestion du développement de la neuro-inflammation, et indépendantes de l'IL-10. De plus, cette même étude a montré que ces LB sécréteurs d'IL-35 étaient des plasmocytes, découvrant ainsi une nouvelle population de plasmocytes régulateurs (Shen *et al.*, 2014). Cette même étude ainsi que d'autres ont montré que les plasmocytes régulateurs étaient préférentiellement des cellules sécrétrices d'IgM (Matsumoto *et al.*, 2014 ; Shen *et al.*, 2014 ; Lino *et al.*, 2018). Cependant, dans une étude de 2019, une nouvelle population de plasmocytes régulateurs sécréteurs d'IgA a été identifiée. Dans un modèle d'EAE, ces plasmocytes régulateurs à IgA étaient mobilisés depuis l'intestin vers le SNC des souris malades où ils régulaient la neuro-inflammation d'une manière dépendante de l'IL-10 (Rojas *et al.*, 2019).

Malgré quelques divergences, l'ensemble de ces études soulève donc l'importance des plasmocytes dans la régulation de l'inflammation dans des modèles animaux d'infection ou de neuro-inflammation. Chez l'homme, peu de données abondent quant à l'existence de ces plasmocytes régulateurs et leur rôle en contexte pathologique. Toutefois, l'étude de Matsumoto *et al.* en 2014 a montré que chez l'homme les plasmablastes étaient la principale source de sécrétion d'IL-10 au sein des LB, corroborant ce qui était alors montré dans les modèles animaux (Matsumoto *et al.*, 2014).

Dans la SEP, comme nous avons pu le voir, des plasmocytes sont retrouvés dans les infiltrats immuns du SNC. Initialement considérés comme faisant partie de l'infiltrat pathogénique à la maladie, les récentes études sur les plasmocytes régulateurs peuvent laisser supposer que les plasmocytes infiltrant le SNC des patients seraient en réalité des cellules régulatrices mobilisées au cours de l'inflammation. En montrant que dans les lésions du SNC des patients SEP l'IL-10 est principalement retrouvé au sein des plasmocytes, une récente étude supporte en effet cette idée (Machado-Santos *et al.*, 2018).

Très récemment, par une approche originale consistant en un séquençage de l'ARN ribosomal 16s des bactéries fécales liées ou non à des IgA, Pröbstel *et al.* ont mis en évidence que la réponse humorale de type IgA des patients SEP est orientée vers des bactéries associées à une activité pro-inflammatoire tandis que celle des témoins sains s'orientent vers des bactéries ayant un rôle plutôt immuno-régulateur, soulignant la potentielle importance de la réponse à IgA dans l'activité inflammatoire de la maladie (Pröbstel *et al.*, 2020). De plus, une synthèse intrathécale

des IgA a été identifiée dans le LCR des patients SEP, ainsi qu'une clonalité partagée des LB à IgA entre périphérie et LCR suggérant de possibles échanges de ces cellules entre la périphérie et le SNC. Dans cette même étude, bien qu'en moindre quantité que les plasmocytes à IgG, des infiltrats de plasmocytes à IgA ont été retrouvés au sein des lésions de démyélinisation, cet infiltrat étant associé à une plus forte inflammation tissulaire. Comme il avait pu être mis en évidence dans le modèle murin d'EAE, un groupe de ces plasmocytes à IgA exprimaient l'IL-10, montrant le probable rôle régulateur de ces cellules. Enfin, les auteurs de cette étude ont découvert que les IgA du LCR de patients SEP avaient une réactivité antigénique contre des bactéries du microbiote intestinal, mais pas contre des antigènes du SNC. Ces différents résultats suggèrent donc, comme il a été publié pour le modèle animal d'EAE, que les plasmocytes à IgA infiltrant le SNC des patients SEP proviendraient de LB issus de l'intestin et spécifiques de bactéries du microbiote intestinal. Au cours de l'inflammation ces cellules seraient mobilisées en périphérie et migreraient vers le SNC, possiblement pour réguler la neuro-inflammation par la sécrétion d'IL-10 (Pröbstel *et al.*, 2020).

En conséquence, toutes ces données soulèvent la complexité de la réponse plasmocytaire dans la SEP, avec d'un côté ce rôle probablement pathogénique dans la maladie par la sécrétion d'auto-anticorps et/ou de cytokines pro-inflammatoires. D'un autre côté, les plasmocytes semblent constituer un réservoir important de cellules aux fonctions régulatrices clés dans la gestion de la neuro-inflammation. L'échec de l'atacept dans la prise en charge de la maladie, ainsi que l'aggravation associée, pourraient donc provenir de la suppression de la différenciation des LB des patients SEP en plasmocytes régulateurs, éliminant ainsi un garde-fou face à cette inflammation chronique.

L'implication des plasmocytes dans la physiopathologie de la SEP est résumée dans la figure 7.

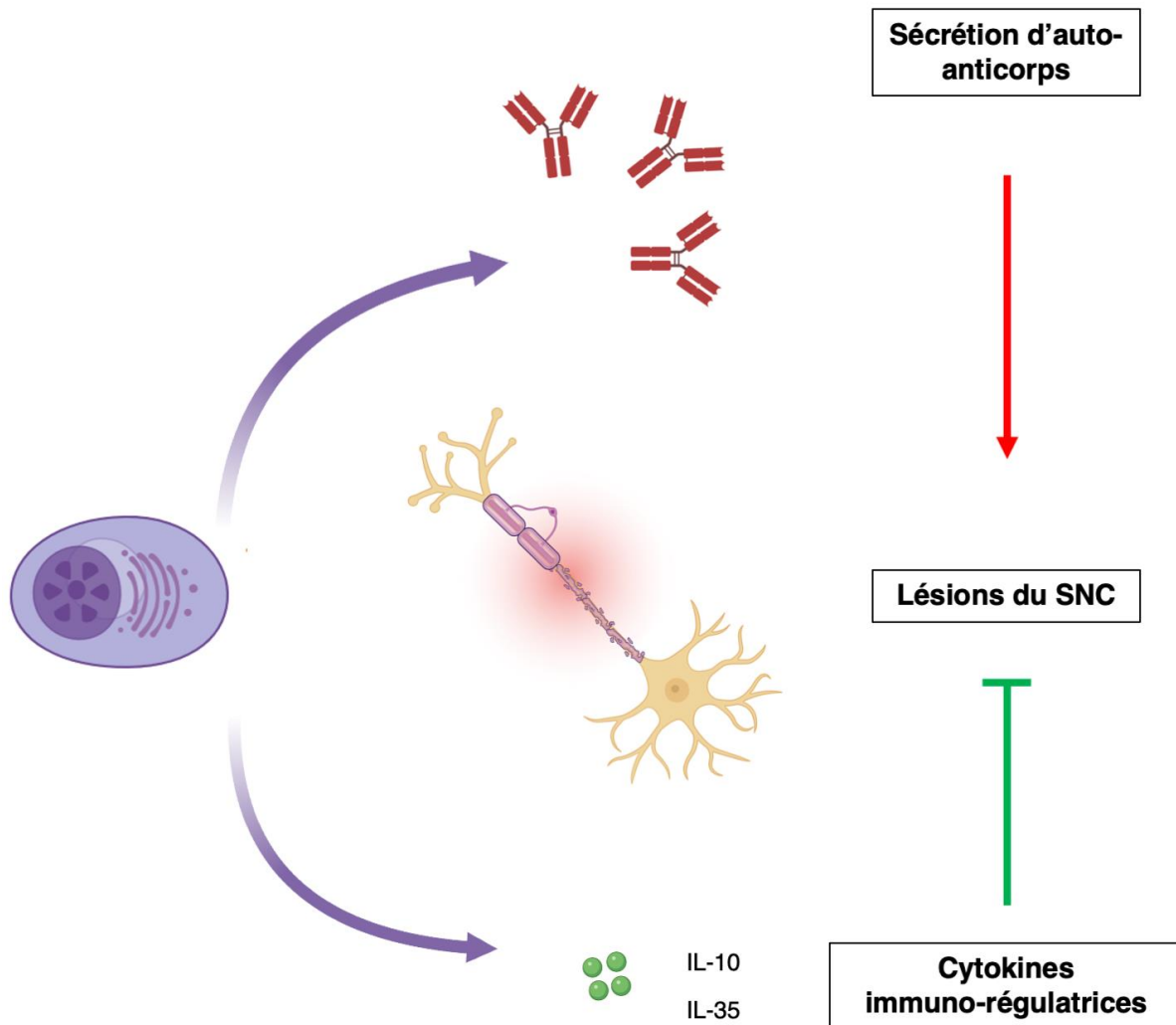


Figure 7 : Rôle des plasmocytes dans la physiopathologie de la SEP.

L'implication des plasmocytes dans la SEP a initialement été décrite par la sécrétion d'auto-anticorps dirigés contre des antigènes du SNC, ceux-ci étant alors supposés responsables des lésions ou de l'amplification de l'inflammation du SNC. A l'opposé, des plasmocytes aux fonctions régulatrices sécrétant d'IL-10 et/ou IL-35 ont été identifiés chez l'homme et dans des modèles animaux de neuro-inflammation, la fonction de ces cellules dans la régulation de l'inflammation du SNC semble ainsi importante.

Cette figure a été réalisée à l'aide de BioRender.

B. Rôles des lymphocytes T folliculaires auxiliaires dans la SEP

Ces dernières années, l'implication des Tfh dans la physiopathologie des maladies auto-immunes a été grandement étudiée. Mais à ce jour, peu d'études ont été conduites dans la SEP et aucun consensus n'en ressort quant au rôle de ces cellules dans la maladie.

Certaines études ont malgré tout identifié une fréquence augmentée des Tfh circulants chez les patients SEP, mais la définition phénotypique de ces cellules n'était pas la même entre ces études rendant difficile toute conclusion (Fan *et al.*, 2015 ; Guo *et al.*, 2018).

En ce qui concerne le statut d'activation des Tfh circulants, deux études ont constaté une augmentation de la fréquence des cellules Tfh ICOS⁺ chez les patients de forme RR et SP tandis qu'une a retrouvé une augmentation des cellules PD1⁺ chez les patients en cours de poussée (Romme Christensen *et al.*, 2013 ; Fan *et al.*, 2015 ; Guo *et al.*, 2018).

Concernant la polarisation des Tfh, il n'y a là encore aucun consensus dans la SEP. Romme Christensen *et al.* ont ainsi trouvé une fréquence plus faible de Tfh1 dans les formes récurrentes-rémittentes et progressives de la maladie, tandis que Cunill *et al.* ont trouvé une fréquence plus faible de Tfh2 associée à une fréquence plus élevée de Tfh1.17 chez les patients atteints de forme RR (Romme Christensen *et al.*, 2013 ; Cunill *et al.*, 2018).

Les Tfr ont quant à eux été retrouvés en fréquence réduite chez des patients SEP (Dhaeze *et al.*, 2015 ; Puthenparampil *et al.*, 2019). Une étude a également mis en évidence une capacité suppressive réduite des Tfr chez les patients SEP par rapport à des témoins sains (Dhaeze *et al.*, 2015). De plus, un rapport plus élevé de cellules Tfh/Tfr a été identifié et corrélé avec la synthèse intrathécale d'IgG (Puthenparampil *et al.*, 2018).

Les différentes données publiées dans la littérature à l'heure actuelle sur les Tfh et Tfr en périphérie ne permettent donc pas de conclure à de grandes disparités phénotypiques chez les patients SEP.

Toutefois, par une analyse transcriptomique sur cellule unique, Schafflick *et al.* ont récemment identifié que des cellules ayant une signature commune aux Tfh était surreprésentées dans le LCR de patients SEP par rapport au sang apparié. Une analyse phénotypique par cytométrie en flux a par la suite retrouvé une fréquence plus importante des Tfh et des Tfh activés de profil PD1⁺ et ICOS⁺ dans le LCR de patients SEP par rapport à des contrôles (Schafflick *et al.*, 2020). Enfin, une étude a montré que les Tfh, mais pas les Tfr, infiltraient les TLT des patients atteints de SEP de forme SP (Bell *et al.*, 2020).

Ces dernières données suggèrent donc une implication locale des Tfh dans la neuro-inflammation avec une fonction probablement importante dans la formation et le maintien des TLT observés chez les patients SEP où ils permettraient d'aider les LB à se différencier.

Comme nous venons de le voir, la SEP est une maladie auto-immune caractérisée par une démyélinisation du SNC. Longtemps considérée comme médiée par les LT CD4⁺ et CD8⁺, de nombreuses données ont pu attester d'un rôle prépondérant des LB dans la physiopathologie de la maladie. Cependant, le rôle précis des différentes populations de LB et en particulier des cellules différenciées en plasmablastes/plasmocytes reste à mieux déterminer. En effet, différents travaux chez l'homme mais aussi chez l'animal tendent à montrer une dualité de fonctions des plasmocytes dans la SEP et la neuro-inflammation. D'un côté, un rôle probablement pro-inflammatoire passant par la sécrétion d'auto-anticorps et de cytokines participant directement ou non à l'inflammation du SNC a longuement été décrits. De l'autre côté, des études plus récentes ont mis en évidence l'existence de plasmocytes régulateurs sécrétant d'IL-10 et/ou d'IL-35 mobilisés au cours de la neuro-inflammation afin de réguler celle-ci.

Le premier objectif de ma thèse a ainsi été de chercher à mieux comprendre cette hétérogénéité de fonctions des plasmablastes/plasmocytes dans la SEP. Pour cela nous avons utilisé un modèle de différenciation *in vitro* des LB circulants nous permettant d'accéder aux plasmablastes et étudier ces cellules. Au regard des récentes données publiées dans la littérature, nous avons décidé également de nous focaliser sur la réponse de type IgA des LB dans la SEP afin de déterminer comment elle est orientée chez les patients.

Face à l'importance qu'ont physiologiquement ces cellules dans la différenciation des LB en LB mémoires et plasmocytes et au peu de données recueillies quant à leur rôle dans la maladie, nous nous sommes intéressés à l'étude des Tfh dans la SEP. Ce deuxième projet de ma thèse a ainsi consisté en une caractérisation phénotypique de ces cellules en périphérie et au sein du LCR des patients, associée à une caractérisation de leurs capacités migratoires vers le SNC et une analyse transcriptomique de ces cellules en périphérie et dans le LCR des patients en début de maladie.

I. Article 1 : Baisse de la production d'IgA associée à un défaut de différenciation des LB dans la SEP

Il est désormais admis que les LB ont un rôle important dans la physiopathologie de la SEP, comme a pu en attester l'efficacité des différents traitements éliminant ces cellules. Comme dans d'autres maladies auto-immunes, l'implication des plasmocytes a longtemps été suspectée délétère par la sécrétion d'auto-anticorps dirigés contre des antigènes du SNC. Cependant, l'échec de l'atacept, un traitement bloquant la différenciation des LB en plasmocytes a suggéré un possible effet protecteur de ces cellules dans la maladie. Différentes études ont depuis confirmé que les cellules sécrétrices d'anticorps constituaient un véritable réservoir de LB régulateurs. Récemment, une population de plasmocytes sécréteurs d'IgA aux fonctions régulatrices a ainsi été découverte et décrite comme ayant un rôle majeur dans le contrôle de la neuro-inflammation et potentiellement dans la SEP.

Dans cette étude, nous nous sommes intéressés à étudier la réponse humorale de type IgA dans la SEP. Nous avons ainsi pu observer des concentrations plus faibles d'IgA dans le sérum de patients de forme RR ainsi que chez des patients SCI convertissant vers une SEP. De plus, les IgA ont été retrouvées en proportions amoindries dans le LCR des patients atteints de SEP par rapport à des contrôles. A l'aide d'un modèle *in vitro* de différenciation des LB, nous avons observé une prolifération et différenciation amoindries des LB des patients SEP conduisant à une sécrétion réduite d'IgA. Enfin, l'analyse par RNAseq des LB mémoires à IgA nous a permis de discriminer les patients SEP et les témoins sains, suggérant une signature spécifique de ces cellules dans la SEP. Cette analyse nous a également permis d'identifier une surexpression du gène *IL5RA* par les LB à IgA des patients SEP.

Ces données suggèrent que les LB à IgA représentent une population d'intérêt aux fonctions potentiellement altérées dans la SEP.

Les figures et tableaux sont présentés à la suite du texte.

IgA production decrease is associated with IgA⁺ B cell differentiation and proliferation defects in multiple sclerosis

Jérémy Morille¹, Camille Mathé¹, Léo Boussamet¹, Stéphane Rodriguez^{2,3}, Mélanie Chesneau¹, Marion Mandon^{2,3}, Alexandra Garcia¹, Patricia Amé^{2,3}, Karin Tarte³, Emilie Dugast¹, Sita Shah¹, Arnaud Nicot¹, Sophie Brouard¹, David-Axel Laplaud^{1,4}, Laure Michel^{2,3,5}, Laureline Berthelot¹

Abstract

Clinical trials on the efficacy of B-cell depleting therapies in relapsing-remitting multiple sclerosis (RRMS) have suggested that B cells may contribute to MS pathogenesis. However, the failure of the atacicept, a treatment that blocks the differentiation of B cells into plasma cells has pointed out a potential protective function of plasma cells in MS. Moreover, recent studies have demonstrated that IgA-secreting plasma cells could be a reservoir of regulatory B cells probably important to control neuroinflammation in MS.

In this study, we report a lower concentration of IgA in the serum of RRMS patients compared to controls. IgA were also found in a lower proportion among total immunoglobulins in the cerebrospinal fluid of MS patients compared to controls. Using an *in vitro* model of B cell differentiation, we observed a lower proliferation and differentiation of B cells from MS patients, leading to a lower secretion of IgA. Lastly, RNA sequencing analysis of IgA⁺ memory B cells allowed to discriminate MS patients and controls, suggesting a specific signature of these cells in MS.

In summary, our results suggest that IgA⁺ B cells are an important component of B cell response in MS.

Author affiliations:

¹Centre de Recherche en Transplantation et Immunologie, INSERM UMR1064, Université de Nantes, France

²Clinical Neuroscience Centre, CIC_P1414 INSERM, Rennes, University Hospital, Rennes University, Rennes, France

³Microenvironment, Cell Differentiation, Immunology and Cancer Unit, INSERM, Rennes I University, French Blood Agency, Rennes, France

⁴Neurology Department and CIC 0004, Nantes University Hospital, Nantes, France

⁵Neurology Department, Rennes University Hospital, Rennes, France

Correspondence to: Laureline Berthelot, laureline.berthelot@univ-nantes.fr

Keywords: Multiple sclerosis, IgA, B cell differentiation

Abbreviations: CIS = clinically isolated syndrome, CNS = central nervous system

CSF = cerebrospinal fluid, HC = healthy controls, MS = multiple sclerosis, NIND = non-inflammatory neurological disease, PBMCs = peripheral blood mononuclear cells RRMS = relapsing-remitting MS.

Introduction

Multiple sclerosis (MS) is a chronic inflammatory disease of the central nervous system (CNS) and is the leading cause of non-traumatic disability in young adults. MS has long been considered as a T-cell mediated disease, but multiple lines of evidence have recently highlighted the key contribution of B cells to MS pathogenesis. The administration of B lymphocyte depleting therapies, as anti-CD20 monoclonal antibodies, significantly decreased the clinical and radiological activity of the disease in MS patients affected by both relapsing-remitting (RR) and progressive MS¹⁻⁴. As in other autoimmune diseases, plasma cells have long been thought to participate in MS pathophysiology through the secretion of autoantibodies directed against CNS antigens^{5,6}.

However, the failure of atacicept, a recombinant fusion protein (TACI-Ig) that neutralizes the binding of BAFF and APRIL to their receptor and leads to a decreased maturation of B cells into plasma cells but not memory B cells has pointed out a potential protective function of plasma cells in MS⁷. In fact, several studies have shown in both humans and animal models that plasma cells and plasmablasts represent the major reservoir of regulatory B cells⁸⁻¹⁰. In MS, a study also demonstrated that plasma cells are the main source of IL-10 in the CNS of patients, reinforcing the idea of a protective role of these cells locally¹¹.

Interestingly, the binding of APRIL to TACI has been shown to be essential for IgA production by plasma cells¹² and a recent study also showed that the binding of APRIL to TACI induced the differentiation of B cells to IL-10 secreting IgA⁺ B cells¹³. Recently, studies have demonstrated in both animal models of neuroinflammation and in MS patients that IgA⁺ B cells could migrate from the gut to the CNS to locally regulate inflammation through the secretion of IL-10^{14,15}. These findings suggest that IgA-secreting plasma cells could be a reservoir of regulatory B cells with a major role to control neuroinflammation in MS.

In this study, we show that MS patients have a lower concentration of IgA in the serum and the cerebrospinal fluid (CSF) compared to controls. Moreover, we observed a lower proliferation and differentiation of B cells from MS patients, leading to a lower secretion of IgA. Lastly, RNA sequencing analysis of IgA⁺ B cells discriminated MS patients and controls, suggesting a specific signature of these cells in MS.

Materials and Methods

Patients and controls

Samples from MS patients, healthy controls (HC), non-inflammatory neurological disease (NIND) controls and clinically isolated syndrome (CIS) patients were obtained from Nantes MS expert center. MS patients were diagnosed according to the Mc Donald 2017 Criteria¹⁶. CIS is defined as the first inflammatory demyelination that can evolve to multiple sclerosis. CIS patients were followed and classified in converted or non-converted to MS.

Patients had no disease modifying drugs for a period of at least 3 months before the sampling. All donors provided informed consent in compliance with the Declaration of Helsinki and our local university hospital ethical committee (Biomedicine Agency identification number PFS13-003). Demographical and clinical characteristics of patients and controls are detailed in Table 1.

Mononuclear cell isolation and flow cytometry analysis

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were obtained after Ficoll density centrifugation (Sigma–Aldrich).

For the B cell differentiation study, B cells were stained at day 4 and day 6 with following anti-human antibodies: CD20-VioBlue, IgD-FITC (Miltenyi Biotec), CD27-Alexa Fluor 700, CD138-PE, CD38-APC-H7 (BD Biosciences). Apoptosis was analyzed at day 4 and day 6 using AnnexinV-APC staining (BD Biosciences). Proliferation was assessed at day 4 and day 6 using an APC-conjugated anti-BrdU kit (BD Biosciences), following the manufacturers's instructions. Cells were then analyzed by flow cytometry (LSRII, BD Biosciences). Dead cells were excluded from the analysis using Live/Dead Amcyan staining (Invitrogen).

For the phenotype of peripheral B cells, PBMCs were stained with following anti-human antibodies: CD3-BUV737, CD14-BUV737, CD16-BUV737, CD19-BUV395, IgD-BV510, IgG-BV605, CD24-BV711, CD27-BB515, CD69-PE-CF594, CD86-BV421 (BD Biosciences), IgA-PE-Vio770 (Miltenyi Biotec), IgM-APC, CD38-PercpCy5.5, CD138-PE (Beckman Coulter). Cells were then analyzed by flow cytometry (Fortessa X20, BD Biosciences). Dead cells were excluded from the analysis using Fixable Viability Stain 780 (BD Biosciences).

B cell differentiation protocol

B cells were purified from PBMCs using negative selection on magnetic columns according to the manufacturer's instructions (B cell isolation Kit II; Miltenyi Biotec).

All cultures were performed in complete medium consisting of RPMI 1640 (Invitrogen) supplemented with 10% fetal calf serum, 1% of glutamine, and 1% of penicillin-streptomycin (Invitrogen). For the activation phase, purified human B cells were cultured at 3.75×10^5 cells/mL and activated with $2 \mu\text{g/mL}$ F(ab')₂ fragment goat anti-human IgA + IgG + IgM (H + L) (Jackson ImmunoResearch Laboratories), 50 ng/mL recombinant human soluble CD40L associated with $5 \mu\text{g/mL}$ cross-linking Ab (R&D systems), $2.5 \mu\text{g/mL}$ CpG oligodeoxynucleotide 2006 (Invivogen), and 50 U/mL recombinant IL-2 (Novartis).

Day-4- activated B cells were washed and cultured at the same concentration for 2 days with 50 U/mL IL-2, 10 ng/mL IL-10 and 10 ng/mL IL-4 (R&D Systems).

Immunoglobulin measurements

ELISA assays were performed to measure the concentration of IgA, IgA1, IgA2, IgG and IgM. For these ELISA, Nunc plates (ThermoFischer) were coated with anti-IgA, IgA1, IgA2, IgG or IgM at $2 \mu\text{g/mL}$ (Southern Biotech). Bovine serum albumin (Sigma Aldrich) at 1% in PBS was used for blocking. Samples were incubated for 2 hours at 37°C in PBS and 1% bovine serum albumin. Anti-human IgG, IgA or IgM antibodies coupled with horseradish peroxidase (Bethyl Laboratories) were used at $0.1 \mu\text{g/mL}$ for 1 hour at 37°C . The reaction with the substrate (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine, BD Biosciences) was stopped with sulfuric acid (0.2 M , Sigma Aldrich). Plates were read at 450 nm using a Spark 10M multimode microplate reader (Tecan).

Cell sorting and RNA purification

For RNA sequencing analysis, IgA⁺, IgG⁺ and IgM⁺ memory B cells were sorted from frozen PBMCs. Before the sorting, a purification of B cells was performed as described above (B cell isolation kit II, Miltenyi Biotec). B cells were then stained with following anti-human antibodies: IgA-PE-Vio770, IgG-APC (Miltenyi Biotec), IgM-PE, CD19-FITC, CD27-BV450 (BD Biosciences). Memory B cells were defined as CD19⁺CD27⁺ B cells, and a sorting of IgA⁺, IgG⁺ or IgM⁺ memory B cells was performed using a cell sorter (FACS Aria II, BD Biosciences). Dead cells were excluded using Live/Dead AmCyan staining (Invitrogen). Cells sorted were then stored at -80°C in RLT buffer (Qiagen). Total RNA was purified using Rneasy Micro Kit (Qiagen). The RNA integrity and quantity were assessed using Agilent 2100 Bioanalyzer

(Agilent Technologies). Total RNA was then stored at -80°C until their use for preparation of sequencing library.

RNAseq analysis

cDNA libraries were obtained using SMARTer Stranded Total RNA-Seq Kit v2 – Pico Input Mammalian (Takara Bio), according to manufacturer's instructions. RNAseq libraries were then sequenced with NovaSeq Instrument (Illumina). Libraries preparation and sequencing were performed by Next Generation Sequencing Platform (Institut Curie, Paris, France).

Quality of sequencing data was monitored by FastQC. Reads were mapped to the human genome (GRCh37). Differential gene expression was performed using R software (v 3.6.3). Differential expression on filtered genes (HTSfilter) were performed using DESeq2 package. Genes were declared differentially expressed with a false discovery rate $< 5\%$ and fold change ≥ 1.5 in IgA^+ , IgG^+ or IgM^+ memory B cells from MS patients compared to HC. Hierarchical clustering was generated using Ward method.

Statistical analyses

Statistical analyses were performed using Graphpad Prism Software, version 8.4. A two-tailed Mann-Whitney test was performed to compare two independent groups and a Kruskal-Wallis test with Dunn's multiple comparisons test was performed to compare more than two independent groups. P -values < 0.05 were considered significant.

Results

MS patients present a lower concentration of IgA in their serum which is associated to MS conversion

We first analyzed the concentration of IgA, IgG, and IgM in the serum of 16 HC and 33 RRMS patients. We found a lower concentration of IgA in the serum of RRMS patients compared to HC (median: 1.5g/L in RRMS patients vs 4.03g/L in HC, $P < 0.0001$; Fig. 1A).

No difference was observed in the concentration of IgG in MS patients compared to HC (Fig 1B), whereas a lower concentration of IgM was found (median: 1.27g/L in RRMS patients vs 1.98 g/L in HC, $P = 0.036$; Fig. 1C). The decrease of IgA concentration was due to IgA1 concentration diminution whereas IgA2 concentration was increased (median: 0.52g/L in RRMS patients vs 1.21g/L in HC, $P = 0.002$ for IgA1 concentration; 0.34g/L in RRMS patients vs 0.22g/L in HC, $P = 0.002$ for IgA2 concentration; Fig. 1D-E). Furthermore, in a cohort of CIS patients, we found a lower concentration of IgA in the serum of CIS patients who converted to MS compared to those who did not (median: 1.37g/L in converted CIS vs 2.61g/L in non-converted CIS, $P = 0.005$; Fig. 1F).

Lower proportion of IgA in the CSF of MS patients

We then analyzed the concentration of IgA, IgG, and IgM in the CSF of 22 NIND controls and 30 RRMS patients. We observed a non-significant higher concentration of IgA in the CSF of MS patients compared to NIND controls (median: 2.74mg/L in RRMS patients vs 2.4mg/L in NIND, $P = 0.07$; Fig. 2A). As previously described, we found a higher concentration of IgG and IgM in the CSF of MS (median: 1.2mg/L in RRMS patients vs 0.48mg/L in NIND, $P < 0.0001$ for IgM concentration; 53.05mg/L in RRMS patients vs 20mg/L in NIND, $P < 0.0001$ for IgG concentration; Fig. 2B-C). We then compared the proportion of IgA, IgG, and IgM on total Igs and found a decreased proportion of IgA in RRMS patients compared to NIND controls whereas IgG and IgM proportions were increased (median: 5.04% in RRMS patients vs 9.4% in NIND, $P < 0.0001$ for IgA proportion; 92.4% in RRMS patients vs 88.8% in NIND, $P = 0.0006$ for IgG proportion; 2.18% in RRMS patients vs 1.5% in NIND, $P = 0.018$ for IgM proportion; Fig. 2D-F). So, despite a moderate IgA increase in RRMS patients' CSF, IgA proportion is decreased among total Igs inside the CSF.

Altered B cell differentiation leads to a decreased secretion of IgA in MS patients

To better understand the humoral response and the B cell compartment in MS patients, we used an *in vitro* model of B cell differentiation already published^{17,18}. Peripheral B cells were isolated and cultured with anti-BCR, sCD40L, CpG, and IL-2 for 4 days, then activated B cells were washed and cultured again for 2 more days with IL-2, IL-4, and IL-10 to induce differentiation of B cells into plasmablasts (Fig. 3A). We first observed a lower frequency of proliferating B cells in MS patients compared to HC (median: 25.4% in MS patients vs 40% in HC at day 4, $P = 0.002$; Fig. 3B). Moreover, at day 6, we found a lower frequency of plasmablasts CD27⁺CD38^{hi} B cells in MS patients (median: 37.45% in MS patients vs 55.9% in HC at day 6, $P = 0.008$; Fig. 3C).

Lastly, we observed lower concentrations of IgA and IgM, but not IgG, in B cell supernatants at day 6 in MS patients (median: 17.08mg/L in MS patients vs 32.36mg/L in HC for IgM concentration at day 6, $P = 0.036$; 1.77mg/L in MS patients vs 4.12mg/L in HC for IgA concentration at day 6, $P = 0.015$; Fig. 3D-F).

RNAseq analysis of IgA⁺ B cells discriminates MS patients and HC

We assessed then the phenotype of B cells in the blood of 17 HC, 9 RRMS patients in relapse and 9 RRMS patients in remission. We found a decreased frequency of IgA⁺ memory B cells in RRMS patients in relapse compared to HC (median: 9.37% in RRMS patients in relapse vs 16% in HC, $P = 0.025$; Fig. 4A).

To further characterize IgA⁺ memory B cells in MS, we performed an RNA sequencing of blood sorted IgA⁺, IgG⁺ or IgM⁺ memory B cells from 5 RRMS patients in relapse and 7 HC. Using a hierarchical clustering analysis, we were able to discriminate in two distinct groups RRMS patients and HC for IgA⁺ memory B cells, but not for IgG⁺ and IgM⁺ memory B cells, suggesting a specific signature of IgA⁺ B cells in MS patients (Fig. 4B-D). Moreover, we found 9 differentially expressed genes in IgA⁺ B cells between RRMS patients and HC (Fig. 4E). Among these genes, several were associated to the cell cycle (*WEE1*, *TP53INP1*). One immune gene, *IL5RA*, the alpha-chain of the IL-5 receptor, was upregulated in IgA⁺ B cells from MS patients highlighting a potential marker of interest of IgA⁺ B cells function in MS pathophysiology.

Discussion

While B cells involvement in MS pathophysiology is well documented, the precise role of plasma cells remains still poorly understood. These cells have long been considered as a pathogenic component of immune cells involved in the disease by the production of autoantibodies directed against CNS antigens^{5,6}. The failure of the atacicept in management of RRMS⁷ and studies that have described antibody-secreting cells as the major reservoir of regulatory B cells⁸⁻¹⁰ let think that plasma cells could have a protective role in MS. Furthermore, IgA-secreting plasma cells have been described in both animal models and MS patients as regulatory B cells that are mobilized from the gut to the CNS to regulate neuroinflammation through the secretion of IL-10, suggesting their importance in MS pathophysiology^{14,15}.

Here, we show that RRMS patients present a lower concentration of IgA in their serum compared to HC. A lower concentration of IgA was also found in the serum of converted-CIS patients compared to non-converted patients. Although non-significant, a previous study has already observed a decreased concentration of IgA in both RRMS and CIS patients¹⁹.

As expected, we found a higher concentration of IgG and IgM as well as a trend for a higher concentration of IgA in the CSF of MS patients, while the proportion of IgA among Igs was reduced. An inflammation of the blood-brain barrier is present in MS, therefore, Igs can passively diffuse to the CSF of patients, which may then explain the higher concentrations in MS patients. Moreover, an intrathecal production of Igs has been described in MS patients. Especially, most patients present a local synthesis of IgG, whereas a less frequent synthesis of IgM and IgA has also been observed²⁰⁻²⁴. Interestingly, some studies have found an association between an intrathecal synthesis of IgA and a good prognostic of the disease²⁴⁻²⁶. More precisely, this local production of IgA has been correlated to lesser progression of the disease and radiological inflammation, suggesting a protective effect of IgA-secreting cells infiltration in the CNS of MS patients^{24,26}.

Using a model of B cell differentiation, we found decreased proliferation and differentiation of B cells into plasmablasts as well as a decreased secretion of IgA in MS patients. Furthermore, we observed a lower frequency of IgA⁺ memory B cells in the blood of RRMS patients in relapse compared to HC. These results may suggest that a defect in B cells differentiation could be responsible of a decreased frequency and function of IgA-secreting cells in MS patients.

Performing an RNA sequencing of IgA⁺ memory B cells, we found a differential expression of genes associated to cell cycle in MS patients, suggesting a lower proliferative capacity of IgA⁺ B cells in MS patients. Furthermore, transcriptome of IgA⁺ B cells allowed us to discriminate

in two distinct groups MS patients and HC, suggesting a specific signature of these cells in MS patients.

Among differential expressed genes, we observed an upregulation of *IL5RA* by IgA⁺ B cells from MS patients compared to HC. This gene encodes the alpha chain of the IL-5 receptor. IL-5 is a cytokine that has been described to induce the proliferation of IgA⁺ B cells and their secretion of IgA²⁷⁻³⁰. A study has also found that IL-5 induced the secretion of IL-10 by B cells, giving them regulatory functions³¹. Thus, IL-5 signaling seems to be essential for the differentiation of regulatory IgA⁺ plasma cells. However, as the cohort of this study is relatively small, further studies will be needed to determine the importance of *IL5RA* overexpression in IgA⁺ B cells from MS patients.

Taken together, our findings suggest that IgA⁺ B cells, that have been described as a potential reservoir of regulatory B cells, are less functional in MS. With a specific transcriptome not observed in other Ig-secreting B cells, IgA⁺ B cells appear as an important component of B cell response in MS, which could be a target of future therapeutic strategies.

Acknowledgements

We thank the Next Generation Sequencing Platform (Institut Curie Genomics, Paris, France) for performing the RNA sequencing analysis of memory B cells.

Competing interests

The authors report no competing interests.

References

1. Hauser SL, Waubant E, Arnold DL, et al. B-cell depletion with rituximab in relapsing-remitting multiple sclerosis. *N Engl J Med*. 2008;358(7):676-688.
2. Hauser SL, Bar-Or A, Comi G, et al. Ocrelizumab versus Interferon Beta-1a in Relapsing Multiple Sclerosis. *N Engl J Med*. 2017;376(3):221-234.
3. Montalban X, Hauser SL, Kappos L, et al. Ocrelizumab versus Placebo in Primary Progressive Multiple Sclerosis. *N Engl J Med*. 2017;376(3):209-220.
4. Hauser SL, Bar-Or A, Cohen JA, et al. Ofatumumab versus Teriflunomide in Multiple Sclerosis. *N Engl J Med*. 2020;383(6):546-557.
5. Wanleenuwat P, Iwanowski P. Role of B cells and antibodies in multiple sclerosis. *Mult Scler Relat Disord*. 2019;36:101416.
6. Yu X, Graner M, Kennedy PGE, Liu Y. The Role of Antibodies in the Pathogenesis of Multiple Sclerosis. *Front Neurol*. 2020;11:533388.
7. Kappos L, Hartung H-P, Freedman MS, et al. Atacept in multiple sclerosis (ATAMS): a randomised, placebo-controlled, double-blind, phase 2 trial. *Lancet Neurol*. 2014;13(4):353-363.
8. Matsumoto M, Baba A, Yokota T, et al. Interleukin-10-producing plasmablasts exert regulatory function in autoimmune inflammation. *Immunity*. 2014;41(6):1040-1051.
9. Shen P, Roch T, Lampropoulou V, et al. IL-35-producing B cells are critical regulators of immunity during autoimmune and infectious diseases. *Nature*. 2014;507(7492):366-370.
10. Lino AC, Dang VD, Lampropoulou V, et al. LAG-3 Inhibitory Receptor Expression Identifies Immunosuppressive Natural Regulatory Plasma Cells. *Immunity*. 2018;49(1):120-133.e9.
11. Machado-Santos J, Saji E, Tröscher AR, et al. The compartmentalized inflammatory response in the multiple sclerosis brain is composed of tissue-resident CD8+ T lymphocytes and B cells. *Brain*. 2018;141(7):2066-2082.

12. Sakurai D, Hase H, Kanno Y, Kojima H, Okumura K, Kobata T. TACI regulates IgA production by APRIL in collaboration with HSPG. *Blood*. 2007;109(7):2961-2967.
13. Fehres CM, van Uden NO, Yeremenko NG, et al. APRIL Induces a Novel Subset of IgA+ Regulatory B Cells That Suppress Inflammation via Expression of IL-10 and PD-L1. *Front Immunol*. 2019;10:1368.
14. Rojas OL, Pröbstel A-K, Porfilio EA, et al. Recirculating Intestinal IgA-Producing Cells Regulate Neuroinflammation via IL-10. *Cell*. 2019;177(2):492-493.
15. Pröbstel A-K, Zhou X, Baumann R, et al. Gut microbiota-specific IgA+ B cells traffic to the CNS in active multiple sclerosis. *Sci Immunol*. 2020;5(53).
16. Thompson AJ, Banwell BL, Barkhof F, et al. Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. *Lancet Neurol*. 2018;17(2):162-173.
17. Le Gallou S, Caron G, Delalay C, Rossille D, Tarte K, Fest T. IL-2 requirement for human plasma cell generation: coupling differentiation and proliferation by enhancing MAPK-ERK signaling. *J Immunol*. 2012;189(1):161-173.
18. Chesneau M, Pallier A, Braza F, et al. Unique B cell differentiation profile in tolerant kidney transplant patients. *Am J Transplant*. 2014;14(1):144-155.
19. Trend S, Jones AP, Cha L, et al. Higher Serum Immunoglobulin G3 Levels May Predict the Development of Multiple Sclerosis in Individuals With Clinically Isolated Syndrome. *Front Immunol*. 2018;9:1590.
20. Lolli F, Halawa I, Link H. Intrathecal synthesis of IgG, IgA, IgM and IgD in untreated multiple sclerosis and controls. *Acta Neurol Scand*. 1989;80(3):238-247.
21. Reiber H, Ungefehr S, Jacobi C. The intrathecal, polyspecific and oligoclonal immune response in multiple sclerosis. *Mult Scler*. 1998;4(3):111-117.
22. Leary SM, McLean BN, Thompson EJ. Local synthesis of IgA in the cerebrospinal fluid of patients with neurological diseases. *J Neurol*. 2000;247(8):609-615.

23. Gasperi C, Salmen A, Antony G, et al. Association of Intrathecal Immunoglobulin G Synthesis With Disability Worsening in Multiple Sclerosis. *JAMA Neurol.* 2019;76(7):841-849.
24. Klein A, Selter RC, Hapfelmeier A, et al. CSF parameters associated with early MRI activity in patients with MS. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm.* 2019;6(4):e573.
25. Sellebjerg F, Christiansen M, Nielsen PM, Frederiksen JL. Cerebrospinal fluid measures of disease activity in patients with multiple sclerosis. *Mult Scler.* 1998;4(6):475-479.
26. Abdelhak A, Hottenrott T, Mayer C, et al. CSF profile in primary progressive multiple sclerosis: Re-exploring the basics. *PLoS One.* 2017;12(8):e0182647.
27. Harriman GR, Kunimoto DY, Elliott JF, Paetkau V, Strober W. The role of IL-5 in IgA B cell differentiation. *J Immunol.* 1988;140(9):3033-3039.
28. Schoenbeck S, McKenzie DT, Kagnoff MF. Interleukin 5 is a differentiation factor for IgA B cells. *Eur J Immunol.* 1989;19(6):965-969.
29. Sonoda E, Hitoshi Y, Yamaguchi N, et al. Differential regulation of IgA production by TGF-beta and IL-5: TGF-beta induces surface IgA-positive cells bearing IL-5 receptor, whereas IL-5 promotes their survival and maturation into IgA-secreting cells. *Cell Immunol.* 1992;140(1):158-172.
30. Hashiguchi M, Kashiwakura Y, Kanno Y, Kojima H, Kobata T. IL-21 and IL-5 coordinately induce surface IgA+ cells. *Immunol Lett.* 2020;224:21-27.
31. Klinker MW, Reed TJ, Fox DA, Lundy SK. Interleukin-5 supports the expansion of fas ligand-expressing killer B cells that induce antigen-specific apoptosis of CD4(+) T cells and secrete interleukin-10. *PLoS One.* 2013;8(8):e70131.

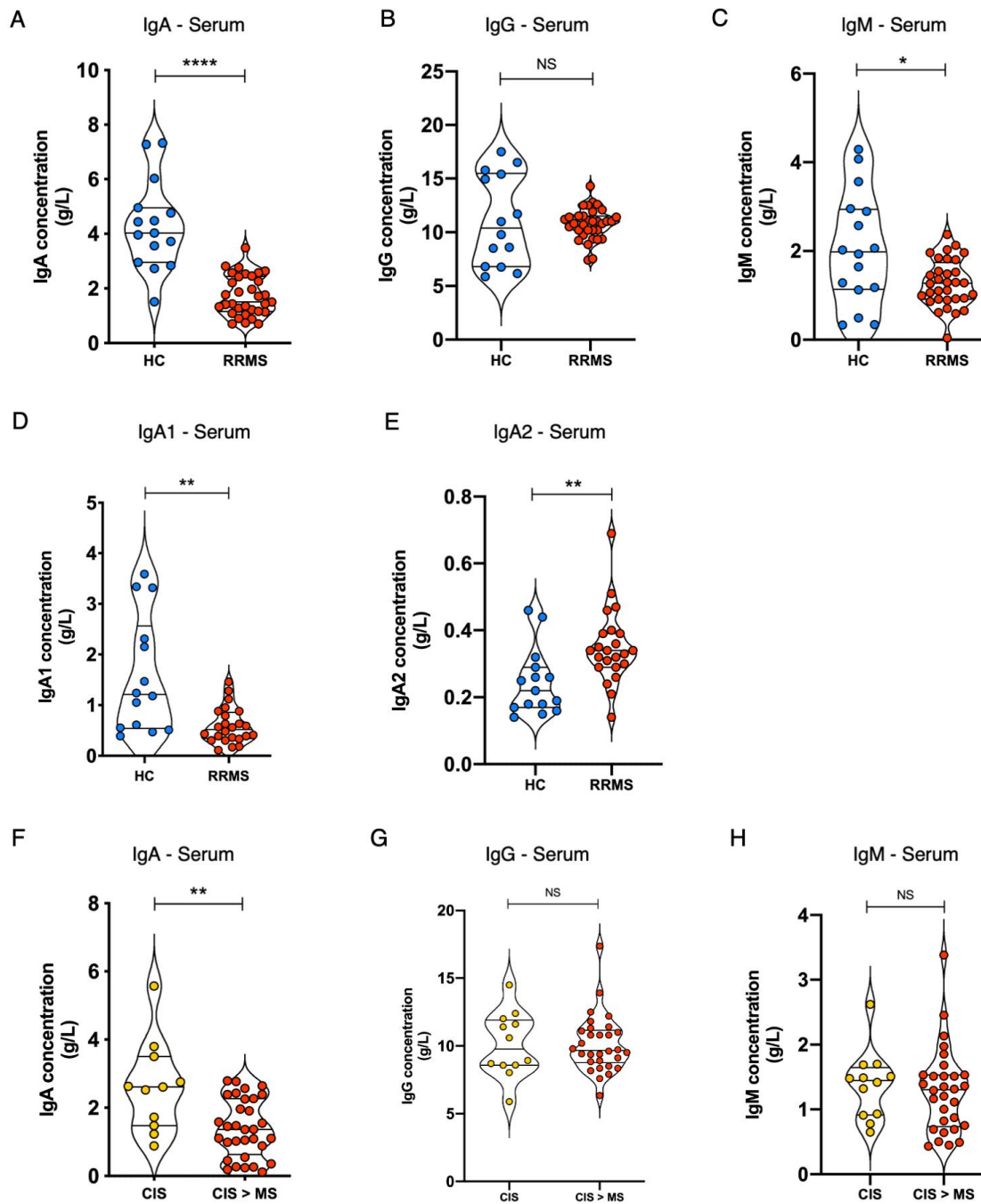


Figure 1 Decreased concentrations of IgA in the serum of RRMS patients.

(A-E) Concentrations of IgA (A), IgG (B), IgM (C), IgA1 (D) and IgA2 (E) in the serum of untreated RRMS patients ($n = 33$) and HC ($n = 16$). (F-H) Concentrations of IgA (F), IgG (G) and IgM (H) in the serum of CIS patients who converted to MS ($n = 32$) and CIS who did not convert to MS ($n = 12$).

All P -values were calculated using the non-parametric Mann-Whitney test. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; **** $P < 0.0001$.

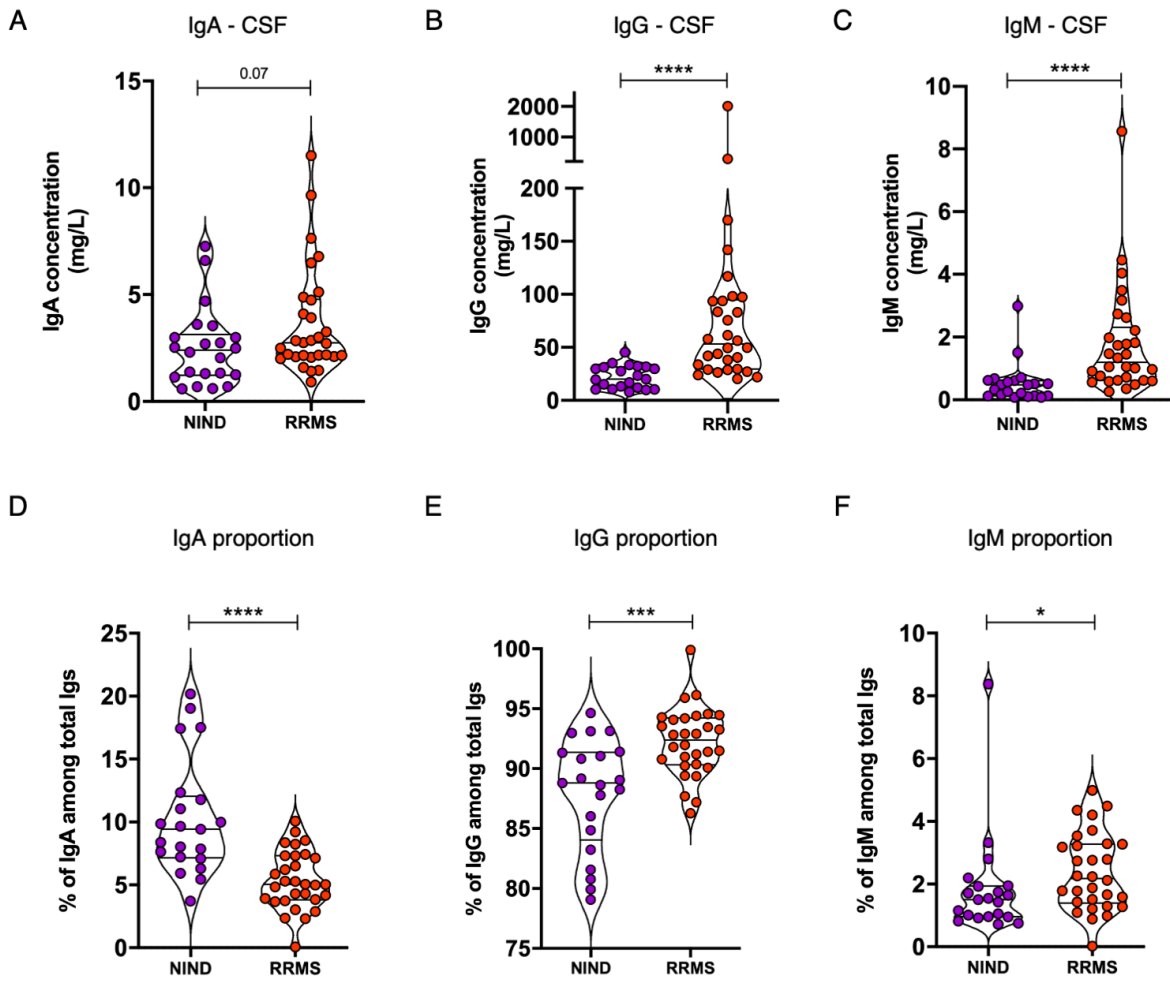


Figure 2 Lower proportion of IgA in the CSF of MS patients.

(A-C) Concentrations of IgA (A), IgG (B), IgM (C) in the CSF of untreated RRMS patients ($n = 30$) and NIND controls ($n = 22$). (D-F) Proportion of IgA (D), IgG (E) and IgM (F) among total Igs in the CSF of RRMS patients and NIND controls.

All P -values were calculated using the non-parametric Mann-Whitney test. * $P < 0.05$; *** $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$.

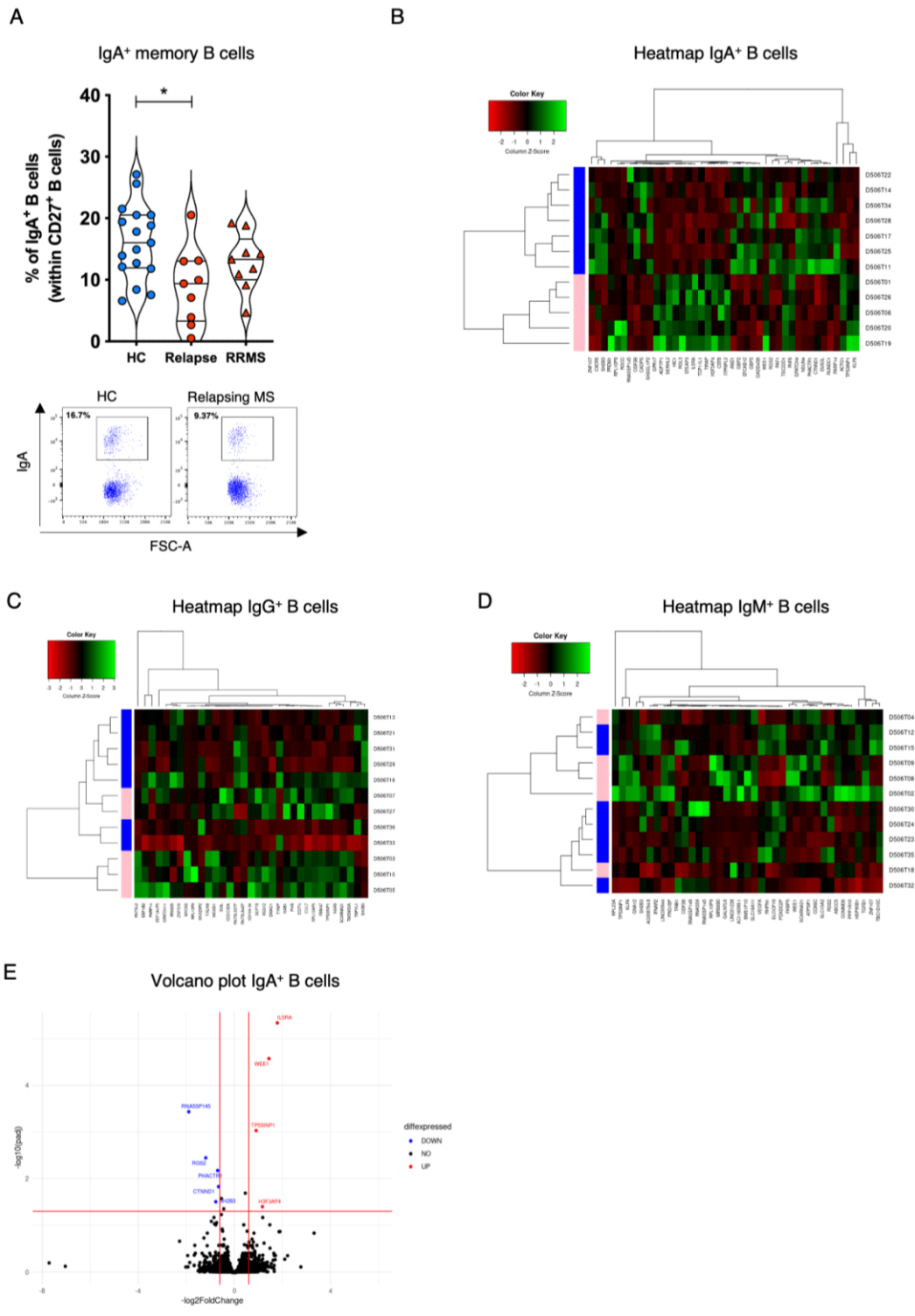


Figure 4 RNAseq analysis of IgA⁺ B cells discriminates MS patients and HC.

(A) Frequency of IgA⁺ memory B cells from RRMS patients in relapse ($n = 9$), RRMS patients in remission ($n = 9$) and HC ($n = 17$). (B-D) Clustering analysis of differential expressed genes in IgA⁺ (B), IgG⁺ (C) and IgM⁺ (D) memory B cells in RRMS patients in relapse ($n = 5$) and HC ($n = 7$). (E) Volcano-plot visualization of differentially expressed genes in IgA⁺ memory B cells between RRMS patients in relapse and HC.

For flow-cytometric analysis, P -values were calculated using the non-parametric Mann-Whitney test. * $P < 0.05$

Table 1 Clinical and demographic characteristics of patients and controls.

Cohort	Subjects, <i>n</i>	Gender, female, <i>n</i> (%)	Age in years, median (range) ^a	Disease duration in months, median (range) ^b	EDSS, median (range)
Immunoglobulin measurement in the serum					
HC	16	11 (69)	39 (23-52)	-	-
RRMS ^c	33	18 (55)	35 (22-63)	24 (23-50)	1.5 (0-6)
CIS	12	7 (58)	42 (27-54)	36 (24-84)	0.5 (0-4)
CIS > MS	32	23 (72)	33 (28-47)	28 (24-82)	1 (0-2)
Immunoglobulin measurement in the CSF					
RRMS	30	16 (53)	35 (22-63)	24 (23-50)	1.5 (0-6)
NIND	22	12 (55)	53 (37-75)	-	-
B cell differentiation – phenotype analysis					
HC	13	10 (77)	40 (26-44)	-	-
RRMS	16	10 (63)	40.5 (27-67)	72 (1-240)	2 (0-7.5)
B cell differentiation – Immunoglobulin measurement					
HC	26	22 (85)	40 (21-51)	-	-
RRMS	24	17 (71)	37 (25-67)	54 (0-240)	2 (0-7.5)
Peripheral B cell phenotype					
HC	17	11 (65)	36 (21-51)	-	-
RRMS in relapse	9	7 (78)	32 (18-54)	30 (0-120)	2.5 (1-7)
RRMS in remission	9	8 (89)	30 (22-44)	60 (1-348)	0 (0-2)
Memory B cells RNA sequencing analysis					
HC	7	4 (57)	33 (22-50)	-	-
RRMS in relapse	5	5 (100)	32 (29-49)	6 (0-84)	2 (0-6)

^a At the time of sampling.

^b Time from diagnosis to sampling.

^c RRMS according to the McDonald (2017) criteria

CIS = clinically isolated syndrome; EDSS = expanded disease severity score; HC = healthy controls; NIND = non-inflammatory neurological disease; RRMS = relapsing-remitting multiple sclerosis.

II. Article 2 : Les Tfh1 activés infiltrent le LCR de patients SEP en début de maladie

L'implication des LB dans la physiopathologie de la SEP est opposée entre d'un côté des cellules aux fonctions délétères et de l'autre des cellules protectrices. Cette dichotomie fonctionnelle des LB semble suivre leur état de différenciation puisque les LB mémoires sont aujourd'hui considérés comme le principal réservoir de LB pro-inflammatoires tandis que les cellules sécrétrices d'anticorps représenteraient quant à eux la principale source de LB régulateurs. La différenciation des LB en LB mémoire ou plasmocyte semble donc cruciale dans l'implication qu'ont ces cellules dans la SEP. Par l'aide qu'ils apportent aux LB, les Tfh représentent une population de LT CD4⁺ aux fonctions primordiales dans la différenciation lymphocytaire B. Ces dernières années, de nombreuses études se sont intéressées à l'implication des Tfh dans différentes maladies auto-immunes, mais assez peu de données ont été rapportées dans la SEP. La présence de TLT dans les méninges de patients SEP de forme progressive suggère cependant une implication des Tfh dans la physiopathologie de la maladie. Dans cette étude, nous nous sommes intéressés à caractériser le phénotype des Tfh en périphérie et dans le LCR de patients SEP. Nous n'avons pas retrouvé d'altération phénotypique des Tfh en périphérie chez les patients SEP de forme RR. Mais de manière intéressante, nous avons découvert que les Tfh infiltraient le LCR des patients avec un profil de Tfh1 activés. L'analyse de la capacité de migration de ces cellules à travers un modèle de BHE suggère que les Tfh1 ont des capacités de migration vers le SNC accrues. Enfin, une analyse par RNAseq des Tfh infiltrant le LCR des patients a révélé que ces cellules avaient une signature de Tfh1 pro-inflammatoires spécifique au LCR par rapport au sang apparié.

La découverte de Tfh1 activés au sein du LCR de patients SEP dès les phases précoces de la maladie suggère que ces cellules pourraient contribuer localement à la réactivation de LB mémoires auto-réactifs et à la formation de TLT. Ainsi, les Tfh1 pourraient représenter une population d'intérêt pour l'entrée dans la phase progressive de la maladie.

Les figures et tableaux sont présentés à la suite du texte.

Activated T follicular helper 1 cells infiltrate the cerebrospinal fluid in early multiple sclerosis

Jérémy Morille¹, Marion Mandon^{3,4}, Stéphane Rodriguez^{3,4}, Alexandra Garcia¹, Sandrine Wiertelowski², Laureline Berthelot¹, Karin Tarte⁴, Céline Delaloy⁴, Patricia Amé⁴, David-Axel Laplaud^{1,2*}, Laure Michel^{3,4,5*}.

Abstract

Tertiary lymphoid structures and aggregates are reported in the meninges of patients with multiple sclerosis, especially at the progressive stage and are strongly associated to cortical lesions and disability. Besides B cells, these structures comprise follicular helper T cells (Tfh) that are crucial to support B cell differentiation. Tfh play a pivotal role in amplifying autoreactive B cells and promoting autoantibody production in several autoimmune diseases but very few is known in multiple sclerosis.

In this study, we report an important infiltration of activated Tfh1 PD1⁺ cells inside the CSF of untreated relapsing-remitting multiple sclerosis patients at early stage of the disease that present a specific pro inflammatory signature on transcriptomic analyses compared to paired blood. Tfh trans-endothelial migration was also assessed, using an *in vitro* model of blood-brain barrier and allowed us to detect increased migration abilities of Tfh1 cells.

The presence of activated Tfh1 cells inside the CSF of early multiple sclerosis patients suggests that they could contribute to the reactivation of autoreactive memory B cells directly inside the CNS and participate to the formation of tertiary lymphoid structures.

Author affiliations:

¹Centre de Recherche en Transplantation et Immunologie, INSERM UMR1064, Université de Nantes, France

²Neurology Department and CIC 0004, Nantes University Hospital, Nantes, France

³Clinical Neuroscience Centre, CIC_P1414 INSERM, Rennes, University Hospital, Rennes University, Rennes, France

⁴Microenvironment, Cell Differentiation, Immunology and Cancer Unit, INSERM, Rennes I University, French Blood Agency, Rennes, France

⁵Neurology Department, Rennes University Hospital, Rennes, France

* Both are last authors

Correspondence to:

Laure Michel, service de neurologie, 2 rue Henri Le guillou, 35033 Rennes Cedex

laure.michel@chu-rennes.fr

Running title: Tfh cells in multiple sclerosis

Keywords: Multiple sclerosis, Follicular helper T cells, Cerebrospinal fluid, Tfh1, Migration.

Abbreviations: CIS = clinically isolated syndrome, HC = healthy controls, NIND = non-inflammatory neurological disease, PBMCs = peripheral blood mononuclear cells, RRMS = relapsing-remitting multiple sclerosis, Tfh = follicular helper T cells, TLS = tertiary lymphoid structures

Introduction

Multiple sclerosis is an autoimmune chronic disease of the CNS. Because of the decisive role of T cells in mouse models of experimental autoimmune encephalomyelitis, and their predominance in CNS infiltrates, these immune cells have long been considered as the key drivers in multiple sclerosis pathophysiology. This paradigm has been challenged by the clinical trials demonstrating the remarkable efficacy of B cell depleting therapies in relapsing-remitting multiple sclerosis (RRMS)^{1,2} with also a more controversial effect on disease progression³. Besides the intrathecal immunoglobulin synthesis, several studies reported the presence of meningeal B cell follicles, mainly in secondary progressive multiple sclerosis patients, that are strongly associated to cortical lesions and disability⁴⁻⁸, suggesting that these tertiary lymphoid structures (TLS) have a predominant role in the progressive phase of the disease. The discovery of meningeal aggregates as soon as the RR stage leads to believe that TLS start to build up early in the disease⁹.

Tfh cells play a pivotal role in amplifying autoreactive B cells and promoting autoantibody production in several autoimmune diseases¹⁰. In humans, circulating Tfh cells (defined as CXCR5⁺ memory CD4⁺ T cells) represent the circulating counterpart of germinal center Tfh cells¹¹. They are composed of distinct subsets characterized by differential expression patterns of the two chemokine receptors, CXCR3 and CCR6 and different B-helper abilities¹¹. There are currently only very few publications about Tfh cells in multiple sclerosis patients^{12,13} but a recent study suggested the existence of CXCR5⁺CD4⁺ T cells inside the TLS of progressive multiple sclerosis patients¹⁴.

In this study we showed that a specific subset of activated Tfh cells (CXCR3⁺PD1⁺) infiltrates the CSF of RRMS patients. These Tfh1 cells present increased migration abilities to cross an *in vitro* model of blood-brain barrier. Performing an RNA sequencing analysis in patients with clinically isolated syndrome (CIS), we found that CSF-infiltrating cells have a pro-inflammatory Tfh1 signature.

The presence of activated Tfh1 cells inside the CSF of early multiple sclerosis patients suggests that they could contribute to the reactivation of autoreactive memory B cells directly inside the CNS and participate to the formation of TLS.

Materials and methods

Patients and controls

Samples from multiple sclerosis patients, healthy controls (HC), non-inflammatory neurological disease (NIND) controls and CIS patients were obtained from Nantes and Rennes multiple sclerosis expert centers. Multiple sclerosis patients were diagnosed according to the Mc Donald 2017 Criteria¹⁵. CIS is defined as the first inflammatory demyelination that can evolve to multiple sclerosis¹⁵.

Patients had no disease modifying drugs for a period of at least 3 months before the sampling. All donors provided informed consent in compliance with the Declaration of Helsinki and our local university hospital ethical committee (Biomedicine Agency identification number PFS13-003 and ethical committee n° 19.131-bis). Demographical and clinical characteristics of patients and HC are detailed in Table 1.

Mononuclear cell isolation and flow cytometry analysis

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were obtained after Ficoll density centrifugation (Sigma-Aldrich). CD4⁺ T cells were purified using negative selection on magnetic columns (CD4 T cell isolation kit, human; Miltenyi Biotec). Cells were stained with following anti-human antibodies: CXCR5-BV605, CD45RA-FITC, CCR7-PE, CXCR3-BV711, CCR6-PercpCy5.5, PD1-BUV737, CD25-BV786, CD127-BUV395 (BD Biosciences). For CSF samples and transmigration assays, CCR7-PE was replaced by a CD4-PE (Beckman Coulter). Cells were analyzed by flow cytometry (FACS Celesta, BD Biosciences). Dead cells were excluded from the analysis using Live/Dead Amcyan staining (Invitrogen).

Luminex analysis

The concentration of IL-6, IL-12p40, CXCL10, CXCL12a and CXCL13 were measured in the CSF of RRMS patients and NIND controls using an immune-assay multiplex technique based on the Luminex technology (Thermofischer).

Transmigration assays

Transmigration was assessed using the hCMEC/D3 cell line as an *in vitro* model of human blood-brain barrier (Merck Millipore). The day before the migration experiment, 3×10^5 endothelial cells were seeded on a collagen-coated 3 μm pore size transwell (Falcon) in

EndoGRO medium (Merck Millipore) as previously described¹⁶. PBMCs were stained with following anti-human antibodies: CD4-PE, CD8-FITC (Beckman Coulter), CD3-APC/Fire 750 (Biolegend). CD3⁺CD4⁺CD8⁻ T cells were sorted (FACS Aria II, BD Biosciences). Then, 5 x 10⁵ CD4⁺ T cells were added in the upper chamber in complete RPMI medium. After 20h at 37°C, migrated and non-migrated cells were collected. For both compartments, cells were stained as described above and analyzed by flow cytometry (FACS Celesta, BD Biosciences). Absolute number of cells was determined using BD Trucount tubes (BD Biosciences).

Cell sorting and RNA purification

Paired cells from the CSF and blood CD4⁺ T cells were stained with the following anti-human antibodies: CD4-APC, CD45RA-FITC (BD Biosciences), CXCR5-PeVio615 (Miltenyi Biotec). Tfh cells were defined as CD4⁺CD45RA⁻CXCR5⁺ T cells and sorted (FACS Aria Fusion, BD Biosciences). RNA was isolated from sorted Tfh cells using NucleoSpin® RNA Plus XS kit (Macherey-Nagel). Total RNA concentration and integrity were assessed using the Agilent 2100 Bioanalyzer RNA Pico chip (Agilent Technologies).

RNA sequencing analysis

cDNA libraries were obtained using SMART-Seq® v4 Ultra® Low Input RNA Kit for Sequencing (Takara Bio) and were purified using SPRI select beads (Beckman Coulter). cDNA concentration and quality were assessed using the Agilent 2100 Bioanalyzer DNA high sensitivity chip (Agilent Technologies). Libraries preparation and sequencing were performed by Next Generation Sequencing Platform (Institut Curie Genomics, Paris, France). Briefly, libraries were obtained using KAPA HyperPlus kit (Roche) and sequenced with NovaSeq 6000 (Illumina). Quality of sequencing data was monitored by FastQC. Reads were mapped to the human genome (GRCh37). Differential gene expression was performed on filtered genes (HTSfilter) using DESeq2 package (R software, version 3.6.3). Genes were declared differentially expressed with a false discovery rate < 5% and fold change ≥ 1.5 in CSF-infiltrating Tfh cells compared to circulating Tfh cells. Hierarchical clustering was generated using Ward method. Pathway analysis was performed using Metascape software¹⁷.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using Graphpad Prism Software, version 8.4. A two-tailed Mann-Whitney test was performed to compare two independent groups and a Kruskal-Wallis

test with Dunn's multiple comparisons test was performed to compare more than two independent groups. A Wilcoxon matched-pairs signed rank test was performed to compare two paired samples and a Friedman test with Dunn's multiple comparisons test was performed to compare more than two paired samples. *P*-values < 0.05 were considered significant.

Data availability

RNAseq dataset of Tfh cells in the CSF and paired blood from CIS patients has been deposited in NCBI's Gene Expression Omnibus and is accessible through GEO Series accession number GSE173084.

Results

No alterations in the phenotype of circulating Tfh cells in RRMS patients

We analyzed the phenotype of circulating Tfh cells in untreated RRMS patients sampled during relapse or remission compared to HC. Circulating Tfh cells include several populations with unique phenotypes and functions. Differential expression of CXCR3 and CCR6 by Tfh cells allows to define Tfh1 (CXCR3⁺CCR6⁻), Tfh2 (CXCR3⁻CCR6⁻), Tfh17 (CXCR3⁻CCR6⁺) and Tfh1.17 (CXCR3⁺CCR6⁺) cells¹¹ (Fig. 1A). Apart from Tfh cell subsets, circulating follicular regulatory T (Tfr) cells can be identified using extra cellular markers as CD25^{hi}CD127^{low} (Fig. 1A). We did not find any difference in RRMS patients compared to HC in terms of total circulating Tfh, Tfr, Tfh1, Tfh2, Tfh17 and (Tfh2+Tfh17)/Tfh1 ratio (known as helping ratio) (Fig. 1B-I).

Activated PD1⁺ Tfh1 cells infiltrate the CSF of early RRMS patients

We next investigated the frequency and phenotype of Tfh cells infiltrating the CSF compared to paired blood of untreated early RRMS patients. We found a significant infiltration of Tfh cells inside the CSF in higher frequency compared to paired blood (median: 15.15% in CSF vs 8.16% in blood, $P = 0.002$; Fig. 2A). CSF-infiltrating Tfh cells were mainly composed of Tfh1 cells with a high expression of PD1 (median: 41.8% in CSF vs 29.15% in blood, $P = 0.002$ for Tfh1; 47.3% in CSF vs 17.15% in blood, $P = 0.002$ for PD1⁺ Tfh1 cells; Fig. 2F-G). We also found an increased frequency of Tfh1.17 cells in the CSF (median: 11.85% in CSF vs 8.4% in blood, $P = 0.0098$; Fig. 2F).

Migrated Tfh cells across a model of blood-brain barrier present a Tfh1 profile

To investigate the ability of Tfh cells to migrate into the CNS, we analyzed the phenotype of migrated CD4⁺ T cells using an *in vitro* model of blood-brain barrier (hCMEC/D3 cell line). First, we found an increased frequency of Tfh cells in the migrated compartment compared to non-migrated CD4⁺ T cells (median: 13.35% in migrated cells vs 7.95% in non-migrated cells, $P = 0.0002$; Fig. 3A). An increased frequency of activated PD1⁺ Tfh cells was also observed in

migrated cells (median: 16.3% in migrated cells vs 11.13% in non-migrated cells, $P = 0.0081$; Fig. 3B). Then, looking at the different Tfh subsets, we found a significant increased frequency of Tfh1 cells and a decreased frequency of Tfh17 in migrated cells (median: 36.48% in migrated cells vs 27.4% in non-migrated cells for Tfh1 cells, $P = 0.0005$, and 29.38% in migrated cells vs 35.23% in non-migrated cells for Tfh17 cells, $P = 0.0035$; Fig. 3D). Although non-significant, we observed a trend to an increased frequency of Tfh1.17 cells in migrated cells (median: 12.83% in migrated cells vs 9.27% in non-migrated cells, $P = 0.1365$; Fig. 3D).

Using Luminex assays, we confirmed that CXCL10 (CXCR3 ligand), CXCL13 (CXCR5 ligand) and IL-12p40 (a cytokine important for Th1 differentiation) are highly secreted inside the CSF of RRMS patients compared to NIND and thereby that inflamed CNS is attractive for Tfh1 cell migration (median: 111.5 pg/ml in RRMS patients vs 32.79 pg/ml in NIND, $P = 0.0006$ for CXCL10 concentration; 16.75 pg/ml in RRMS patients vs 3.3 pg/ml in NIND, $P < 0.0001$ for CXCL13 concentration; and 0.76 pg/ml in RRMS patients vs 0.22 pg/ml in NIND, $P < 0.0001$ for IL-12p40; Fig. 3E-G). We also observed higher concentrations of IL-6 and CXCL12a in the CSF of RRMS patients compared to NIND controls (median: 5.86 pg/ml in RRMS patients vs 0 pg/ml in NIND, $P = 0.0198$ for IL-6 concentration; 722.8 pg/ml in RRMS patients vs 480 pg/ml in NIND, $P = 0.0395$ for CXCL12a concentration; Fig. 3H-I).

RNAseq analysis reveals a proinflammatory Tfh1 signature in the CSF of CIS patients

To further characterize CSF-infiltrating Tfh cells, we performed an RNA sequencing analysis of sorted Tfh cells from CSF and paired blood of 8 CIS patients. At last follow-up, six had converted to RRMS and two remained CIS but with high risk of conversion (at least two typical CNS lesions) (table 1).

We found 129 genes differentially expressed in CSF-infiltrating Tfh compared to paired blood (Fig. 4A). Using a hierarchical clustering analysis, we were able to discriminate Tfh cells according to the compartment (CSF or blood), suggesting a specific signature of CSF-infiltrating Tfh cells in CIS patients (Fig. 4B).

Among the differentially expressed genes, specific genes of Tfh1 subset were found in CSF-infiltrating Tfh cells. Especially, *CXCR3* (fold-change 2.16), *CXCR6* (fold-change 3.26), the transcription factor *Tbx21* (also known as *Tbet*, fold-change 2.2) and *Eomes* (*eomesodermin*, fold-change 2.65) were significantly enriched in the CSF (Fig. 4C).

Gene enrichment analysis performed using Metascape software revealed significant pathways implicated in Tfh signaling in CSF, including Chemokine receptors bind chemokines (Reactome Gene Set R-HSA-380108), Lymphocyte Activation pathway (GO:0046649) and the canonical pathway IL-12 signaling (M54) (Fig. 4D).

Discussion

Tfh cells are extensively studied in many autoimmune diseases due to their major role in B cell help. In multiple sclerosis, there are several lines of evidence demonstrating the involvement of B cells in the disease course. In this prospective study, we report a significant infiltration of Tfh1 cells, with a specific proinflammatory transcriptomic signature, inside the CSF of CIS patients, pointing out their probable direct implication in CNS inflammation as soon as the beginning of the disease.

Circulating Tfh cells include several populations with unique phenotypes and functions. These cells have distinct roles in B cell differentiation: Tfh2 and Tfh17 can support activated naïve B cells to produce immunoglobulins and to switch isotype through IL-21 secretion¹⁸. In contrast, blood memory Tfh1 cells lack the capacity to help naïve B cells¹⁰ while ICOS⁺PD1⁺ Tfh1 cells can induce memory B cells to differentiate into plasma cells¹⁹. This classification has been applied to determine Tfh response in many autoimmune diseases²⁰ and after vaccinations¹⁹.

There are only few studies exploring the circulating Tfh phenotype in multiple sclerosis. As in our data, most of these studies did not report alterations on Tfh cells frequencies in untreated RRMS patients²¹⁻²².

Among Tfh cells, Tfh1 cells are the main source of IFN γ that significantly contributes to the formation of TLS²³ and have been implicated in the reactivation of memory B cells. In our study, we report a significant infiltration of Tfh cells in the CSF of early RRMS patients, in accordance with another study²⁴ with an increased proportion of PD1⁺ Tfh1 cells. Migration assays allowed us to suggest that Tfh1 cells are more prone to cross endothelial barrier than other Tfh subtypes, which, associated to the increased Tfh1 ligands expression in CSF, may explain Tfh1 enrichment inside the inflamed CNS of multiple sclerosis patients. We also found an increased frequency of Tfh1.17 cells in the CSF of multiple sclerosis patients. Recently, van Langelaar *et al.* described that Th1.17 cells infiltrate the CSF of multiple sclerosis patients with an increased secretion of inflammatory cytokines and associated to disease activity²⁵. These data suggest that, as in CD4 T cells, Tfh1.17 cells may be a reservoir of pro-inflammatory cells important in multiple sclerosis pathogenesis.²⁵ TLS are locally inducible leukocyte aggregates that form in chronically inflamed non-lymphoid tissues and share cellular and organizational similarities with secondary lymphoid organs. TLS arise within the target tissues of many autoimmune diseases and certain sites of chronic infection. In fact, TLS have been described in about 40% of secondary progressive multiple sclerosis patients and are strongly correlated to cortical lesions and higher disability⁵. These TLS are classically composed of B cells, T cells,

follicular dendritic cells and plasma cells. Recently, Bell *et al.* reported the presence of CD4⁺CXCR5⁺ T cells inside these TLS suggesting the presence of Tfh cells¹⁴.

RNAseq analysis allowed us to determine a specific proinflammatory signature of the infiltrating Tfh cells. Especially, CSF-infiltrating Tfh cells upregulate *Eomes* gene which is a transcription factor involved in Th1 polarization and IFN γ secretion²⁶. *Eomes*⁺ CD4⁺ T cells have already been shown as inflammatory cells involved in chronic neuroinflammation in mice models and were found enriched in the blood and the CNS of secondary progressive multiple sclerosis patients^{27,28}.

Among the pathways found by metascape analysis: chemokine receptors binding, lymphocyte activation and IL-12 signaling suggest that CSF-infiltrating Tfh cells in CIS patients are more activated cells compared to the paired blood cells. Interestingly, IL-12 is a central cytokine in the differentiation of Th1 cells, and some studies have reported an increased level of IL-12 in the serum the brain of patients with severe disease^{29,30}.

Taken together, our results suggest that as soon as the disease begins, activated Tfh1 cells may have a predominant role inside the CNS inducing the formation of TLS and participating locally to memory B-cell reactivation. *Eomes* transcription factor and IL-12 pathway were found as potential keys in multiple sclerosis development.

Acknowledgements

We thank the Next Generation Sequencing Platform (Institut Curie Genomics, Paris, France) for performing the RNA sequencing analysis, and Delphine Rossille for her help with transcriptomic analysis.

Funding

This work was funded by grants from LabEx IGO (JM salary), GMSI (Grant for Multiple Sclerosis Innovation) (experiments + MM salary), ARSEP foundation (Aide à la Recherche sur la Sclérose En Plaques) (experiments) and INCR (Institut des Neurosciences Cliniques de Rennes) (SR salary).

This work has been carried out thanks to the support of the LabEx IGO program (n° ANR-11-LABX-0016-01) funded by the «Investissements d’Avenir» French Government program, managed by the French National Research Agency (ANR).

Competing interests

The authors report no competing interests.

References

1. Hauser SL, Waubant E, Arnold DL, et al. B-Cell Depletion with Rituximab in Relapsing–Remitting Multiple Sclerosis. *N Engl J Med.* 2008;358(7):676-688.
2. Hauser SL, Bar-Or A, Comi G, et al. Ocrelizumab versus Interferon Beta-1a in Relapsing Multiple Sclerosis. *N Engl J Med.* 2017;376(3):221-234.
3. Montalban X, Hauser SL, Kappos L, et al. Ocrelizumab versus Placebo in Primary Progressive Multiple Sclerosis. *N Engl J Med.* 2017;376(3):209-220.
4. Serafini B, Rosicarelli B, Magliozzi R, Stigliano E, Aloisi F. Detection of Ectopic B-cell Follicles with Germinal Centers in the Meninges of Patients with Secondary Progressive Multiple Sclerosis. *Brain Pathology.* 2004;14(2):164-174.
5. Magliozzi R, Howell O, Vora A, et al. Meningeal B-cell follicles in secondary progressive multiple sclerosis associate with early onset of disease and severe cortical pathology. *Brain.* 2006;130(4):1089-1104.
6. Magliozzi R, Howell OW, Reeves C, et al. A Gradient of neuronal loss and meningeal inflammation in multiple sclerosis. *Ann Neurol.* 2010;68(4):477-493.
7. Howell OW, Reeves CA, Nicholas R, et al. Meningeal inflammation is widespread and linked to cortical pathology in multiple sclerosis. *Brain.* 2011;134(9):2755-2771.
8. Choi SR, Howell OW, Carassiti D, et al. Meningeal inflammation plays a role in the pathology of primary progressive multiple sclerosis. *Brain.* 2012;135(10):2925-2937.
9. Lucchinetti CF, Popescu BFG, Bunyan RF, et al. Inflammatory Cortical Demyelination in Early Multiple Sclerosis. *N Engl J Med.* 2011;365(23):2188-2197.
10. Ueno H, Banchereau J, Vinuesa CG. Pathophysiology of T follicular helper cells in humans and mice. *Nat Immunol.* 2015;16(2):142-152.
11. Morita R, Schmitt N, Bentebibel S-E, et al. Human Blood CXCR5+CD4+ T Cells Are Counterparts of T Follicular Cells and Contain Specific Subsets that Differentially Support Antibody Secretion. *Immunity.* 2011;34(1):108-121.

12. Dhaeze T, Peelen E, Hombrouck A, et al. Circulating Follicular Regulatory T Cells Are Defective in Multiple Sclerosis. *Jl*. 2015;195(3):832-840.
13. Fan X, Jin T, Zhao S, et al. Circulating CCR7+ICOS+ Memory T Follicular Helper Cells in Patients with Multiple Sclerosis. *PLoS ONE*. 2015;10(7):e0134523.
14. Bell L, Lenhart A, Rosenwald A, Monoranu CM, Berberich-Siebelt F. Lymphoid Aggregates in the CNS of Progressive Multiple Sclerosis Patients Lack Regulatory T Cells. *Front Immunol*. 2020;10:3090.
15. Thompson AJ, Banwell BL, Barkhof F, et al. Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. *Lancet Neurol*. 2018;17(2):162-173.
16. Nicol B, Salou M, Vogel I, et al. An intermediate level of CD161 expression defines a novel activated, inflammatory, and pathogenic subset of CD8 + T cells involved in multiple sclerosis. *Journal of Autoimmunity*. 2018;88:61-74.
17. Zhou Y, Zhou B, Pache L, et al. Metascape provides a biologist-oriented resource for the analysis of systems-level datasets. *Nat Commun*. 2019;10(1):1523.
18. Schmitt N, Bentebibel S-E, Ueno H. Phenotype and functions of memory Tfh cells in human blood. *Trends in Immunology*. 2014;35(9):436-442.
19. Bentebibel S-E, Lopez S, Obermoser G, et al. Induction of ICOS+CXCR3+CXCR5+ TH Cells Correlates with Antibody Responses to Influenza Vaccination. *Science Translational Medicine*. 2013;5(176):176ra32-176ra32.
20. Ueno H. Human Circulating T Follicular Helper Cell Subsets in Health and Disease. *J Clin Immunol*. 2016;36(S1):34-39.
21. Cunill V, Massot M, Clemente A, et al. Relapsing–Remitting Multiple Sclerosis Is Characterized by a T Follicular Cell Pro-Inflammatory Shift, Reverted by Dimethyl Fumarate Treatment. *Front Immunol*. 2018;9:1097.
22. Huber JE, Chang Y, Meinel I, Kümpfel T, Meinel E, Baumjohann D. Fingolimod Profoundly Reduces Frequencies and Alters Subset Composition of Circulating T Follicular Helper Cells in Multiple Sclerosis Patients. *Jl*. 2020;204(5):1101-1110.

23. Domeier PP, Chodisetti SB, Soni C, et al. IFN- γ receptor and STAT1 signaling in B cells are central to spontaneous germinal center formation and autoimmunity. *Journal of Experimental Medicine*. 2016;213(5):715-732.
24. Schafflick D, Xu CA, Hartlehnert M, et al. Integrated single cell analysis of blood and cerebrospinal fluid leukocytes in multiple sclerosis. *Nat Commun*. 2020;11(1):247.
25. van Langelaar J, van der Vuurst de Vries RM, Janssen M, et al. T helper 17.1 cells associate with multiple sclerosis disease activity: perspectives for early intervention. *Brain*. 2018;141(5):1334-1349.
26. Suto A, Wurster AL, Reiner SL, Grusby MJ. IL-21 Inhibits IFN- γ Production in Developing Th1 Cells through the Repression of Eomesodermin Expression. *J Immunol*. 2006;177(6):3721-3727.
27. Raveney BJE, Oki S, Hohjoh H, et al. Eomesodermin-expressing T-helper cells are essential for chronic neuroinflammation. *Nat Commun*. 2015;6(1):8437.
28. Raveney BJE, Sato W, Takewaki D, et al. Involvement of cytotoxic Eomes-expressing CD4⁺ T cells in secondary progressive multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2021;118(11):e2021818118.
29. Khaibullin T, Ivanova V, Martynova E, et al. Elevated Levels of Proinflammatory Cytokines in Cerebrospinal Fluid of Multiple Sclerosis Patients. *Front Immunol*. 2017;8:531.
30. Magliozzi R, Howell OW, Nicholas R, et al. Inflammatory intrathecal profiles and cortical damage in multiple sclerosis: Intrathecal Inflammation in MS. *Ann Neurol*. 2018;83(4):739-755.

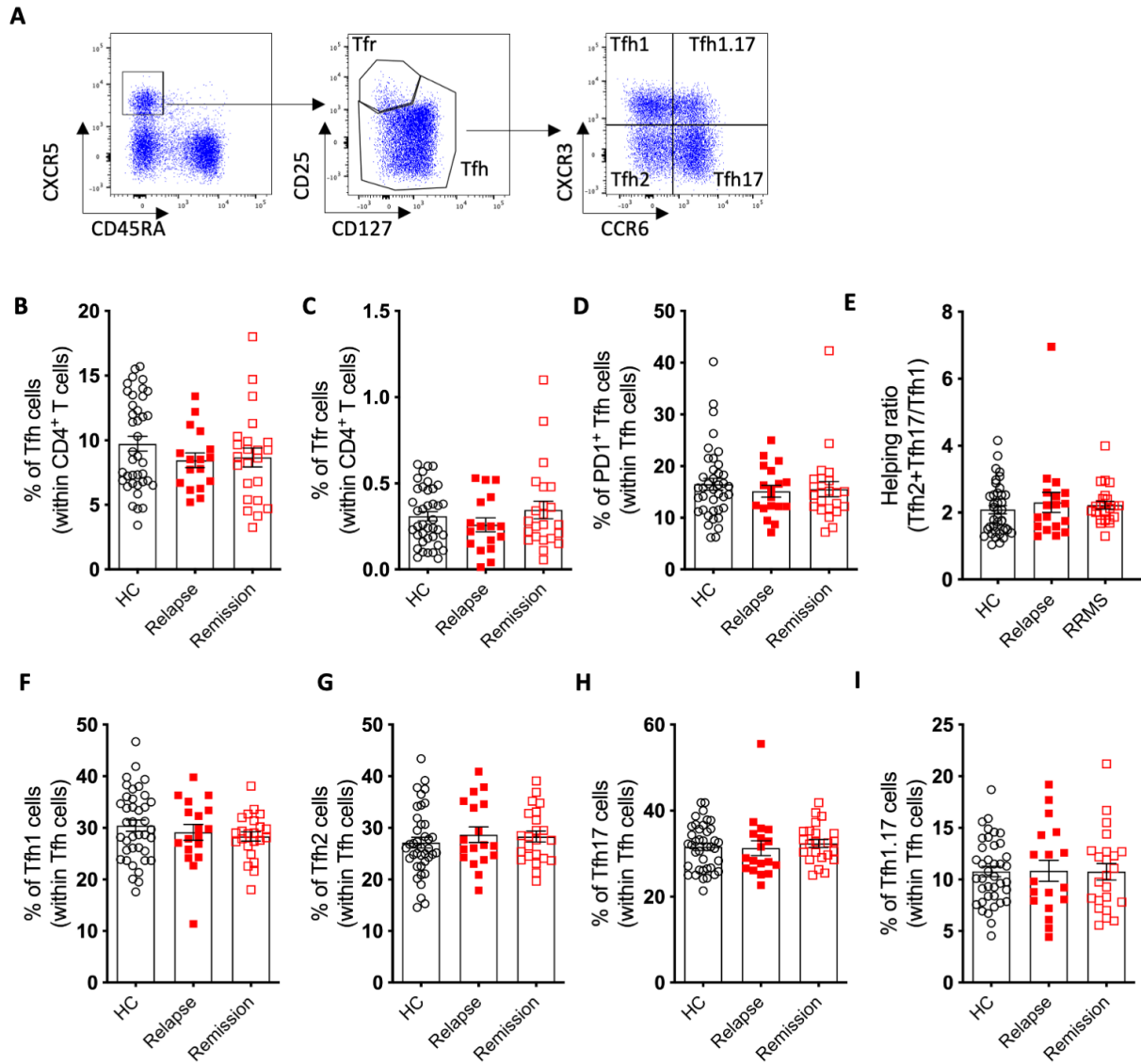


Figure 1 No difference in circulating Tfh cells phenotype in RRMS patients.

(A) From left to right, representative flow-cytometric analysis of Tfh cells, Tfr cells and Tfh subsets (Tfh1, Tfh2, Tfh17 and Tfh1.17 cells). (B-D) Frequencies of Tfh (B), Tfr (C) and PD1⁺ Tfh cells (D) from untreated RRMS patients in relapse ($n = 18$), RRMS patients in remission ($n = 23$) and HC ($n = 39$). (E) Helping ratio consisting of (Tfh2+Tfh17)/Tfh1 ratio in multiple sclerosis patients and HC. (F-I) Frequencies of Tfh1 (F), Tfh2 (G), Tfh17 (H) and Tfh1.17 (I) cells from multiple sclerosis patients and HC.

All P -values were calculated using the non-parametric Kruskal-Wallis test with Dunn's multiple comparisons test.

* $P < 0.05$. Bars indicate the mean \pm SEM.

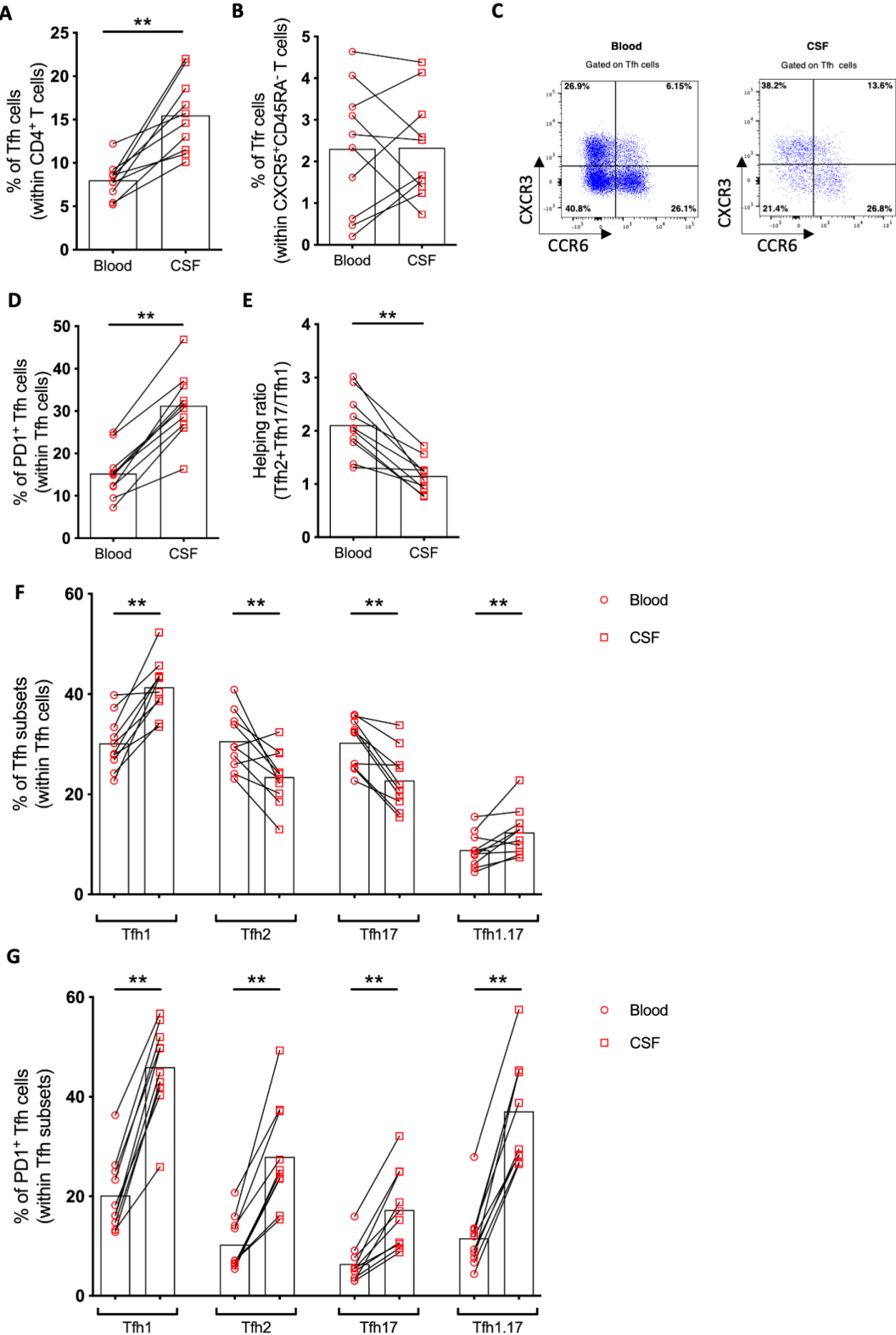


Figure 2 Activated PD1⁺ Tfh1 cells infiltrate the CSF of RRMS patients.

(A-B) Frequencies of Tfh (A) and Tfr cells (B) in the CSF compared to paired blood of untreated RRMS patients at the onset of the disease (n = 10). (C) Representative dot plots of Tfh1, Tfh2, Tfh17 and Tfh1.17 cells in the blood and the CSF. (D) Frequency of PD1⁺ Tfh cells among Tfh cells in CSF and blood. (E) Helping ratio in the CSF compared to paired blood. (F-G) Frequencies of Tfh subsets among Tfh cells (F) and PD1⁺ cells among Tfh subsets (G) in the CSF compared to paired blood. All P-values were calculated using the non-parametric Wilcoxon matched-pairs signed rank test. * P < 0.05; ** P < 0.01. Bars indicate the mean.

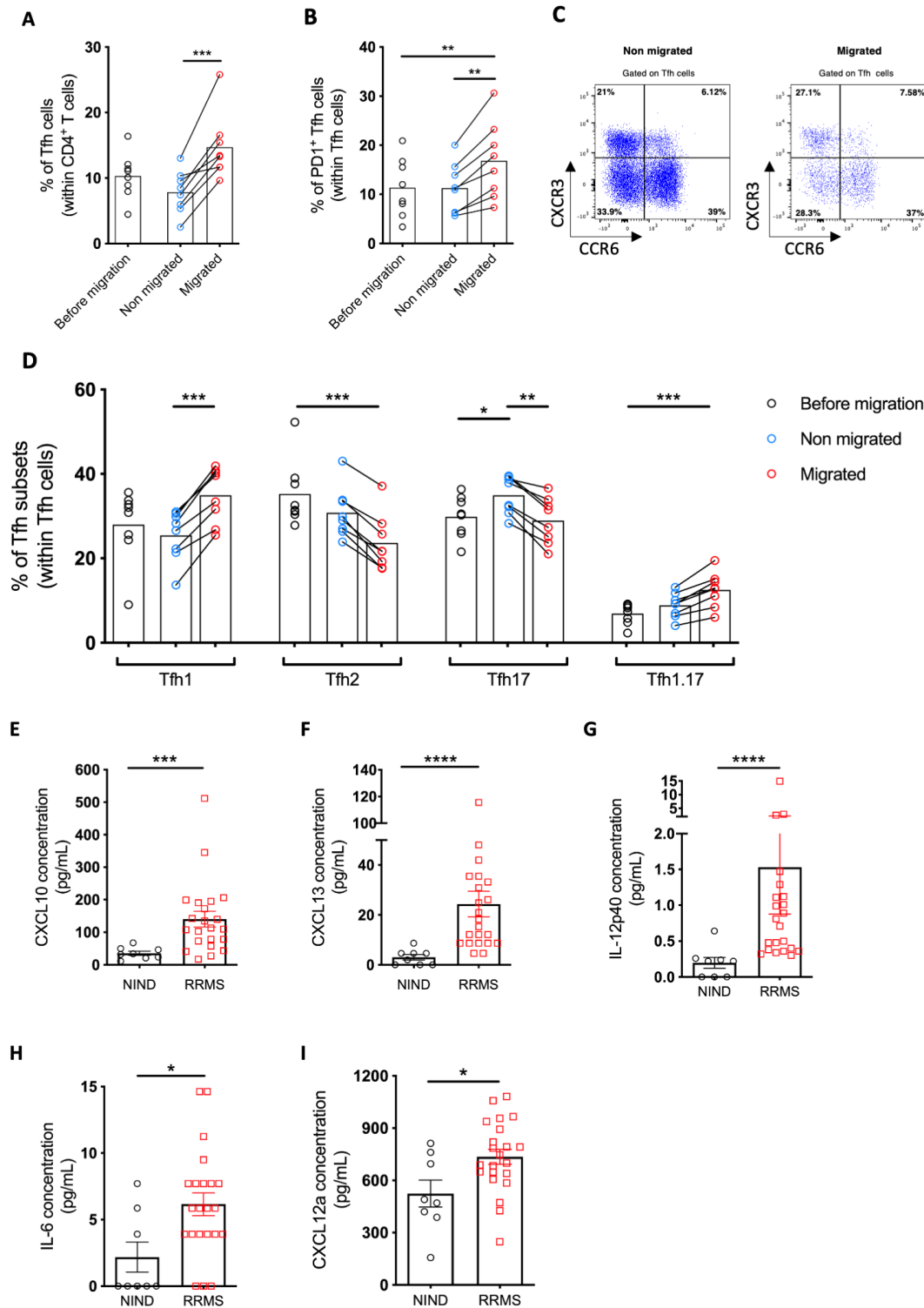


Figure 3 Migrated Tfh cells across an *in vitro* model of blood-brain barrier present a Tfh1 profile.

(A-B) Frequencies of Tfh (A) and PD1⁺ Tfh cells (B) among CD4⁺ T cells in migrated compartment, non-migrated compartment and before the migration assay ($n = 8$ HC). (C) Representative dot plots of Tfh1, Tfh2, Tfh17 and Tfh1.17 cells in the migrated and non-migrated compartments. (D) Frequencies of Tfh1, Tfh2, Tfh17 and Tfh1.17 cells among Tfh cells in migrated compartment, non-migrated compartment and before the migration assay ($n = 8$ HC). (E-I) Luminex analysis of the concentration of CXCL10 (E), CXCL13 (F), IL-12p40 (G), IL-6 (H) and CXCL12a (I) in the CSF of RRMS patients ($n = 22$) and NIND controls ($n = 8$).

For migration assays, P -values were calculated using the non-parametric Friedman test with Dunn's multiple comparisons test. For Luminex analysis, P -values were calculated using the non-parametric Mann-Whitney test. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$. Bars indicate the mean \pm SEM.

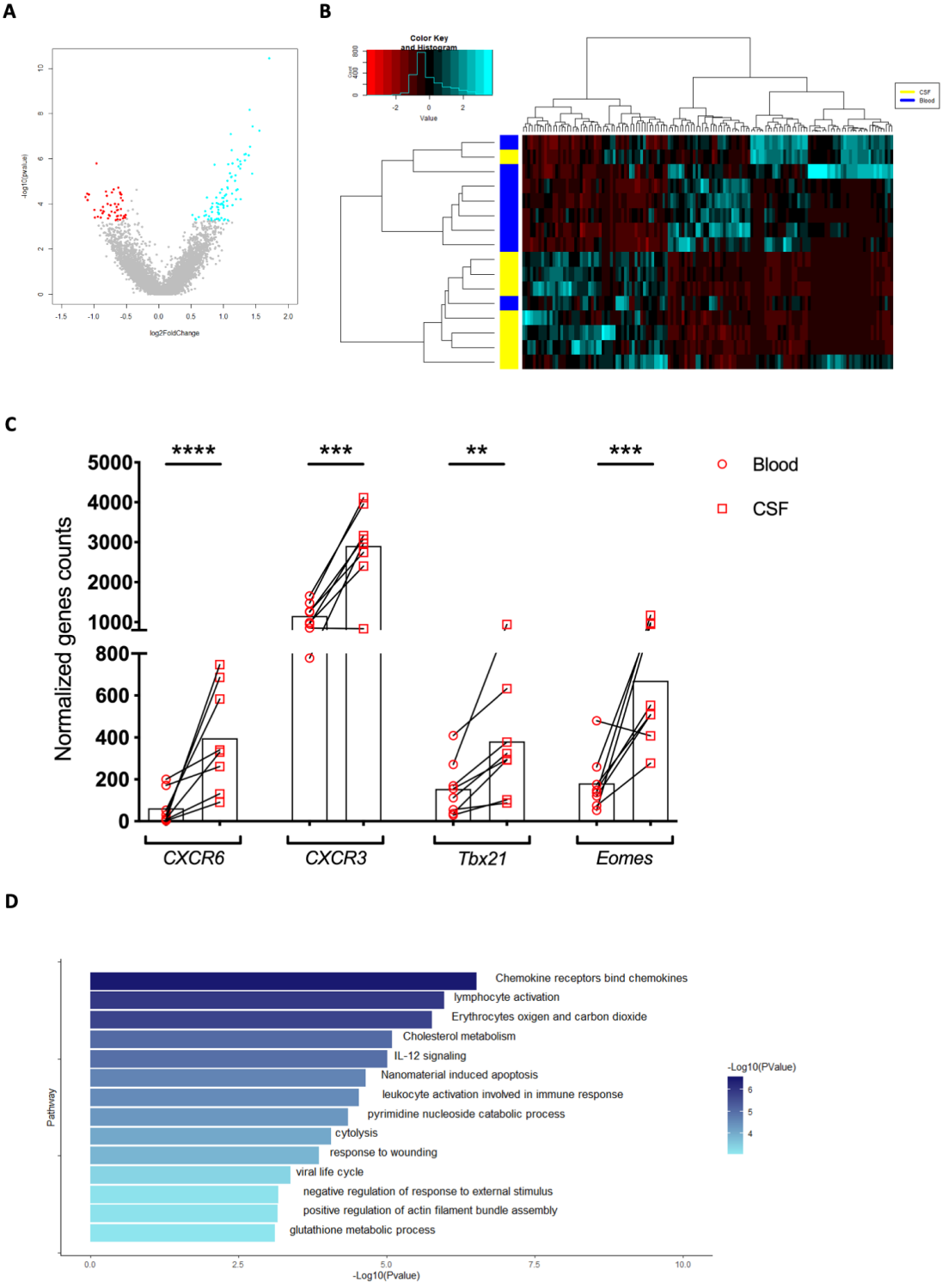


Figure 4 RNAseq analysis reveals a proinflammatory Tfh1 signature of CSF-infiltrating Tfh cells of CIS patients.

(A) Volcano-plot visualization of differentially expressed genes between CSF compartment and paired blood Tfh cells (significance defined as fold-change ≥ 1.5 , adjusted P -value ≤ 0.05). (B) Clustering analysis of differentially expressed genes of CSF-infiltrating Tfh cells compared to blood Tfh cells in CIS patients. Red and blue represent low and high expression levels, respectively. (C) Representative plots of normalized gene counts for specific genes of Tfh1 cells (*CXCR3*, *CXCR6*, *Tbx21*, *Eomes*). (D) Pathways implicated in CSF-infiltrating Tfh cells. Analysis was performed using Metascape software.

Table 1 Clinical and demographic characteristics of patients and controls.

Cohort	Subjects, <i>n</i>	Form of disease, <i>n</i>	Gender, female, <i>n</i> (%)	Age in years, median (range) ^a	Disease duration in months, median (range) ^b	EDSS, median (range)	Diagnosis at last follow-up
Peripheral Tfh cell phenotype							
HC	39	-	28 (70)	36 (21-51)	-	-	
RRMS in relapse ^c	18	-	13 (72)	32 (18-54)	1 (0.25-240)	2 (1-7)	
RRMS in remission	23	-	19 (80)	36 (22-53)	24 (1-348)	1 (0-3.5)	
Tfh cell phenotype in CSF and paired blood							
RRMS	10	RRMS in relapse, 7	6 (60)	30 (18-46)	0.75 (0.3-144)	1.25 (0-2)	
		RRMS in remission, 3					
Transmigration assays of Tfh cells							
HC	8	-	8 (100)	37 (22-44)	-	-	
Luminex analysis of cytokines and chemokines concentration in the CSF							
NIND	8	-	5 (63)	36 (23-49)	-	-	
RRMS	22	RRMS in relapse, 11	15 (68)	29.5 (23-46)	0.9 (0-84)	1 (0-4)	
		RRMS in remission, 11					
RNAseq analysis of CSF-infiltrating Tfh cells							
CIS	8	Relapse, 7	6 (75)	24.5 (18-44)	0.5 (0.1-2)	2.5 (0-7)	6 multiple sclerosis conversion, 2 high risk CIS

^a At the time of sampling.

^b Time from diagnosis to sampling.

^c RRMS according to the McDonald (2017) criteria.

EDSS = expanded disease severity score; HC = healthy controls; RRMS = relapsing-remitting multiple sclerosis; PMS = progressive multiple sclerosis; NIND = non-inflammatory neurological disease; CIS = Clinically isolated syndrome

Discussion et perspectives

A. Étude de la différenciation lymphocytaire B et de la réponse humorale à IgA dans la SEP

La SEP a longtemps été considérée comme étant principalement dirigée par les LT, mais l'implication des LB dans la physiopathologie de la maladie est désormais admise, comme ont pu en attester l'efficacité radiologique et clinique des traitements éliminant les LB (Hauser *et al.*, 2017 ; Montalban *et al.*, 2017). Une certaine hétérogénéité de fonctions existe au sein des LB selon leur état de différenciation (LB naïfs, mémoires, plasmocytes). Concernant leur implication dans la SEP, les LB mémoires sont ainsi considérés aujourd'hui comme le réservoir de LB aux fonctions plus délétères, notamment par des capacités accrues de sécrétion de cytokines pro-inflammatoires ou de présentation de l'antigène aux LT (Li *et al.*, 2015 ; Jelcic *et al.*, 2018). Ainsi, en éliminant ces LB mémoires, les traitements anti-CD20 (rituximab, ocrelizumab, ofatumumab) permettraient de réduire l'inflammation directement par une suppression de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires par les LB mémoires, et indirectement en réduisant l'activité des LT initialement promue par ces cellules (Bar-Or *et al.*, 2010 ; Li *et al.*, 2015 ; Jelcic *et al.*, 2018).

D'un autre côté, des LB aux fonctions régulatrices ont été décrits ces dernières années, et bien qu'un phénotype commun à ces LB régulateurs n'ait pas encore été identifié, certaines études ont mis en évidence dans des modèles animaux, mais également chez l'homme, que les cellules sécrétrices d'anticorps (plasmablastes et plasmocytes) constituaient le principal réservoir de LB régulateurs (Matsumoto *et al.*, 2014 ; Shen *et al.*, 2014 ; Lino *et al.*, 2018). Pour rappel, l'atacept, une protéine de fusion entre le récepteur TACI et une Ig bloquant la maturation des LB en plasmocytes, avait échoué dans la prise en charge de la SEP RR et avait même conduit à une exacerbation de la maladie chez certains patients (Kappos *et al.*, 2014). Il est alors intéressant de noter que la liaison du récepteur TACI avec son ligand APRIL a été mis en évidence comme induisant la différenciation des LB en plasmocytes sécréteurs d'IgA (Sakurai *et al.*, 2007). Récemment, une étude a même montré que la liaison d'APRIL avec TACI induisait une différenciation de LB naïfs en LB à IgA sécréteurs d'IL-10 (Fehres *et al.*, 2019). Dans cette même étude, ces LB régulateurs induits par APRIL permettaient de réduire l'inflammation observée dans un modèle EAE, suggérant alors le potentiel protecteur de ces

LB régulateurs à IgA dans la SEP (Fehres *et al.*, 2019). Ainsi, alors que les traitements anti-CD20 pourraient être efficaces grâce à l'élimination de LB mémoires pro-inflammatoires, l'atacept pourrait quant à lui avoir échoué dans la prise en charge de la maladie par l'inhibition de la différenciation de LB en plasmocytes à IgA régulateurs.

Le potentiel régulateur des plasmocytes à IgA nous a donc amenés à nous intéresser à la réponse humorale à IgA dans la SEP. Nous avons ainsi pu observer une concentration plus faible des IgA dans le sérum des patients SEP RR par rapport à des témoins sains. Une concentration diminuée des IgA sérique a également été retrouvée chez les patients SCI ayant définitivement converti vers une SEP par rapport à des patients SCI n'ayant pas converti. Bien que de manière non significative, une précédente étude avait déjà retrouvé une concentration plus faible des IgA dans le sérum de patients SEP et SCI (Trend *et al.*, 2018). Ces résultats peuvent suggérer qu'il existe un défaut fonctionnel des cellules sécrétrices d'IgA chez les patients SEP conduisant à cette concentration réduite des IgA observée en périphérie.

Comme la SEP est une maladie affectant le SNC, nous avons analysé la concentration des IgA dans le LCR de patients SEP et de contrôles neurologiques non-inflammatoires. De manière attendue, nous avons retrouvé une concentration plus élevée des IgG et IgM ainsi qu'une tendance à une concentration plus forte des IgA chez les patients SEP, tandis que la proportion des IgA au sein des Igs était quant à elle réduite. Une inflammation de la BHE étant présente dans la SEP, les Igs peuvent diffuser passivement vers le LCR des patients, pouvant alors expliquer les concentrations plus importantes chez les patients SEP. De plus, une synthèse intrathécale d'Igs a pu être décrite et bien caractérisée chez les patients SEP. Ainsi, une synthèse locale d'IgG est présente chez une majorité de patients alors que la sécrétion d'IgM et d'IgA, bien que décrites, semblent moins fréquentes (Lolli *et al.*, 1989 ; Reiber *et al.*, 1998 ; Leary *et al.*, 2000 ; Gasperi *et al.*, 2019 ; Klein *et al.*, 2019). La majorité des recherches portant sur la réponse humorale dans la SEP se sont intéressées aux IgG et aux IgM, mais assez peu aux IgA. Cependant, il est intéressant de noter que différentes études ont pu associer la synthèse intrathécale d'IgA à un bon pronostic de la maladie (Sellebjerg *et al.*, 1998 ; Abdelhak *et al.*, 2017 ; Klein *et al.*, 2019). En effet, la production locale d'IgA a pu être associée des concentrations plus faibles de MBP dans le LCR des patients, suggérant ainsi un effet protecteur des IgA sur la démyélinisation (Sellebjerg *et al.*, 1998). De même, une corrélation négative entre cette sécrétion d'IgA dans le LCR et la progression de la maladie chez des patients de forme PP a pu être observée (Abdelhak *et al.*, 2017). Enfin, plus récemment, les travaux de Klein *et al.* ont mis en évidence que la synthèse intrathécale d'IgA, bien que rare, était associée

à une inflammation radiologique moins importante des patients, suggérant l'aspect protecteur d'une infiltration de cellules sécrétrices d'IgA au sein du SNC (Klein *et al.*, 2019).

Afin de mieux étudier ces cellules sécrétrices d'anticorps dans la SEP, nous avons utilisé un modèle de différenciation des LB *in vitro* nous donnant accès à des plasmablastes (Le Gallou *et al.*, 2012 ; Chesneau *et al.*, 2014). Nous avons ainsi pu observer une réduction de la prolifération et de la différenciation des LB en plasmablastes ainsi qu'une sécrétion plus faible des IgA par les LB des patients SEP. Les résultats obtenus à l'aide de ce modèle peuvent laisser penser qu'il existerait chez les patients SEP un défaut intrinsèque dans la différenciation des LB conduisant à une différenciation altérée des plasmocytes à IgA et à la sécrétion réduite d'IgA que nous avons observée.

Nous avons par la suite retrouvé une fréquence amoindrie des LB mémoires à IgA chez les patients en cours de poussée inflammatoire comparés à des témoins sains. Afin de mieux caractériser ces cellules, une analyse transcriptomique par RNAseq a été réalisée et nous a permis d'identifier des gènes différemment exprimés entre patients SEP et témoins sains. Certains de ces gènes étant liés au cycle cellulaire, leur différence d'expression pourrait indiquer une réduction de la capacité proliférative de ces cellules chez les patients SEP. Parmi les gènes différemment exprimés, il est intéressant de noter que le gène *IL5RA* a été identifié comme surexprimé par les LB à IgA des patients SEP. Ce gène code pour la chaîne alpha du récepteur à l'IL-5, une cytokine induisant la prolifération des LB à IgA et leur sécrétion d'IgA (Harriman *et al.*, 1988 ; Schoenbeck *et al.*, 1989 ; Sonoda *et al.*, 1992 ; Hashigushi *et al.*, 2020). Par ailleurs, une étude a mis en évidence que l'IL-5 permettait d'induire la sécrétion d'IL-10 par les LB, leur conférant alors des fonctions régulatrices (Klinker *et al.*, 2013). Ainsi, la signalisation de l'IL-5 semble primordiale dans l'induction de LB à IgA régulateurs. Toutefois, la surexpression du récepteur à l'IL-5 par les LB à IgA des patients peut alors sembler contradictoire. Pourrait-elle signifier qu'en contexte d'inflammation chronique les LB à IgA tendent à s'orienter vers un profil régulateur ? La cohorte de cette étude étant de taille relativement restreinte, des études plus approfondies seront nécessaires afin de déterminer l'importance de la surexpression du récepteur à l'IL-5 au sein des LB à IgA des patients. Enfin, grâce à notre analyse RNAseq, nous avons été en mesure de discriminer en deux groupes distincts les patients et témoins sains à partir du profil transcriptomique des LB à IgA, mais pas à partir de celui des LB à IgG ou IgM. Ce résultat suggère donc qu'il existerait une signature spécifique aux LB à IgA chez les patients SEP et renforce l'intérêt que peuvent avoir ces cellules dans la maladie.

Deux études récentes ont permis d'apporter quelques réponses quant au rôle des cellules sécrétrices d'IgA dans la SEP. La première de ces études a mis en évidence à l'aide d'un modèle EAE qu'un recrutement des plasmocytes à IgA avait lieu au cours de l'inflammation. Ces cellules quittaient en effet l'intestin et migraient vers le SNC des animaux où elles régulaient localement la neuro-inflammation par la sécrétion d'IL-10 (Rojas *et al.*, 2019). Plus récemment, Pröbstel *et al.* ont retrouvé chez l'homme cette fois une clonalité partagée des LB à IgA entre la périphérie et le LCR des patients SEP, suggérant de possibles échanges de ces cellules entre les compartiments (Pröbstel *et al.*, 2020). Dans cette même étude, des infiltrats de plasmocytes à IgA exprimant l'IL-10 ont été identifiés dans le SNC de patients SEP, suggérant que, à l'instar de ce qui avait été montré chez l'animal, les plasmocytes régulateurs à IgA infiltrent le SNC afin de réguler localement la neuro-inflammation. De manière intéressante, ces deux études s'étaient également intéressées à la spécificité antigénique des plasmocytes à IgA et ont retrouvé une réactivité contre des antigènes de bactéries issues du microbiote intestinal mais pas contre des antigènes du SNC. Ainsi, les plasmocytes régulateurs à IgA pourraient être induits en contact du microbiote intestinal et seraient mobilisés lors de l'inflammation chronique pour venir réguler localement cette inflammation du SNC.

Les différents résultats de notre étude tendent à montrer qu'il existe un défaut fonctionnel des LB à IgA chez les patients SEP. Ces cellules sont en effet retrouvées moins fréquentes en périphérie chez les patients en poussée et la sécrétion d'IgA est plus faible à la fois dans le sérum des patients SEP et après induction d'une différenciation de LB en plasmablastes. Nous pouvons donc penser que les LB à IgA, décrits comme cellules régulatrices importantes dans la neuro-inflammation, ont une fonction altérée chez les patients SEP. Le microbiote intestinal étant important dans le développement des plasmocytes régulateurs à IgA, il semble nécessaire de mieux étudier l'implication du microbiote dans la physiopathologie de la SEP et les interactions qu'il peut avoir avec les cellules immunitaires. Des études plus approfondies de la réponse humorale à IgA et une meilleure caractérisation des LB à IgA exprimant le récepteur à l'IL-5 sont en cours afin de mieux comprendre leur importance dans la physiopathologie de la SEP.

Une hypothèse du rôle des plasmocytes à IgA dans la physiopathologie de la SEP est illustrée dans la figure 8.

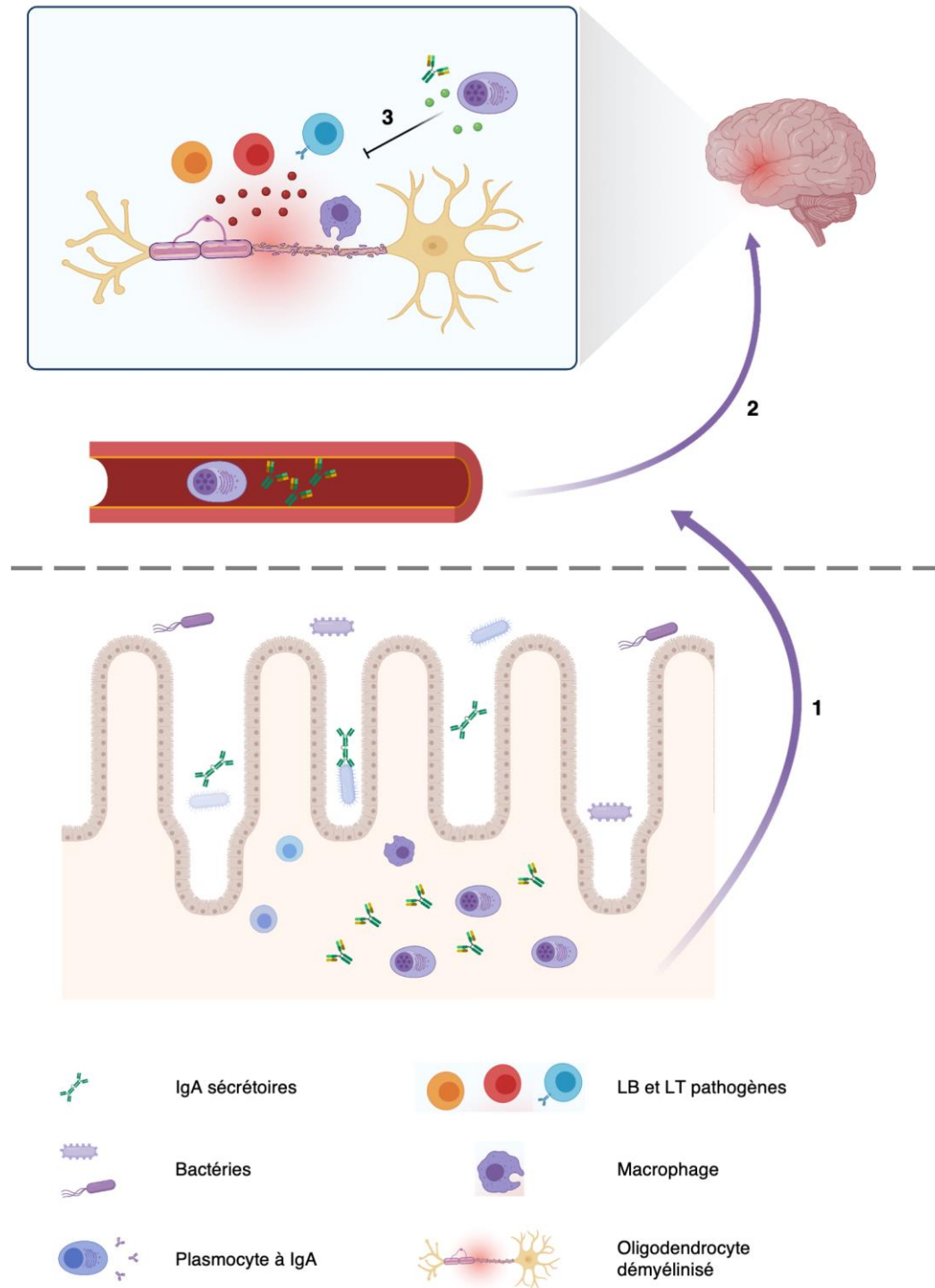


Figure 8 : Hypothèse sur le rôle des plasmocytes à IgA dans la SEP.

Les plasmocytes à IgA se développent dans la muqueuse intestinale où ils permettent l'homéostasie entre hôte et microbiote par la neutralisation des bactéries commensales. Une population de plasmocytes à IgA aux fonctions régulatrices passant par la sécrétion d'IL-10 a récemment été décrite. En contexte neuro-inflammatoire (EAE, SEP), ces cellules quitteraient l'intestin (1), passeraient en périphérie puis migreraient vers le SNC (2) afin de réguler localement la neuro-inflammation (3). Un défaut fonctionnel des plasmocytes régulateurs à IgA pourrait alors être présent chez les patients SEP.

Cette figure a été réalisée à l'aide de BioRender.

B. Caractérisation des Tfh et de leur implication dans la SEP

Comme nous avons pu le voir, le rôle des LB dans la physiopathologie de la SEP est aujourd'hui reconnu, mais une dichotomie entre cellules pro-inflammatoires et cellules régulatrices semble avoir son importance. Cette hétérogénéité fonctionnelle des LB semble par ailleurs suivre l'état de différenciation de ces cellules, puisque les LB mémoires sont à ce jour considérés comme le réservoir principal de cellules pro-inflammatoires au sein des LB alors que les cellules sécrétrices d'anticorps semblent quant à elles constituer la principale source de LB régulateurs. Il est intéressant de noter que le choix de la différenciation des LB en LB mémoires ou en cellules sécrétrices d'anticorps se fait dans les CG sous la direction de différents signaux apportés par les FDC et Tfh. Les fonctions des Tfh et les signaux qu'ils transmettent aux LB semblent différer selon les sous-populations, les Tfh2 et Tfh17 étant ainsi considérés comme plus à même d'aider les LB naïfs à se différencier en plasmocytes, tandis que les Tfh1 semblent inaptes à apporter cette aide aux LB naïfs, mais pourraient par contre aider à réactiver les LB mémoires (Bentebibel *et al.*, 2013 ; Schmitt *et al.*, 2014 ; Ueno *et al.*, 2015).

De nombreuses études se sont donc intéressées ces dernières années au rôle des Tfh dans les maladies auto-immunes telles que la polyarthrite rhumatoïde ou le lupus par exemple (Gensous *et al.*, 2018). Bien que certains travaux aient été publiés dans la SEP, nous ne pouvons tirer de réel consensus des données apportées pour le moment. Cependant, la découverte de TLT au sein des méninges de patients de forme SP, ces structures reproduisant l'organisation des OLS avec une différenciation locale des LB, soutient l'idée que les Tfh ont un rôle probablement important dans la maladie.

Notre étude s'est donc intéressée à caractériser le phénotype des Tfh en périphérie au sein d'une cohorte de patients SEP RR en comparaison à des témoins sains. Comme cela avait déjà pu être décrit, nous n'avons pas retrouvé de différence significative dans le phénotype des Tfh circulants entre les patients et les témoins sains (Romme Christensen *et al.*, 2013 ; Cunill *et al.*, 2018 ; Huber *et al.*, 2020).

Comme la SEP est une maladie affectant le SNC, nous nous sommes intéressés à déterminer si les Tfh infiltrent le LCR des patients et avec quel phénotype. En analysant par cytométrie en flux le même phénotype des Tfh entre le LCR et le sang apparié de patients RR en début de maladie, nous avons d'abord observé que les Tfh infiltrent le LCR des patients avec une fréquence plus élevée que celle du sang apparié. Concernant le phénotype des Tfh infiltrant le LCR, nous retrouvons une augmentation de la fréquence des Tfh1 PD1⁺ par rapport au sang

apparié. Ce résultat rejoint les travaux récents de Schafflick *et al.* qui, à l'aide d'une analyse par RNAseq sur cellule unique, ont retrouvé une surreprésentation des Tfh PD1⁺ au sein du LCR des patients SEP (Schafflick *et al.*, 2020). La surexpression de PD1 par les Tfh du LCR par rapport au sang apparié indique que ces cellules ont un profil plus activé, semblant se rapprocher de celui des Tfh du CG qui sont caractérisés par une forte expression de PD1. L'infiltration de Tfh1 dans le LCR peut sembler contradictoire avec la fonction peu importante de ces cellules dans l'aide apportée à la différenciation des LB naïfs, cependant il a été démontré que les Tfh1 constituent la population de Tfh la plus efficace pour réactiver des LB mémoires et les aider à se différencier en plasmocytes (Bentebibel *et al.*, 2013). D'une part, Domeier *et al.* ont mis en évidence que la signalisation apportée par l'IFN γ aux LB est nécessaire à la formation spontanée de CG auto-réactifs, et d'autre part les Tfh1 ont été décrits comme la principale population sécrétrice d'IFN γ parmi les Tfh (Morita *et al.*, 2011 ; Domeier *et al.*, 2016). Ces données suggèrent donc que, bien que peu efficaces pour aider les LB naïfs à se différencier en plasmocytes, les Tfh1 auraient un rôle prépondérant dans la formation de TLT par la sécrétion d'IFN γ , cette formation de TLT leur permettant alors de réactiver des LB mémoires localement et les aider à se différencier en plasmocytes.

Les TLT ayant été observés chez des patients de forme SP et étant associés à la gravité de la maladie, on peut donc imaginer que dès les stades précoces de la maladie les Tfh infiltrent le SNC des patients avec un profil activé de Tfh1 où ils participent à l'inflammation locale, notamment *via* la sécrétion d'IFN γ . Ces Tfh1 contribueraient alors à la formation de ces TLT et à la réactivation et différenciation *in situ* des LB mémoires, une population de LB considérée comme pathogénique dans la SEP. Récemment, les travaux de Bell *et al.* ont mis en évidence la présence de LT CD4⁺CXCR5⁺ au sein des lésions du SNC de patients de forme progressive et dans les TLT de patients de forme SP (Bell *et al.*, 2020). Ces données renforcent donc l'idée que les Tfh infiltrent le SNC des patients et sont localisés au sein des TLT des patients. Des études histologiques sont en cours au sein de notre équipe de recherche afin de déterminer si nous retrouvons aussi des infiltrats de Tfh dans le SNC des patients, mais également pour savoir si ces cellules y ont un phénotype de Tfh1 comme observé dans le LCR en début de maladie. L'analyse du phénotype des LT CD4⁺ après migration à travers un modèle de barrière hémato-encéphalique a mis en évidence une fréquence significativement plus élevée des Tfh1 parmi les cellules ayant migrées par rapport à celles qui n'ont pas migré. Ces résultats suggèrent que les Tfh1 sont une population de Tfh ayant des capacités de migration accrues vers le SNC et sont en lien avec le phénotype observé dans le LCR des patients SEP RR en début de maladie. Par ailleurs, après analyse par Luminex de la concentration de différentes cytokines et chémokines

dans le LCR de patients SEP et contrôles neurologiques non-inflammatoires, nous avons pu observer chez les patients SEP des concentrations plus élevées d'IL-6, IL-12, CXCL10, CXCL12a et CXCL13, comme cela avait pu être décrit par le passé (Khaibullin *et al.*, 2017 ; Magliozzi *et al.*, 2018). Les taux élevés de ces cytokines et chémokines confirment que le LCR des patients SEP est un milieu inflammatoire, propice à l'infiltration, la survie, l'activation et la différenciation de cellules immunitaires. De manière intéressante, l'IL-12 est connue comme étant une cytokine majeure dans la différenciation des LT CD4⁺ en cellules Th1, tandis que CXCL10 permet l'attraction des cellules exprimant son ligand CXCR3, avec parmi elles les Th1. CXCL13 est quant à elle une chémokine dont le récepteur CXCR5 est exprimé par les Tfh mais aussi par certains LB. Certaines études ont par ailleurs déjà mis en évidence des taux élevés de CXCL13 dans le LCR des patients SEP, ces taux élevés étant même associés à une sévérité accrue de la maladie (Krumbholz *et al.*, 2006 ; Ferraro *et al.*, 2015). Ainsi, ces différentes données confirment que le LCR des patients SEP est un milieu favorisant l'infiltration de Tfh1 comme nous avons pu l'observer.

Afin de mieux caractériser les Tfh infiltrant le LCR des patients SEP, nous avons réalisé une analyse transcriptomique par RNAseq de ces cellules par rapport au sang apparié. De manière intéressante, cette analyse a permis de retrouver 129 gènes différemment exprimés entre le LCR et le sang apparié. Nous retrouvons ainsi une surexpression par les Tfh du LCR de certains gènes associés à un profil Th1 tels que *CXCR3*, *Tbet*, *CXCR6* ou *Eomesodermin* (*Eomes*). La surexpression de certaines voies de signalisation (*lymphocyte activation pathway*, *IL-12 signaling pathway*) par les Tfh du LCR semble également confirmer un profil Tfh1 activé et pro-inflammatoire de ces cellules. De plus, le profil transcriptomique des Tfh nous a permis de discriminer les cellules selon leur compartiment d'origine (LCR ou sang), suggérant une signature spécifique des Tfh infiltrant le LCR des patients SEP.

Parmi les gènes surexprimés par les Tfh infiltrant le LCR des patients, il est intéressant de noter la présence du gène *Eomes*. *Eomes* est un facteur de transcription, fortement exprimé par les LT CD8⁺ mais peu par les LT CD4⁺, ce qui a pu compliquer l'étude de ses fonctions au sein de ces cellules. Malgré cela, certaines études ont mis en évidence le rôle important d'*Eomes* dans l'orientation des LT CD4⁺ vers une polarisation Th1 et dans l'induction de l'expression d'IFN γ (Suto *et al.*, 2006 ; Yang *et al.*, 2008). L'expression d'*Eomes* pourrait également conduire à la formation de LT CD4⁺ co-exprimant l'IFN γ et le GM-CSF, deux cytokines pro-inflammatoires importantes dans la neuro-inflammation (Stienne *et al.*, 2016 ; Mazzoni *et al.*, 2019). Une étude a même montré que la transfection d'*Eomes* à des LT CD4⁺ leur conférait un profil de cellules cytotoxiques passant notamment par l'expression de FAS-L ou la sécrétion de

perforine/granzyme B (Eshima *et al.*, 2012). L'implication d'Eomes dans la SEP a déjà été suggéré par différents travaux. Ainsi, un variant du gène *Eomes* a pu être associé avec un risque de développer la SEP (International Multiple Sclerosis Genetics Consortium, 2019). De manière assez surprenante, une étude a retrouvé une sous-expression du transcrite *Eomes*, ainsi que de *Tbet*, chez des patients SEP par rapport à des témoins sains (Parnell *et al.*, 2014). Cependant, cette analyse avait été effectuée au sein des cellules du sang total et ne s'intéressait pas aux différences concernant des populations immunes particulières comme les LT CD4⁺. Par ailleurs, l'expression d'Eomes par les LT CD4⁺ a également été mise en évidence comme antagoniste de l'expression de Foxp3 et donc du développement de Tregs (Lupar *et al.*, 2015). Ainsi, une étude a pu montrer que le transfert adoptif de LT CD4⁺ déficients en Eomes à des souris après induction d'une EAE permettait de mieux résister à la maladie que le transfert de LT CD4⁺ contrôles, soulignant un possible rôle pathogénique d'Eomes dans la neuro-inflammation (Lupar *et al.*, 2015). Enfin, Raveney *et al.* ont montré l'importance des LT CD4⁺ Eomes⁺ dans des modèles chroniques d'EAE (Raveney *et al.*, 2015). En effet, ces travaux montrent que les LT CD4⁺ exprimant Eomes ont un profil pro-inflammatoire et sont pathogènes dans l'EAE par une cytotoxicité médiée par la sécrétion de granzyme B. Chez l'homme, ces LT CD4⁺ Eomes⁺ ont été retrouvés enrichis en périphérie et au sein de lésions du SNC de patients de forme SP, suggérant leur implication dans la progression de la maladie (Raveney *et al.*, 2015, 2021).

Ainsi, au regard des données de la littérature, l'identification d'une surexpression du gène *Eomes* par les Tfh infiltrant le LCR des patients SEP suggère que les Tfh exprimant Eomes pourrait constituer une population de Tfh1 aux fonctions pro-inflammatoires et cytotoxiques importantes dans la maladie et probablement dans l'évolution vers la progression de la maladie. L'entrée dans la phase progressive de la SEP est à ce jour encore peu comprise, mais constitue un véritable enjeu thérapeutique pour l'avenir car il y a toujours à l'heure actuelle un manque de traitements limitant la progression de la maladie et du handicap. Le rôle des LB et des TLT semblant important dans cette phase progressive de la maladie, nous pouvons penser que les Tfh, si comme nous l'observons, sont impliqués dès les phases précoces de la maladie, ont un rôle clé dans la formation des TLT et potentiellement dans la phase progressive de la maladie. Des études plus approfondies sur l'implication de cette population de Tfh Eomes⁺ ainsi que du rôle de la signalisation de l'IL-12 seront nécessaires pour mieux comprendre leur rôle dans la physiopathologie de la maladie et déterminer leur importance dans la forme progressive de la SEP.

Une hypothèse du rôle des Tfh dans la physiopathologie de la SEP est illustrée dans la figure 9.

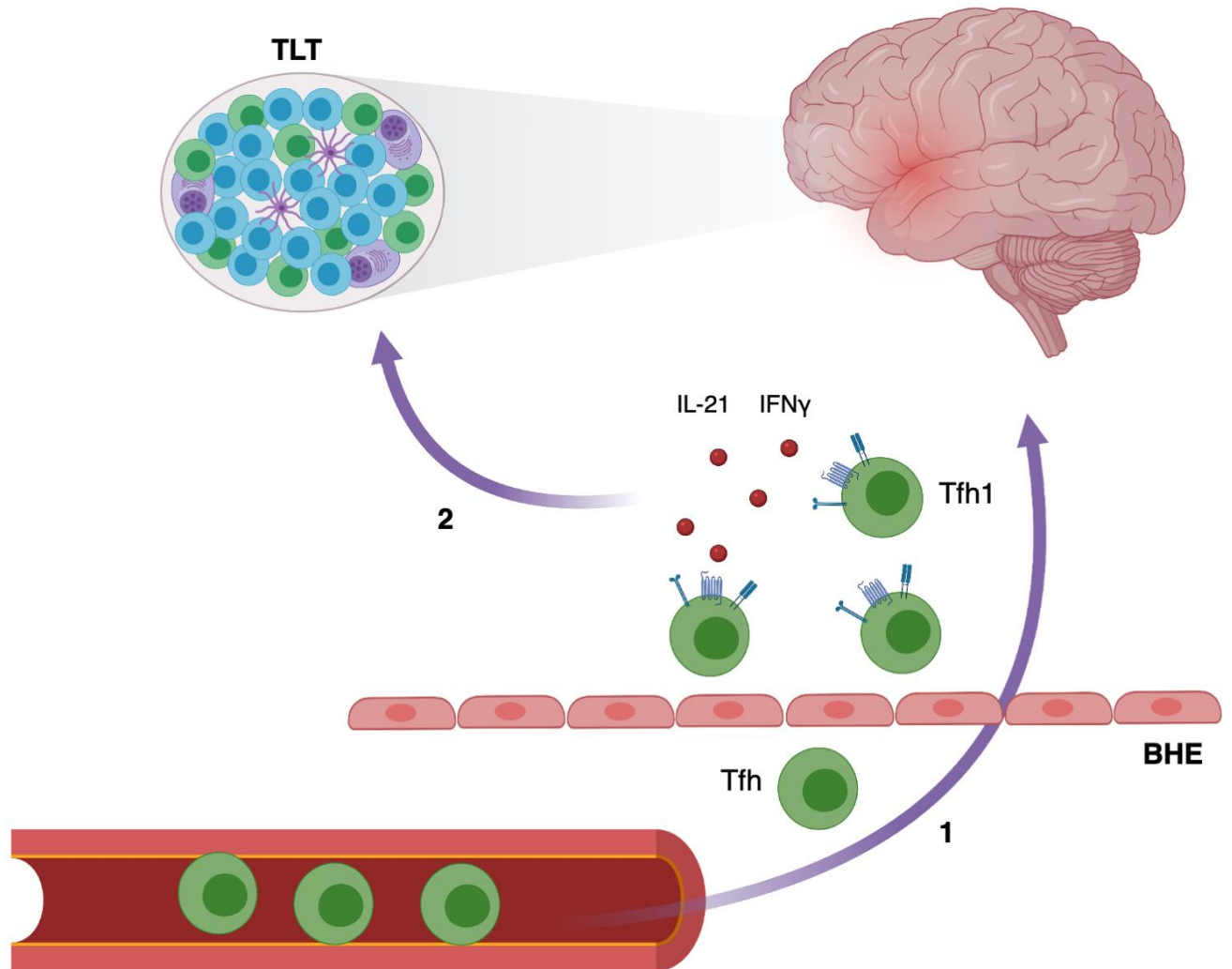


Figure 9 : Hypothèse sur le rôle des Tfh dans la physiopathologie de la SEP.

Les Tfh circulants sont divisés en plusieurs populations (Tfh1, Tfh2, 1fh17). Les Tfh1 sont décrits comme étant inaptes à aider la différenciation de LB naïfs mais les plus compétents pour promouvoir la réactivation et différenciation de LB mémoires. Nos données nous font suggérer que dans la SEP, les Tfh1 ont une capacité de migration vers le SNC importante, Ces cellules pourraient ainsi franchir la BHE (1) et infiltrer le SNC des patients où elles sécrèteraient des cytokines pro-inflammatoires tels que l'IFN γ ou IL-21 favorisant la formation de TLT (2). La formation de TLT étant associée à la progression de la maladie et un handicap plus sévère, les Tfh1 pourraient ainsi avoir un rôle clé dans la phase progressive de la maladie. Cette figure a été réalisée à l'aide de BioRender.

Références

- Abdelhak, A., Hottenrott, T., Mayer, C., Hintereder, G., Zettl, U.K., Stich, O., and Tumani, H. (2017). CSF profile in primary progressive multiple sclerosis: Re-exploring the basics. *PLoS One* *12*, e0182647.
- Aguzzi, A., Kranich, J., and Krautler, N.J. (2014). Follicular dendritic cells: origin, phenotype, and function in health and disease. *Trends Immunol* *35*, 105–113.
- Andersson, M., Alvarez-Cermeño, J., Bernardi, G., Cogato, I., Fredman, P., Frederiksen, J., Fredrikson, S., Gallo, P., Grimaldi, L.M., and Grønning, M. (1994). Cerebrospinal fluid in the diagnosis of multiple sclerosis: a consensus report. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* *57*, 897–902.
- Annibaldi, V., Ristori, G., Angelini, D.F., Serafini, B., Mechelli, R., Cannoni, S., Romano, S., Paolillo, A., Abderrahim, H., Diamantini, A., et al. (2011). CD161(high)CD8+T cells bear pathogenetic potential in multiple sclerosis. *Brain* *134*, 542–554.
- Annunziata, P., Giorgio, A., De Santi, L., Zipoli, V., Portaccio, E., Amato, M.P., Clerici, R., Scarpini, E., Moscato, G., Iudice, A., et al. (2006). Absence of cerebrospinal fluid oligoclonal bands is associated with delayed disability progression in relapsing-remitting MS patients treated with interferon-beta. *J Neurol Sci* *244*, 97–102.
- Ascherio, A., and Munger, K. (2016). Epidemiology of Multiple Sclerosis: From Risk Factors to Prevention—An Update. *Semin Neurol* *36*, 103–114.
- Astier, A.L., Meiffren, G., Freeman, S., and Hafler, D.A. (2006). Alterations in CD46-mediated Tr1 regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. *J Clin Invest* *116*, 3252–3257.
- Babbe, H., Roers, A., Waisman, A., Lassmann, H., Goebels, N., Hohlfeld, R., Friese, M., Schröder, R., Deckert, M., Schmidt, S., et al. (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.M., Costantino, C.M., Cvetanovich, G.L., Ashley, C.W., Beriou, G., Dominguez-Villar, M., and Hafler, D.A. (2011). CD2 costimulation reveals defective activity by human CD4+CD25(hi) regulatory cells in patients with multiple sclerosis. *J Immunol* *186*, 3317–3326.
- Barnett, M.H., and Prineas, J.W. (2004). Relapsing and remitting multiple sclerosis: pathology of the newly forming lesion. *Ann Neurol* *55*, 458–468.
- Barnett, M.H., Parratt, J.D.E., Cho, E.-S., and Prineas, J.W. (2009). Immunoglobulins and complement in postmortem multiple sclerosis tissue. *Ann Neurol* *65*, 32–46.
- Bar-Or, A., Calabresi, P.A.J., Arnold, D., Arnlod, D., Markowitz, C., Shafer, S., Kasper, L.H., Waubant, E., Gazda, S., Fox, R.J., et al. (2008). Rituximab in relapsing-remitting multiple sclerosis: a 72-week, open-label, phase I trial. *Ann Neurol* *63*, 395–400.

- Bar-Or, A., Fawaz, L., Fan, B., Darlington, P.J., Rieger, A., Ghorayeb, C., Calabresi, P.A., Waubant, E., Hauser, S.L., Zhang, J., et al. (2010). Abnormal B-cell cytokine responses a trigger of T-cell-mediated disease in MS? *Ann Neurol* 67, 452–461.
- Bar-Or, A., Grove, R., Austin, D., Tolson, J., Vanmeter, S., Lewis, E., and Sorensen, P.S. (2014). The MIRROR Study: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Parallel-Group, Dose-Ranging Study to Investigate the Safety and MRI Efficacy of Subcutaneous Ofatumumab in Subjects with Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis (RRMS) (S23.006). *Neurology* 82, S23.006.
- Bar-Or, A., Grove, R.A., Austin, D.J., Tolson, J.M., VanMeter, S.A., Lewis, E.W., Derosier, F.J., Lopez, M.C., Kavanagh, S.T., Miller, A.E., et al. (2018). Subcutaneous ofatumumab in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis: The MIRROR study. *Neurology* 90, e1805–e1814.
- Barr, T.A., Shen, P., Brown, S., Lampropoulou, V., Roch, T., Lawrie, S., Fan, B., O'Connor, R.A., Anderton, S.M., Bar-Or, A., et al. (2012). B cell depletion therapy ameliorates autoimmune disease through ablation of IL-6-producing B cells. *J Exp Med* 209, 1001–1010.
- Batista, F.D., and Harwood, N.E. (2009). The who, how and where of antigen presentation to B cells. *Nat Rev Immunol* 9, 15–27.
- Battella, S., Cox, M.C., Santoni, A., and Palmieri, G. (2016). Natural killer (NK) cells and anti-tumor therapeutic mAb: unexplored interactions. *J Leukoc Biol* 99, 87–96.
- Bell, L., Lenhart, A., Rosenwald, A., Monoranu, C.M., and Berberich-Siebelt, F. (2020). Lymphoid Aggregates in the CNS of Progressive Multiple Sclerosis Patients Lack Regulatory T Cells. *Front. Immunol.* 10, 3090.
- Beltrán, E., Gerdes, L.A., Hansen, J., Flierl-Hecht, A., Krebs, S., Blum, H., Ertl-Wagner, B., Barkhof, F., Kümpfel, T., Hohlfeld, R., et al. (2019). Early adaptive immune activation detected in monozygotic twins with prodromal multiple sclerosis. *J Clin Invest* 129, 4758–4768.
- Bentebibel, S.-E., Lopez, S., Obermoser, G., Schmitt, N., Mueller, C., Harrod, C., Flano, E., Mejias, A., Albrecht, R.A., Blankenship, D., et al. (2013). Induction of ICOS+CXCR3+CXCR5+ TH Cells Correlates with Antibody Responses to Influenza Vaccination. *Science Translational Medicine* 5, 176ra32-176ra32.
- Beriou, G., Costantino, C.M., Ashley, C.W., Yang, L., Kuchroo, V.K., Baecher-Allan, C., and Hafler, D.A. (2009). IL-17-producing human peripheral regulatory T cells retain suppressive function. *Blood* 113, 4240–4249.
- Bettelli, E., Sullivan, B., Szabo, S.J., Sobel, R.A., Glimcher, L.H., and Kuchroo, V.K. (2004). Loss of T-bet, but not STAT1, prevents the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med* 200, 79–87.
- Bielekova, B., Catalfamo, M., Reichert-Scrivner, S., Packer, A., Cerna, M., Waldmann, T.A., McFarland, H., Henkart, P.A., and Martin, R. (2006). Regulatory CD56(bright) natural killer cells mediate immunomodulatory effects of IL-2Ralpha-targeted therapy (daclizumab) in multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 5941–5946.

- Blauth, K., Soltys, J., Matschulat, A., Reiter, C.R., Ritchie, A., Baird, N.L., Bennett, J.L., and Owens, G.P. (2015). Antibodies produced by clonally expanded plasma cells in multiple sclerosis cerebrospinal fluid cause demyelination of spinal cord explants. *Acta Neuropathol* 130, 765–781.
- Bö, L., Mörk, S., Kong, P.A., Nyland, H., Pardo, C.A., and Trapp, B.D. (1994). Detection of MHC class II-antigens on macrophages and microglia, but not on astrocytes and endothelia in active multiple sclerosis lesions. *J Neuroimmunol* 51, 135–146.
- Bombardieri, M., Lewis, M., and Pitzalis, C. (2017). Ectopic lymphoid neogenesis in rheumatic autoimmune diseases. *Nat Rev Rheumatol* 13, 141–154.
- Brändle, S.M., Obermeier, B., Senel, M., Bruder, J., Mentele, R., Khademi, M., Olsson, T., Tumani, H., Kristoferitsch, W., Lottspeich, F., et al. (2016). Distinct oligoclonal band antibodies in multiple sclerosis recognize ubiquitous self-proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113, 7864–7869.
- Brennan, K.M., Galban-Horcajo, F., Rinaldi, S., O’Leary, C.P., Goodyear, C.S., Kalna, G., Arthur, A., Elliot, C., Barnett, S., Linington, C., et al. (2011). Lipid arrays identify myelin-derived lipids and lipid complexes as prominent targets for oligoclonal band antibodies in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 238, 87–95.
- Brickshawana, A., Hinson, S.R., Romero, M.F., Lucchinetti, C.F., Guo, Y., Buttmann, M., McKeon, A., Pittock, S.J., Chang, M.-H., Chen, A.-P., et al. (2014). Investigation of the KIR4.1 potassium channel as a putative antigen in patients with multiple sclerosis: a comparative study. *Lancet Neurol* 13, 795–806.
- Browne, P., Chandraratna, D., Angood, C., Tremlett, H., Baker, C., Taylor, B.V., and Thompson, A.J. (2014). Atlas of Multiple Sclerosis 2013: A growing global problem with widespread inequity. *Neurology* 83, 1022–1024.
- von Büdingen, H.-C., Harrer, M.D., Kuenzle, S., Meier, M., and Goebels, N. (2008). Clonally expanded plasma cells in the cerebrospinal fluid of MS patients produce myelin-specific antibodies. *Eur J Immunol* 38, 2014–2023.
- von Büdingen, H.-C., Gulati, M., Kuenzle, S., Fischer, K., Rupprecht, T.A., and Goebels, N. (2010). Clonally expanded plasma cells in the cerebrospinal fluid of patients with central nervous system autoimmune demyelination produce “oligoclonal bands.” *J Neuroimmunol* 218, 134–139.
- von Büdingen, H.-C., Kuo, T.C., Sirota, M., van Belle, C.J., Apeltsin, L., Glanville, J., Cree, B.A., Gourraud, P.-A., Schwartzburg, A., Huerta, G., et al. (2012). B cell exchange across the blood-brain barrier in multiple sclerosis. *J Clin Invest* 122, 4533–4543.
- Bunker, J.J., and Bendelac, A. (2018). IgA Responses to Microbiota. *Immunity* 49, 211–224.
- Calabrese, M., Filippi, M., and Gallo, P. (2010). Cortical lesions in multiple sclerosis. *Nat Rev Neurol* 6, 438–444.
- Cencioni, M.T., Ali, R., Nicholas, R., and Muraro, P.A. (2020). Defective CD19+CD24hiCD38hi transitional B-cell function in patients with relapsing-remitting MS. *Mult Scler* 1352458520951536.

- Cepok, S., Jacobsen, M., Schock, S., Omer, B., Jaekel, S., Bøddeker, I., Oertel, W.H., Sommer, N., and Hemmer, B. (2001). Patterns of cerebrospinal fluid pathology correlate with disease progression in multiple sclerosis. *Brain* *124*, 2169–2176.
- Cepok, S., Rosche, B., Grummel, V., Vogel, F., Zhou, D., Sayn, J., Sommer, N., Hartung, H.-P., and Hemmer, B. (2005). Short-lived plasma blasts are the main B cell effector subset during the course of multiple sclerosis. *Brain* *128*, 1667–1676.
- Chastre, A., Hafler, D.A., and O'Connor, K.C. (2016). Evaluation of KIR4.1 as an Immune Target in Multiple Sclerosis. *N Engl J Med* *374*, 1495–1496.
- Chesneau, M., Pallier, A., Braza, F., Lacombe, G., Le Gallou, S., Baron, D., Giral, M., Danger, R., Guerif, P., Aubert-Wastiaux, H., et al. (2014). Unique B cell differentiation profile in tolerant kidney transplant patients. *Am J Transplant* *14*, 144–155.
- Chiu, M.L., Goulet, D.R., Teplyakov, A., and Gilliland, G.L. (2019). Antibody Structure and Function: The Basis for Engineering Therapeutics. *Antibodies (Basel)* *8*.
- Choi, S.R., Howell, O.W., Carassiti, D., Magliozzi, R., Gveric, D., Muraro, P.A., Nicholas, R., Roncaroli, F., and Reynolds, R. (2012). Meningeal inflammation plays a role in the pathology of primary progressive multiple sclerosis. *Brain* *135*, 2925–2937.
- Corcione, A., Casazza, S., Ferretti, E., Giunti, D., Zappia, E., Pistorio, A., Gambini, C., Mancardi, G.L., Uccelli, A., and Pistoia, V. (2004). Recapitulation of B cell differentiation in the central nervous system of patients with multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* *101*, 11064–11069.
- Crotty, S. (2011). Follicular Helper CD4 T Cells (T_{FH}). *Annu. Rev. Immunol.* *29*, 621–663.
- Crotty, S. (2014). T Follicular Helper Cell Differentiation, Function, and Roles in Disease. *Immunity* *41*, 529–542.
- Crotty, S. (2019). T Follicular Helper Cell Biology: A Decade of Discovery and Diseases. *Immunity* *50*, 1132–1148.
- Cunill, V., Massot, M., Clemente, A., Calles, C., Andreu, V., Núñez, V., López-Gómez, A., Díaz, R.M., Jiménez, M. de los R., Pons, J., et al. (2018). Relapsing–Remitting Multiple Sclerosis Is Characterized by a T Follicular Cell Pro-Inflammatory Shift, Reverted by Dimethyl Fumarate Treatment. *Front. Immunol.* *9*, 1097.
- Cyster, J.G., and Allen, C.D.C. (2019). B Cell Responses: Cell Interaction Dynamics and Decisions. *Cell* *177*, 524–540.
- Daha, N.A., Banda, N.K., Roos, A., Beurskens, F.J., Bakker, J.M., Daha, M.R., and Trouw, L.A. (2011). Complement activation by (auto-) antibodies. *Molecular Immunology* *48*, 1656–1665.
- Dasgupta, S., Dasgupta, S., and Bandyopadhyay, M. (2020). Regulatory B cells in infection, inflammation, and autoimmunity. *Cell Immunol* *352*, 104076.
- De Silva, N.S., and Klein, U. (2015). Dynamics of B cells in germinal centres. *Nat Rev Immunol* *15*, 137–148.

- Degelman, M.L., and Herman, K.M. (2017). Smoking and multiple sclerosis: A systematic review and meta-analysis using the Bradford Hill criteria for causation. *Multiple Sclerosis and Related Disorders* 17, 207–216.
- Dettke, M., Scheidt, P., Prange, H., and Kirchner, H. (1997). Correlation between interferon production and clinical disease activity in patients with multiple sclerosis. *J Clin Immunol* 17, 293–300.
- Dhaeze, T., Peelen, E., Hombrouck, A., Peeters, L., Van Wijmeersch, B., Lemkens, N., Lemkens, P., Somers, V., Lucas, S., Broux, B., et al. (2015). Circulating Follicular Regulatory T Cells Are Defective in Multiple Sclerosis. *J.I.* 195, 832–840.
- Domeier, P.P., Chodisetti, S.B., Soni, C., Schell, S.L., Elias, M.J., Wong, E.B., Cooper, T.K., Kitamura, D., and Rahman, Z.S.M. (2016). IFN- γ receptor and STAT1 signaling in B cells are central to spontaneous germinal center formation and autoimmunity. *Journal of Experimental Medicine* 213, 715–732.
- Dominguez-Villar, M., Baecher-Allan, C.M., and Hafler, D.A. (2011). Identification of T helper type 1–like, Foxp3+ regulatory T cells in human autoimmune disease. *Nat Med* 17, 673–675.
- Duddy, M., Niino, M., Adatia, F., Hebert, S., Freedman, M., Atkins, H., Kim, H.J., and Bar-Or, A. (2007). Distinct effector cytokine profiles of memory and naive human B cell subsets and implication in multiple sclerosis. *J Immunol* 178, 6092–6099.
- Durelli, L., Conti, L., Clerico, M., Boselli, D., Contessa, G., Ripellino, P., Ferrero, B., Eid, P., and Novelli, F. (2009). T-helper 17 cells expand in multiple sclerosis and are inhibited by interferon-beta. *Ann Neurol* 65, 499–509.
- Eggers, E.L., Michel, B.A., Wu, H., Wang, S.-Z., Bevan, C.J., Abounasr, A., Pierson, N.S., Bischof, A., Kazer, M., Leitner, E., et al. (2017). Clonal relationships of CSF B cells in treatment-naive multiple sclerosis patients. *JCI Insight* 2.
- Eshima, K., Chiba, S., Suzuki, H., Kokubo, K., Kobayashi, H., Iizuka, M., Iwabuchi, K., and Shinohara, N. (2012). Ectopic expression of a T-box transcription factor, eomesodermin, renders CD4(+) Th cells cytotoxic by activating both perforin- and FasL-pathways. *Immunol Lett* 144, 7–15.
- Esiri, M.M. (1980). Multiple sclerosis: a quantitative and qualitative study of immunoglobulin-containing cells in the central nervous system. *Neuropathol Appl Neurobiol* 6, 9–21.
- Fan, X., Jin, T., Zhao, S., Liu, C., Han, J., Jiang, X., and Jiang, Y. (2015). Circulating CCR7+ICOS+ Memory T Follicular Helper Cells in Patients with Multiple Sclerosis. *PLoS ONE* 10, e0134523.
- Farina, G., Magliozzi, R., Pitteri, M., Reynolds, R., Rossi, S., Gajofatto, A., Benedetti, M.D., Facchiano, F., Monaco, S., and Calabrese, M. (2017). Increased cortical lesion load and intrathecal inflammation is associated with oligoclonal bands in multiple sclerosis patients: a combined CSF and MRI study. *J Neuroinflammation* 14, 40.
- Fehres, C.M., van Uden, N.O., Yeremenko, N.G., Fernandez, L., Franco Salinas, G., van Duivenvoorde, L.M., Huard, B., Morel, J., Spits, H., Hahne, M., et al. (2019). APRIL Induces

- a Novel Subset of IgA+ Regulatory B Cells That Suppress Inflammation via Expression of IL-10 and PD-L1. *Front Immunol* 10, 1368.
- Feng, Y., Seija, N., Di Noia, J.M., and Martin, A. (2020). AID in Antibody Diversification: There and Back Again. *Trends Immunol* 41, 586–600.
- Ferraro, D., Galli, V., Vitetta, F., Simone, A.M., Bedin, R., Del Giovane, C., Morselli, F., Filippini, M.M., Nichelli, P.F., and Sola, P. (2015). Cerebrospinal fluid CXCL13 in clinically isolated syndrome patients: Association with oligoclonal IgM bands and prediction of Multiple Sclerosis diagnosis. *J Neuroimmunol* 283, 64–69.
- Fillatreau, S. (2018). Natural regulatory plasma cells. *Curr Opin Immunol* 55, 62–66.
- Fogdell-Hahn, A., Ligers, A., Grønning, M., Hillert, J., and Olerup, O. (2000). Multiple sclerosis: a modifying influence of HLA class I genes in an HLA class II associated autoimmune disease. *Tissue Antigens* 55, 140–148.
- Fraussen, J., Claes, N., Van Wijmeersch, B., van Horsen, J., Stinissen, P., Hupperts, R., and Somers, V. (2016). B cells of multiple sclerosis patients induce autoreactive proinflammatory T cell responses. *Clin Immunol* 173, 124–132.
- Frischer, J.M., Bramow, S., Dal-Bianco, A., Lucchinetti, C.F., Rauschka, H., Schmidbauer, M., Laursen, H., Sorensen, P.S., and Lassmann, H. (2009). The relation between inflammation and neurodegeneration in multiple sclerosis brains. *Brain* 132, 1175–1189.
- Frisullo, G., Nociti, V., Iorio, R., Patanella, A.K., Caggiula, M., Marti, A., Sancricca, C., Angelucci, F., Mirabella, M., Tonali, P.A., et al. (2009). Regulatory T cells fail to suppress CD4T⁺-bet⁺ T cells in relapsing multiple sclerosis patients. *Immunology* 127, 418–428.
- Galli, E., Hartmann, F.J., Schreiner, B., Ingelfinger, F., Arvaniti, E., Diebold, M., Mrdjen, D., van der Meer, F., Krieg, C., Nimer, F.A., et al. (2019). GM-CSF and CXCR4 define a T helper cell signature in multiple sclerosis. *Nat Med* 25, 1290–1300.
- Gasperi, C., Salmen, A., Antony, G., Bayas, A., Heesen, C., Kümpfel, T., Linker, R.A., Paul, F., Stangel, M., Tackenberg, B., et al. (2019). Association of Intrathecal Immunoglobulin G Synthesis With Disability Worsening in Multiple Sclerosis. *JAMA Neurol* 76, 841–849.
- Geginat, J., Paroni, M., Pagani, M., Galimberti, D., De Francesco, R., Scarpini, E., and Abrignani, S. (2017). The Enigmatic Role of Viruses in Multiple Sclerosis: Molecular Mimicry or Disturbed Immune Surveillance? *Trends in Immunology* 38, 498–512.
- Genç, K., Dona, D.L., and Reder, A.T. (1997). Increased CD80(+) B cells in active multiple sclerosis and reversal by interferon beta-1b therapy. *J Clin Invest* 99, 2664–2671.
- Gensous, N., Charrier, M., Duluc, D., Contin-Bordes, C., Truchetet, M.-E., Lazaro, E., Duffau, P., Blanco, P., and Richez, C. (2018). T Follicular Helper Cells in Autoimmune Disorders. *Front Immunol* 9, 1637.
- Graner, M., Pointon, T., Manton, S., Green, M., Dennison, K., Davis, M., Braiotta, G., Craft, J., Edwards, T., Polonsky, B., et al. (2020). Oligoclonal IgG antibodies in multiple sclerosis target patient-specific peptides. *PLoS One* 15, e0228883.

- Greenfield, A.L., Dandekar, R., Ramesh, A., Eggers, E.L., Wu, H., Laurent, S., Harkin, W., Pierson, N.S., Weber, M.S., Henry, R.G., et al. (2019). Longitudinally persistent cerebrospinal fluid B cells can resist treatment in multiple sclerosis. *JCI Insight* 4.
- Guerrier, T., Labalette, M., Launay, D., Lee-Chang, C., Outteryck, O., Lefèvre, G., Vermersch, P., Dubucquoi, S., and Zéphir, H. (2018). Proinflammatory B-cell profile in the early phases of MS predicts an active disease. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm* 5, e431.
- Guo, J., Zhao, C., Wu, F., Tao, L., Zhang, C., Zhao, D., Yang, S., Jiang, D., Wang, J., Sun, Y., et al. (2018). T Follicular Helper-Like Cells Are Involved in the Pathogenesis of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *Front Immunol* 9, 944.
- Haas, J., Hug, A., Viehöver, A., Fritzsching, B., Falk, C.S., Filser, A., Vetter, T., Milkova, L., Korporal, M., Fritz, B., et al. (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, 3343–3352.
- Haider, L., Zrzavy, T., Hametner, S., Höftberger, R., Bagnato, F., Grabner, G., Trattinig, S., Pfeifenbring, S., Brück, W., and Lassmann, H. (2016). The topography of demyelination and neurodegeneration in the multiple sclerosis brain. *Brain* 139, 807–815.
- Hansen, I.S., Baeten, D.L.P., and den Dunnen, J. (2019). The inflammatory function of human IgA. *Cell Mol Life Sci* 76, 1041–1055.
- Harp, C.T., Lovett-Racke, A.E., Racke, M.K., Frohman, E.M., and Monson, N.L. (2008). Impact of myelin-specific antigen presenting B cells on T cell activation in multiple sclerosis. *Clin Immunol* 128, 382–391.
- Harp, C.T., Ireland, S., Davis, L.S., Remington, G., Cassidy, B., Cravens, P.D., Stuve, O., Lovett-Racke, A.E., Eagar, T.N., Greenberg, B.M., et al. (2010). Memory B cells from a subset of treatment-naïve relapsing-remitting multiple sclerosis patients elicit CD4(+) T-cell proliferation and IFN- γ production in response to myelin basic protein and myelin oligodendrocyte glycoprotein. *Eur J Immunol* 40, 2942–2956.
- Harriman, G.R., Kunimoto, D.Y., Elliott, J.F., Paetkau, V., and Strober, W. (1988). The role of IL-5 in IgA B cell differentiation. *J Immunol* 140, 3033–3039.
- Hashiguchi, M., Kashiwakura, Y., Kanno, Y., Kojima, H., and Kobata, T. (2020). IL-21 and IL-5 coordinately induce surface IgA+ cells. *Immunol Lett* 224, 21–27.
- Hauser, S.L., Bhan, A.K., Gilles, F., Kemp, M., Kerr, C., and Weiner, H.L. (1986). Immunohistochemical analysis of the cellular infiltrate in multiple sclerosis lesions. *Ann Neurol* 19, 578–587.
- Hauser, S.L., Waubant, E., Arnold, D.L., Vollmer, T., Antel, J., Fox, R.J., Bar-Or, A., Panzara, M., Sarkar, N., Agarwal, S., et al. (2008). B-cell depletion with rituximab in relapsing-remitting multiple sclerosis. *N Engl J Med* 358, 676–688.
- Hauser, S.L., Bar-Or, A., Comi, G., Giovannoni, G., Hartung, H.-P., Hemmer, B., Lublin, F., Montalban, X., Rammohan, K.W., Selmaj, K., et al. (2017). Ocrelizumab versus Interferon Beta-1a in Relapsing Multiple Sclerosis. *N Engl J Med* 376, 221–234.

- Hauser, S.L., Bar-Or, A., Cohen, J.A., Comi, G., Correale, J., Coyle, P.K., Cross, A.H., de Seze, J., Leppert, D., Montalban, X., et al. (2020). Ofatumumab versus Teriflunomide in Multiple Sclerosis. *N Engl J Med* 383, 546–557.
- Havrdová, E., Belova, A., Goloborodko, A., Tisserant, A., Wright, A., Wallstroem, E., Garren, H., Maguire, R.P., and Johns, D.R. (2016). Activity of secukinumab, an anti-IL-17A antibody, on brain lesions in RRMS: results from a randomized, proof-of-concept study. *J Neurol* 263, 1287–1295.
- Hedström, A.K., Olsson, T., and Alfredsson, L. (2012). High body mass index before age 20 is associated with increased risk for multiple sclerosis in both men and women. *Mult Scler* 18, 1334–1336.
- Heesters, B.A., Myers, R.C., and Carroll, M.C. (2014). Follicular dendritic cells: dynamic antigen libraries. *Nat Rev Immunol* 14, 495–504.
- Hiraoka, N., Ino, Y., and Yamazaki-Itoh, R. (2016). Tertiary Lymphoid Organs in Cancer Tissues. *Front Immunol* 7, 244.
- Hirota, K., Duarte, J.H., Veldhoen, M., Hornsby, E., Li, Y., Cua, D.J., Ahlfors, H., Wilhelm, C., Tolaini, M., Menzel, U., et al. (2011). Fate mapping of IL-17-producing T cells in inflammatory responses. *Nat Immunol* 12, 255–263.
- Howell, O.W., Reeves, C.A., Nicholas, R., Carassiti, D., Radotra, B., Gentleman, S.M., Serafini, B., Aloisi, F., Roncaroli, F., Magliozzi, R., et al. (2011). Meningeal inflammation is widespread and linked to cortical pathology in multiple sclerosis. *Brain* 134, 2755–2771.
- Huang, Y.M., Xiao, B.G., Ozenci, V., Kouwenhoven, M., Teleshova, N., Fredrikson, S., and Link, H. (1999). Multiple sclerosis is associated with high levels of circulating dendritic cells secreting pro-inflammatory cytokines. *J Neuroimmunol* 99, 82–90.
- Huber, J.E., Chang, Y., Meinl, I., Kümpfel, T., Meinl, E., and Baumjohann, D. (2020). Fingolimod Profoundly Reduces Frequencies and Alters Subset Composition of Circulating T Follicular Helper Cells in Multiple Sclerosis Patients. *J.I.* 204, 1101–1110.
- International Multiple Sclerosis Genetics Consortium (2007). Risk Alleles for Multiple Sclerosis Identified by a Genomewide Study. *N Engl J Med* 357, 851–862.
- International Multiple Sclerosis Genetics Consortium (2019). Multiple sclerosis genomic map implicates peripheral immune cells and microglia in susceptibility. *Science* 365, eaav7188.
- Jelicic, I., Al Nimer, F., Wang, J., Lentsch, V., Planas, R., Jelicic, I., Madjovski, A., Ruhrmann, S., Faigle, W., Frauenknecht, K., et al. (2018). Memory B Cells Activate Brain-Homing, Autoreactive CD4+ T Cells in Multiple Sclerosis. *Cell* 175, 85-100.e23.
- Joseph, F.G., Hirst, C.L., Pickersgill, T.P., Ben-Shlomo, Y., Robertson, N.P., and Scolding, N.J. (2009). CSF oligoclonal band status informs prognosis in multiple sclerosis: a case control study of 100 patients. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 80, 292–296.
- Junker, A., Ivanidze, J., Malotka, J., Eiglmeier, I., Lassmann, H., Wekerle, H., Meinl, E., Hohlfeld, R., and Dornmair, K. (2007). Multiple sclerosis: T-cell receptor expression in distinct brain regions. *Brain* 130, 2789–2799.

- Kappos, L., Li, D., Calabresi, P.A., O'Connor, P., Bar-Or, A., Barkhof, F., Yin, M., Leppert, D., Glanzman, R., Tinbergen, J., et al. (2011). Ocrelizumab in relapsing-remitting multiple sclerosis: a phase 2, randomised, placebo-controlled, multicentre trial. *Lancet* 378, 1779–1787.
- Kappos, L., Hartung, H.-P., Freedman, M.S., Boyko, A., Radü, E.W., Mikol, D.D., Lamarine, M., Hyvert, Y., Freudensprung, U., Plitz, T., et al. (2014). Atacicept in multiple sclerosis (ATAMS): a randomised, placebo-controlled, double-blind, phase 2 trial. *Lancet Neurol* 13, 353–363.
- Karni, A., Abraham, M., Monsonogo, A., Cai, G., Freeman, G.J., Hafler, D., Khoury, S.J., and Weiner, H.L. (2006). Innate immunity in multiple sclerosis: myeloid dendritic cells in secondary progressive multiple sclerosis are activated and drive a proinflammatory immune response. *J Immunol* 177, 4196–4202.
- Kebir, H., Kreymborg, K., Ifergan, I., Dodelet-Devillers, A., Cayrol, R., Bernard, M., Giuliani, F., Arbour, N., Becher, B., and Prat, A. (2007). Human TH17 lymphocytes promote blood-brain barrier disruption and central nervous system inflammation. *Nat Med* 13, 1173–1175.
- Kebir, H., Ifergan, I., Alvarez, J.I., Bernard, M., Poirier, J., Arbour, N., Duquette, P., and Prat, A. (2009). Preferential recruitment of interferon-gamma-expressing TH17 cells in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 66, 390–402.
- Khaibullin, T., Ivanova, V., Martynova, E., Cherepnev, G., Khabirov, F., Granatov, E., Rizvanov, A., and Khaiboullina, S. (2017). Elevated Levels of Proinflammatory Cytokines in Cerebrospinal Fluid of Multiple Sclerosis Patients. *Front Immunol* 8, 531.
- Kitz, A., Singer, E., and Hafler, D. (2018). Regulatory T Cells: From Discovery to Autoimmunity. *Cold Spring Harb Perspect Med* 8.
- Klein, A., Selter, R.C., Hapfelmeier, A., Berthele, A., Müller-Myhsok, B., Pongratz, V., Gasperi, C., Zimmer, C., Mühlau, M., and Hemmer, B. (2019). CSF parameters associated with early MRI activity in patients with MS. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm* 6, e573.
- Klinker, M.W., Reed, T.J., Fox, D.A., and Lundy, S.K. (2013). Interleukin-5 supports the expansion of fas ligand-expressing killer B cells that induce antigen-specific apoptosis of CD4(+) T cells and secrete interleukin-10. *PLoS One* 8, e70131.
- Knippenberg, S., Peelen, E., Smolders, J., Thewissen, M., Menheere, P., Cohen Tervaert, J.W., Hupperts, R., and Damoiseaux, J. (2011). Reduction in IL-10 producing B cells (Breg) in multiple sclerosis is accompanied by a reduced naïve/memory Breg ratio during a relapse but not in remission. *J Neuroimmunol* 239, 80–86.
- Koetzier, S.C., van Langelaar, J., Blok, K.M., van den Bosch, T.P.P., Wierenga-Wolf, A.F., Melief, M.-J., Pol, K., Siepmann, T.A., Verjans, G.M.G.M., Smolders, J., et al. (2020). Brain-homing CD4+ T cells display glucocorticoid-resistant features in MS. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm* 7.
- Kohm, A.P., Carpentier, P.A., Anger, H.A., and 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, 4712–4716.

- Krumbholz, M., Theil, D., Cepok, S., Hemmer, B., Kivisäkk, P., Ransohoff, R.M., Hofbauer, M., Farina, C., Derfuss, T., Hartle, C., et al. (2006). Chemokines in multiple sclerosis: CXCL12 and CXCL13 up-regulation is differentially linked to CNS immune cell recruitment. *Brain* *129*, 200–211.
- Kuerten, S., Lanz, T.V., Lingampalli, N., Lahey, L.J., Kleinschnitz, C., Mäurer, M., Schroeter, M., Braune, S., Ziemssen, T., Ho, P.P., et al. (2020). Autoantibodies against central nervous system antigens in a subset of B cell-dominant multiple sclerosis patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* *117*, 21512–21518.
- Kuhle, J., Pohl, C., Mehling, M., Edan, G., Freedman, M.S., Hartung, H.-P., Polman, C.H., Miller, D.H., Montalban, X., Barkhof, F., et al. (2007). Lack of association between antimyelin antibodies and progression to multiple sclerosis. *N Engl J Med* *356*, 371–378.
- Kuhlmann, T., Ludwin, S., Prat, A., Antel, J., Brück, W., and Lassmann, H. (2017). An updated histological classification system for multiple sclerosis lesions. *Acta Neuropathol* *133*, 13–24.
- Kumar, M., Putzki, N., Limmroth, V., Remus, R., Lindemann, M., Knop, D., Mueller, N., Hardt, C., Kreuzfelder, E., and Grosse-Wilde, H. (2006). CD4+CD25+FoxP3+ T lymphocytes fail to suppress myelin basic protein-induced proliferation in patients with multiple sclerosis. *Journal of Neuroimmunology* *180*, 178–184.
- Kurosaki, T., Kometani, K., and Ise, W. (2015). Memory B cells. *Nat Rev Immunol* *15*, 149–159.
- van Langelaar, J., van der Vuurst de Vries, R.M., Janssen, M., Wierenga-Wolf, A.F., Spilt, I.M., Siepman, T.A., Dankers, W., Verjans, G.M.G.M., de Vries, H.E., Lubberts, E., et al. (2018). T helper 17.1 cells associate with multiple sclerosis disease activity: perspectives for early intervention. *Brain* *141*, 1334–1349.
- van Langelaar, J., Rijvers, L., Janssen, M., Wierenga-Wolf, A.F., Melief, M.-J., Siepman, T.A., de Vries, H.E., Unger, P.-P.A., van Ham, S.M., Hintzen, R.Q., et al. (2019). Induction of brain-infiltrating T-bet-expressing B cells in multiple sclerosis. *Ann Neurol* *86*, 264–278.
- Langrish, C.L., Chen, Y., Blumenschein, W.M., Mattson, J., Basham, B., Sedgwick, J.D., McClanahan, T., Kastelein, R.A., and Cua, D.J. (2005). IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J Exp Med* *201*, 233–240.
- Lassmann, H., Raine, C.S., Antel, J., and Prineas, J.W. (1998). Immunopathology of multiple sclerosis: report on an international meeting held at the Institute of Neurology of the University of Vienna. *J Neuroimmunol* *86*, 213–217.
- Lassmann, H., Brück, W., and Lucchinetti, C.F. (2007). The immunopathology of multiple sclerosis: an overview. *Brain Pathol* *17*, 210–218.
- Le Gallou, S., Caron, G., Delaloy, C., Rossille, D., Tarte, K., and Fest, T. (2012). IL-2 requirement for human plasma cell generation: coupling differentiation and proliferation by enhancing MAPK-ERK signaling. *J Immunol* *189*, 161–173.
- Leary, S.M., McLean, B.N., and Thompson, E.J. (2000). Local synthesis of IgA in the cerebrospinal fluid of patients with neurological diseases. *J Neurol* *247*, 609–615.

- LeBien, T.W., and Tedder, T.F. (2008). B lymphocytes: how they develop and function. *Blood* 112, 1570–1580.
- Lee-Chang, C., Zéphir, H., Top, I., Dubucquoi, S., Trauet, J., Prin, L., and Vermersch, P. (2011). B-cell subsets up-regulate $\alpha 4$ integrin and accumulate in the cerebrospinal fluid in clinically isolated syndrome suggestive of multiple sclerosis onset. *Neurosci Lett* 487, 273–277.
- Li, R., Rezk, A., Miyazaki, Y., Hilgenberg, E., Touil, H., Shen, P., Moore, C.S., Michel, L., Althekair, F., Rajasekharan, S., et al. (2015). Proinflammatory GM-CSF-producing B cells in multiple sclerosis and B cell depletion therapy. *Sci Transl Med* 7, 310ra166.
- Li, R., Patterson, K.R., and Bar-Or, A. (2018). Reassessing B cell contributions in multiple sclerosis. *Nat Immunol* 19, 696–707.
- Li, Y., Jin, L., and Chen, T. (2020). The Effects of Secretory IgA in the Mucosal Immune System. *Biomed Res Int* 2020, 2032057.
- Lino, A.C., Dang, V.D., Lampropoulou, V., Welle, A., Joedicke, J., Pohar, J., Simon, Q., Thalmensi, J., Baures, A., Flühler, V., et al. (2018). LAG-3 Inhibitory Receptor Expression Identifies Immunosuppressive Natural Regulatory Plasma Cells. *Immunity* 49, 120-133.e9.
- Lisak, R.P., Nedelkoska, L., Benjamins, J.A., Schalk, D., Bealmear, B., Touil, H., Li, R., Muirhead, G., and Bar-Or, A. (2017). B cells from patients with multiple sclerosis induce cell death via apoptosis in neurons in vitro. *J Neuroimmunol* 309, 88–99.
- Lolli, F., Halawa, I., and Link, H. (1989). Intrathecal synthesis of IgG, IgA, IgM and IgD in untreated multiple sclerosis and controls. *Acta Neurol Scand* 80, 238–247.
- Lovato, L., Willis, S.N., Rodig, S.J., Caron, T., Almendinger, S.E., Howell, O.W., Reynolds, R., O'Connor, K.C., and Hafler, D.A. (2011). Related B cell clones populate the meninges and parenchyma of patients with multiple sclerosis. *Brain* 134, 534–541.
- Lublin, F.D., Reingold, S.C., and National Multiple Sclerosis Society (USA) Advisory Committee on Clinical Trials of New Agents in Multiple Sclerosis* (1996). Defining the clinical course of multiple sclerosis: Results of an international survey. *Neurology* 46, 907–911.
- Lublin, F.D., Reingold, S.C., Cohen, J.A., Cutter, G.R., Sorensen, P.S., Thompson, A.J., Wolinsky, J.S., Balcer, L.J., Banwell, B., Barkhof, F., et al. (2014). Defining the clinical course of multiple sclerosis: The 2013 revisions. *Neurology* 83, 278–286.
- Lucchinetti, C., Brück, W., Parisi, J., Scheithauer, B., Rodriguez, M., and Lassmann, H. (2000). Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination. *Ann Neurol* 47, 707–717.
- Lucchinetti, C.F., Popescu, B.F.G., Bunyan, R.F., Moll, N.M., Roemer, S.F., Lassmann, H., Brück, W., Parisi, J.E., Scheithauer, B.W., Giannini, C., et al. (2011). Inflammatory cortical demyelination in early multiple sclerosis. *N Engl J Med* 365, 2188–2197.
- Ludwin, S.K., Rao, V.T., Moore, C.S., and Antel, J.P. (2016). Astrocytes in multiple sclerosis. *Mult Scler* 22, 1114–1124.

- Lupar, E., Brack, M., Garnier, L., Laffont, S., Rauch, K.S., Schachtrup, K., Arnold, S.J., Guéry, J.-C., and Izcue, A. (2015). Eomesodermin Expression in CD4+ T Cells Restricts Peripheral Foxp3 Induction. *J Immunol* 195, 4742–4752.
- Machado-Santos, J., Saji, E., Tröscher, A.R., Paunovic, M., Liblau, R., Gabriely, G., Bien, C.G., Bauer, J., and Lassmann, H. (2018). The compartmentalized inflammatory response in the multiple sclerosis brain is composed of tissue-resident CD8+ T lymphocytes and B cells. *Brain* 141, 2066–2082.
- Macpherson, A.J., Yilmaz, B., Limenitakis, J.P., and Ganal-Vonarburg, S.C. (2018). IgA Function in Relation to the Intestinal Microbiota. *Annu Rev Immunol* 36, 359–381.
- Magliozzi, R., Howell, O., Vora, A., Serafini, B., Nicholas, R., Puopolo, M., Reynolds, R., and Aloisi, F. (2007). Meningeal B-cell follicles in secondary progressive multiple sclerosis associate with early onset of disease and severe cortical pathology. *Brain* 130, 1089–1104.
- Magliozzi, R., Howell, O.W., Reeves, C., Roncaroli, F., Nicholas, R., Serafini, B., Aloisi, F., and Reynolds, R. (2010). A Gradient of neuronal loss and meningeal inflammation in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 68, 477–493.
- Magliozzi, R., Howell, O.W., Nicholas, R., Cruciani, C., Castellaro, M., Romualdi, C., Rossi, S., Pitteri, M., Benedetti, M.D., Gajofatto, A., et al. (2018). Inflammatory intrathecal profiles and cortical damage in multiple sclerosis: Intrathecal Inflammation in MS. *Ann Neurol*. 83, 739–755.
- Magliozzi, R., Mazziotti, V., Montibeller, L., Pisani, A.I., Marastoni, D., Tamanti, A., Rossi, S., Crescenzo, F., and Calabrese, M. (2020). Cerebrospinal Fluid IgM Levels in Association With Inflammatory Pathways in Multiple Sclerosis Patients. *Front Cell Neurosci* 14, 569827.
- Mahajan, A., Herrmann, M., and Muñoz, L.E. (2016). Clearance Deficiency and Cell Death Pathways: A Model for the Pathogenesis of SLE. *Front Immunol* 7, 35.
- Martinez-Forero, I., Garcia-Munoz, R., Martinez-Pasamar, S., Inoges, S., Lopez-Diaz de Cerio, A., Palacios, R., Sepulcre, J., Moreno, B., Gonzalez, Z., Fernandez-Diez, B., et al. (2008). IL-10 suppressor activity and ex vivo Tr1 cell function are impaired in multiple sclerosis. *Eur J Immunol* 38, 576–586.
- Mathias, A., Perriard, G., Canales, M., Sonesson, C., Delorenzi, M., Schlupe, M., and Du Pasquier, R.A. (2017). Increased ex vivo antigen presentation profile of B cells in multiple sclerosis. *Mult Scler* 23, 802–809.
- Matsumoto, M., Baba, A., Yokota, T., Nishikawa, H., Ohkawa, Y., Kayama, H., Kallies, A., Nutt, S.L., Sakaguchi, S., Takeda, K., et al. (2014). Interleukin-10-producing plasmablasts exert regulatory function in autoimmune inflammation. *Immunity* 41, 1040–1051.
- Matusevicius, D., Kivisäkk, P., He, B., Kostulas, N., Ozenci, V., Fredrikson, S., and Link, H. (1999). Interleukin-17 mRNA expression in blood and CSF mononuclear cells is augmented in multiple sclerosis. *Mult Scler* 5, 101–104.
- Mazzoni, A., Maggi, L., Siracusa, F., Ramazzotti, M., Rossi, M.C., Santarlasci, V., Montaini, G., Capone, M., Rossetini, B., De Palma, R., et al. (2019). Eomes controls the development of Th17-derived (non-classic) Th1 cells during chronic inflammation. *Eur J Immunol* 49, 79–95.

- McGeachy, M.J., Stephens, L.A., and 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*, 3025–3032.
- McKinney, E.F., Cuthbertson, I., Harris, K.M., Smilek, D.E., Connor, C., Manferrari, G., Carr, E.J., Zamvil, S.S., and Smith, K.G.C. (2021). A CD8⁺ NK cell transcriptomic signature associated with clinical outcome in relapsing remitting multiple sclerosis. *Nat Commun* *12*, 635.
- McWilliam, O., Sellebjerg, F., Marquart, H.V., and von Essen, M.R. (2018). B cells from patients with multiple sclerosis have a pathogenic phenotype and increased LT α and TGF β 1 response. *J Neuroimmunol* *324*, 157–164.
- Michel, L., Berthelot, L., Pettré, S., Wiertlewski, S., Lefrère, F., Braudeau, C., Brouard, S., Soullillou, J.-P., and Laplaud, D.-A. (2008). Patients with relapsing-remitting multiple sclerosis have normal Treg function when cells expressing IL-7 receptor alpha-chain are excluded from the analysis. *J Clin Invest* *118*, 3411–3419.
- Michel, L., Chesneau, M., Manceau, P., Genty, A., Garcia, A., Salou, M., Elong Ngonu, A., Pallier, A., Jacq-Foucher, M., Lefrère, F., et al. (2014). Unaltered regulatory B-cell frequency and function in patients with multiple sclerosis. *Clin Immunol* *155*, 198–208.
- Michel, L., Grasmuck, C., Charabati, M., Lécuyer, M.-A., Zandee, S., Dhaeze, T., Alvarez, J.I., Li, R., Larouche, S., Bourbonnière, L., et al. (2019). Activated leukocyte cell adhesion molecule regulates B lymphocyte migration across central nervous system barriers. *Sci Transl Med* *11*.
- Montalban, X., Hauser, S.L., Kappos, L., Arnold, D.L., Bar-Or, A., Comi, G., de Seze, J., Giovannoni, G., Hartung, H.-P., Hemmer, B., et al. (2017). Ocrelizumab versus Placebo in Primary Progressive Multiple Sclerosis. *N Engl J Med* *376*, 209–220.
- Morita, R., Schmitt, N., Bentebibel, S.-E., Ranganathan, R., Bourdery, L., Zurawski, G., Foucat, E., Dullaers, M., Oh, S., Sabzghabaei, N., et al. (2011). Human blood CXCR5⁺CD4⁺ T cells are counterparts of T follicular cells and contain specific subsets that differentially support antibody secretion. *Immunity* *34*, 108–121.
- Moutsianas, L., Jostins, L., Beecham, A.H., Dilthey, A.T., Xifara, D.K., Ban, M., Shah, T.S., Patsopoulos, N.A., Alfredsson, L., Anderson, C.A., et al. (2015). Class II HLA interactions modulate genetic risk for multiple sclerosis. *Nat Genet* *47*, 1107–1113.
- Munger, K.L., Bentzen, J., Laursen, B., Stenager, E., Koch-Henriksen, N., Sørensen, T.I., and Baker, J.L. (2013). Childhood body mass index and multiple sclerosis risk: a long-term cohort study. *Mult Scler* *19*, 1323–1329.
- Nagata, S. (2018). Apoptosis and Clearance of Apoptotic Cells. *Annu Rev Immunol* *36*, 489–517.
- Naismith, R.T., Piccio, L., Lyons, J.A., Lauber, J., Tutlam, N.T., Parks, B.J., Trinkaus, K., Song, S.K., and Cross, A.H. (2010). Rituximab add-on therapy for breakthrough relapsing multiple sclerosis: a 52-week phase II trial. *Neurology* *74*, 1860–1867.
- Nath, N., Prasad, R., Giri, S., Singh, A.K., and Singh, I. (2006). T-bet is essential for the progression of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Immunology* *118*, 384–391.

- Nerrant, E., Salsac, C., Charif, M., Ayrignac, X., Carra-Dalliere, C., Castelnovo, G., Goulabchand, R., Tisseyre, J., Raoul, C., Eliaou, J.-F., et al. (2014). Lack of confirmation of anti-inward rectifying potassium channel 4.1 antibodies as reliable markers of multiple sclerosis. *Mult Scler* *20*, 1699–1703.
- Nicol, B., Salou, M., Vogel, I., Garcia, A., Dugast, E., Morille, J., Kilens, S., Charpentier, E., Donnart, A., Nedellec, S., et al. (2018). An intermediate level of CD161 expression defines a novel activated, inflammatory, and pathogenic subset of CD8+ T cells involved in multiple sclerosis. *J Autoimmun* *88*, 61–74.
- Nutt, S.L., Hodgkin, P.D., Tarlinton, D.M., and Corcoran, L.M. (2015). The generation of antibody-secreting plasma cells. *Nat Rev Immunol* *15*, 160–171.
- Obermeier, B., Mentele, R., Malotka, J., Kellermann, J., Kümpfel, T., Wekerle, H., Lottspeich, F., Hohlfeld, R., and Dornmair, K. (2008). Matching of oligoclonal immunoglobulin transcriptomes and proteomes of cerebrospinal fluid in multiple sclerosis. *Nat Med* *14*, 688–693.
- Okada, Y., Ochi, H., Fujii, C., Hashi, Y., Hamatani, M., Ashida, S., Kawamura, K., Kusaka, H., Matsumoto, S., Nakagawa, M., et al. (2018). Signaling via toll-like receptor 4 and CD40 in B cells plays a regulatory role in the pathogenesis of multiple sclerosis through interleukin-10 production. *J Autoimmun* *88*, 103–113.
- O’Loughlin, E., Madore, C., Lassmann, H., and Butovsky, O. (2018). Microglial Phenotypes and Functions in Multiple Sclerosis. *Cold Spring Harb Perspect Med* *8*.
- Owens, G.P., Wings, K.M., Ritchie, A.M., Edwards, S., Burgoon, M.P., Lehnhoff, L., Nielsen, K., Corboy, J., Gilden, D.H., and Bennett, J.L. (2007). VH4 gene segments dominate the intrathecal humoral immune response in multiple sclerosis. *J Immunol* *179*, 6343–6351.
- 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., et al. (2009). Antibodies produced by clonally expanded plasma cells in multiple sclerosis cerebrospinal fluid. *Ann Neurol* *65*, 639–649.
- Palanichamy, A., Apeltsin, L., Kuo, T.C., Sirota, M., Wang, S., Pitts, S.J., Sundar, P.D., Telman, D., Zhao, L.Z., Derstine, M., et al. (2014). Immunoglobulin class-switched B cells form an active immune axis between CNS and periphery in multiple sclerosis. *Sci Transl Med* *6*, 248ra106.
- Panitch, H.S., Hirsch, R.L., Haley, A.S., and Johnson, K.P. (1987). Exacerbations of multiple sclerosis in patients treated with gamma interferon. *Lancet* *1*, 893–895.
- Parnell, G.P., Gatt, P.N., Krupa, M., Nickles, D., McKay, F.C., Schibeci, S.D., Batten, M., Baranzini, S., Henderson, A., Barnett, M., et al. (2014). The autoimmune disease-associated transcription factors EOMES and TBX21 are dysregulated in multiple sclerosis and define a molecular subtype of disease. *Clin Immunol* *151*, 16–24.
- Petereit, H.F., Richter, N., Pukrop, R., and Bamborschke, S. (2000). Interferon gamma production in blood lymphocytes correlates with disability score in multiple sclerosis patients. *Mult Scler* *6*, 19–23.

- Piancone, F., Saresella, M., Marventano, I., La Rosa, F., Zoppis, M., Agostini, S., Longhi, R., Caputo, D., Mendozzi, L., Rovaris, M., et al. (2016). B Lymphocytes in Multiple Sclerosis: Bregs and BTLA/CD272 Expressing-CD19⁺ Lymphocytes Modulate Disease Severity. *Sci Rep* 6, 29699.
- Pieper, K., Grimbacher, B., and Eibel, H. (2013). B-cell biology and development. *J Allergy Clin Immunol* 131, 959–971.
- Pierrot-Deseilligny, C., and Souberbielle, J.-C. (2017). Vitamin D and multiple sclerosis: An update. *Multiple Sclerosis and Related Disorders* 14, 35–45.
- Planas, R., Santos, R., Tomas-Ojer, P., Cruciani, C., Lutterotti, A., Faigle, W., Schaeren-Wiemers, N., Espejo, C., Eixarch, H., Pinilla, C., et al. (2018). GDP-l-fucose synthase is a CD4⁺ T cell-specific autoantigen in DRB3*02:02 patients with multiple sclerosis. *Sci Transl Med* 10.
- Pollok, K., Mothes, R., Ulbricht, C., Liebheit, A., Gerken, J.D., Uhlmann, S., Paul, F., Niesner, R., Radbruch, H., and Hauser, A.E. (2017). The chronically inflamed central nervous system provides niches for long-lived plasma cells. *Acta Neuropathol Commun* 5, 88.
- Pröbstel, A.-K., Kuhle, J., Lecourt, A.-C., Vock, I., Sanderson, N.S.R., Kappos, L., and Derfuss, T. (2016). Multiple Sclerosis and Antibodies against KIR4.1. *N Engl J Med* 374, 1496–1498.
- Pröbstel, A.-K., Zhou, X., Baumann, R., Wischnewski, S., Kutza, M., Rojas, O.L., Sellrie, K., Bischof, A., Kim, K., Ramesh, A., et al. (2020). Gut microbiota-specific IgA⁺ B cells traffic to the CNS in active multiple sclerosis. *Sci Immunol* 5.
- Puthenparampil, M., Zito, A., Pantano, G., Federle, L., Stropparo, E., Miente, S., De Silvestro, G., Plebani, M., and Gallo, P. (2019). Peripheral imbalanced TFH/TFR ratio correlates with intrathecal IgG synthesis in multiple sclerosis at clinical onset. *Mult Scler* 25, 918–926.
- Ramesh, A., Schubert, R.D., Greenfield, A.L., Dandekar, R., Loudermilk, R., Sabatino, J.J., Koelzer, M.T., Tran, E.B., Koshal, K., Kim, K., et al. (2020). A pathogenic and clonally expanded B cell transcriptome in active multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 117, 22932–22943.
- Raveney, B.J.E., Oki, S., Hohjoh, H., Nakamura, M., Sato, W., Murata, M., and Yamamura, T. (2015). Eomesodermin-expressing T-helper cells are essential for chronic neuroinflammation. *Nat Commun* 6, 8437.
- Raveney, B.J.E., Sato, W., Takewaki, D., Zhang, C., Kanazawa, T., Lin, Y., Okamoto, T., Araki, M., Kimura, Y., Sato, N., et al. (2021). Involvement of cytotoxic Eomes-expressing CD4⁺ T cells in secondary progressive multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 118.
- Reali, C., Magliozzi, R., Roncaroli, F., Nicholas, R., Howell, O.W., and Reynolds, R. (2020). B cell rich meningeal inflammation associates with increased spinal cord pathology in multiple sclerosis. *Brain Pathol* 30, 779–793.
- Reiber, H., Ungefehr, S., and Jacobi, C. (1998). The intrathecal, polyspecific and oligoclonal immune response in multiple sclerosis. *Mult Scler* 4, 111–117.

- Reindl, M., and Waters, P. (2019). Myelin oligodendrocyte glycoprotein antibodies in neurological disease. *Nat Rev Neurol* 15, 89–102.
- Rivas, J.R., Ireland, S.J., Chkheidze, R., Rounds, W.H., Lim, J., Johnson, J., Ramirez, D.M.O., Ligoeki, A.J., Chen, D., Guzman, A.A., et al. (2017). Peripheral VH4+ plasmablasts demonstrate autoreactive B cell expansion toward brain antigens in early multiple sclerosis patients. *Acta Neuropathol* 133, 43–60.
- Rojas, O.L., Pröbstel, A.-K., Porfilio, E.A., Wang, A.A., Charabati, M., Sun, T., Lee, D.S.W., Galicia, G., Ramaglia, V., Ward, L.A., et al. (2019). Recirculating Intestinal IgA-Producing Cells Regulate Neuroinflammation via IL-10. *Cell* 177, 492–493.
- Romme Christensen, J., Börnsen, L., Ratzner, R., Piehl, F., Khademi, M., Olsson, T., Sørensen, P.S., and Sellebjerg, F. (2013). Systemic inflammation in progressive multiple sclerosis involves follicular T-helper, Th17- and activated B-cells and correlates with progression. *PLoS One* 8, e57820.
- Sage, P.T., and Sharpe, A.H. (2015). T follicular regulatory cells in the regulation of B cell responses. *Trends Immunol* 36, 410–418.
- Sage, P.T., and Sharpe, A.H. (2020). The multifaceted functions of follicular regulatory T cells. *Curr Opin Immunol* 67, 68–74.
- Sakurai, D., Hase, H., Kanno, Y., Kojima, H., Okumura, K., and Kobata, T. (2007). TACI regulates IgA production by APRIL in collaboration with HSPG. *Blood* 109, 2961–2967.
- Salou, M., Garcia, A., Michel, L., Gainche-Salmon, A., Loussouarn, D., Nicol, B., Guillot, F., Hulin, P., Nedellec, S., Baron, D., et al. (2015). Expanded CD8 T-cell sharing between periphery and CNS in multiple sclerosis. *Ann Clin Transl Neurol* 2, 609–622.
- Saraste, M., Irijala, H., and Airas, L. (2007). Expansion of CD56Bright natural killer cells in the peripheral blood of multiple sclerosis patients treated with interferon-beta. *Neurol Sci* 28, 121–126.
- Saxena, A., Bauer, J., Scheikl, T., Zappulla, J., Audebert, M., Desbois, S., Waisman, A., Lassmann, H., Liblau, R.S., and 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, 1617–1621.
- Schafflick, D., Xu, C.A., Hartlehnert, M., Cole, M., Schulte-Mecklenbeck, A., Lautwein, T., Wolbert, J., Heming, M., Meuth, S.G., Kuhlmann, T., et al. (2020). Integrated single cell analysis of blood and cerebrospinal fluid leukocytes in multiple sclerosis. *Nat Commun* 11, 247.
- Schirmer, L., Schafer, D.P., Bartels, T., Rowitch, D.H., and Calabresi, P.A. (2021). Diversity and Function of Glial Cell Types in Multiple Sclerosis. *Trends Immunol* 42, 228–247.
- Schmitt, N., Bentebibel, S.-E., and Ueno, H. (2014). Phenotype and functions of memory Tfh cells in human blood. *Trends in Immunology* 35, 436–442.

- Schneider, R., Mohebani, A.N., Ifergan, I., Beauseigle, D., Duquette, P., Prat, A., and Arbour, N. (2011). B cell-derived IL-15 enhances CD8 T cell cytotoxicity and is increased in multiple sclerosis patients. *J Immunol* *187*, 4119–4128.
- Schoenbeck, S., McKenzie, D.T., and Kagnoff, M.F. (1989). Interleukin 5 is a differentiation factor for IgA B cells. *Eur J Immunol* *19*, 965–969.
- Sellebjerg, F., Christiansen, M., Nielsen, P.M., and Frederiksen, J.L. (1998). Cerebrospinal fluid measures of disease activity in patients with multiple sclerosis. *Mult Scler* *4*, 475–479.
- Serafini, B., Rosicarelli, B., Magliozzi, R., Stigliano, E., and 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*, 164–174.
- Shen, P., Roch, T., Lampropoulou, V., O'Connor, R.A., Stervbo, U., Hilgenberg, E., Ries, S., Dang, V.D., Jaimes, Y., Daridon, C., et al. (2014). IL-35-producing B cells are critical regulators of immunity during autoimmune and infectious diseases. *Nature* *507*, 366–370.
- Singh, K., Chang, C., and Gershwin, M.E. (2014). IgA deficiency and autoimmunity. *Autoimmun Rev* *13*, 163–177.
- Skulina, C., Schmidt, S., Dornmair, K., Babbe, H., Roers, A., Rajewsky, K., Wekerle, H., Hohlfeld, R., and Goebels, N. (2004). Multiple sclerosis: brain-infiltrating CD8+ T cells persist as clonal expansions in the cerebrospinal fluid and blood. *Proc Natl Acad Sci U S A* *101*, 2428–2433.
- Sobottka, B., Harrer, M.D., Ziegler, U., Fischer, K., Wiendl, H., Hünig, T., Becher, B., and Goebels, N. (2009). Collateral Bystander Damage by Myelin-Directed CD8+ T Cells Causes Axonal Loss. *The American Journal of Pathology* *175*, 1160–1166.
- Sonoda, E., Hitoshi, Y., Yamaguchi, N., Ishii, T., Tominaga, A., Araki, S., and Takatsu, K. (1992). Differential regulation of IgA production by TGF-beta and IL-5: TGF-beta induces surface IgA-positive cells bearing IL-5 receptor, whereas IL-5 promotes their survival and maturation into IgA-secreting cells. *Cell Immunol* *140*, 158–172.
- Sorensen, P.S., Lisby, S., Grove, R., Derosier, F., Shackelford, S., Havrdova, E., Drulovic, J., and Filippi, M. (2014). Safety and efficacy of ofatumumab in relapsing-remitting multiple sclerosis: a phase 2 study. *Neurology* *82*, 573–581.
- de Sousa-Pereira, P., and Woof, J.M. (2019). IgA: Structure, Function, and Developability. *Antibodies (Basel)* *8*.
- Srivastava, R., Aslam, M., Kalluri, S.R., Schirmer, L., Buck, D., Tackenberg, B., Rothhammer, V., Chan, A., Gold, R., Berthele, A., et al. (2012). Potassium channel KIR4.1 as an immune target in multiple sclerosis. *N Engl J Med* *367*, 115–123.
- Stangel, M., Kuhlmann, T., Matthews, P.M., and Kilpatrick, T.J. (2017). Achievements and obstacles of remyelinating therapies in multiple sclerosis. *Nat Rev Neurol* *13*, 742–754.
- Stern, J.N.H., Yaari, G., Vander Heiden, J.A., Church, G., Donahue, W.F., Hintzen, R.Q., Huttner, A.J., Laman, J.D., Nagra, R.M., Nylander, A., et al. (2014). B cells populating the

multiple sclerosis brain mature in the draining cervical lymph nodes. *Sci Transl Med* 6, 248ra107.

Stienne, C., Michieletto, M.F., Benamar, M., Carrié, N., Bernard, I., Nguyen, X.-H., Lippi, Y., Duguet, F., Liblau, R.S., Hedrick, S.M., et al. (2016). Foxo3 Transcription Factor Drives Pathogenic T Helper 1 Differentiation by Inducing the Expression of Eomes. *Immunity* 45, 774–787.

Storch, M.K., Piddlesden, S., Haltia, M., Iivanainen, M., Morgan, P., and Lassmann, H. (1998). Multiple sclerosis: in situ evidence for antibody- and complement-mediated demyelination. *Ann Neurol* 43, 465–471.

Suto, A., Wurster, A.L., Reiner, S.L., and Grusby, M.J. (2006). IL-21 inhibits IFN-gamma production in developing Th1 cells through the repression of Eomesodermin expression. *J Immunol* 177, 3721–3727.

Thewissen, K., Nuyts, A.H., Deckx, N., Van Wijmeersch, B., Nagels, G., D’hooghe, M., Willekens, B., Cras, P., Eijnde, B.O., Goossens, H., et al. (2014). Circulating dendritic cells of multiple sclerosis patients are proinflammatory and their frequency is correlated with MS-associated genetic risk factors. *Mult Scler* 20, 548–557.

Thompson, A.J., Baranzini, S.E., Geurts, J., Hemmer, B., and Ciccarelli, O. (2018a). Multiple sclerosis. *The Lancet* 391, 1622–1636.

Thompson, A.J., Banwell, B.L., Barkhof, F., Carroll, W.M., Coetzee, T., Comi, G., Correale, J., Fazekas, F., Filippi, M., Freedman, M.S., et al. (2018b). Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. *Lancet Neurol* 17, 162–173.

Tomescu-Baciu, A., Johansen, J.N., Holmøy, T., Greiff, V., Stensland, M., de Souza, G.A., Vartdal, F., and Lossius, A. (2019). Persistence of intrathecal oligoclonal B cells and IgG in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 333, 576966.

Trend, S., Jones, A.P., Cha, L., Byrne, S.N., Geldenhuys, S., Fabis-Pedrini, M.J., Carroll, W.M., Cole, J.M., Booth, D.R., Lucas, R.M., et al. (2018). Higher Serum Immunoglobulin G3 Levels May Predict the Development of Multiple Sclerosis in Individuals With Clinically Isolated Syndrome. *Front Immunol* 9, 1590.

Tumani, H. (2008). Corticosteroids and plasma exchange in multiple sclerosis. *J Neurol* 255 *Suppl* 6, 36–42.

Tzartos, J.S., Friese, M.A., Craner, M.J., Palace, J., Newcombe, J., Esiri, M.M., and Fugger, L. (2008). Interleukin-17 production in central nervous system-infiltrating T cells and glial cells is associated with active disease in multiple sclerosis. *Am J Pathol* 172, 146–155.

Ueno, H., Banchereau, J., and Vinuesa, C.G. (2015). Pathophysiology of T follicular helper cells in humans and mice. *Nat Immunol* 16, 142–152.

Vaknin-Dembinsky, A., Balashov, K., and Weiner, H.L. (2006). IL-23 is increased in dendritic cells in multiple sclerosis and down-regulation of IL-23 by antisense oligos increases dendritic cell IL-10 production. *J Immunol* 176, 7768–7774.

- Victora, G.D., and Nussenzweig, M.C. (2012). Germinal centers. *Annu Rev Immunol* 30, 429–457.
- Viglietta, V., Baecher-Allan, C., Weiner, H.L., and Hafler, D.A. (2004). Loss of functional suppression by CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. *J Exp Med* 199, 971–979.
- Villar, L.M., Masjuan, J., González-Porqué, P., Plaza, J., Sádaba, M.C., Roldán, E., Bootello, A., and Alvarez-Cermeño, J.C. (2003). Intrathecal IgM synthesis is a prognostic factor in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 53, 222–226.
- Villar, L.M., Sádaba, M.C., Roldán, E., Masjuan, J., González-Porqué, P., Villarrubia, N., Espiño, M., García-Trujillo, J.A., Bootello, A., and Alvarez-Cermeño, J.C. (2005). Intrathecal synthesis of oligoclonal IgM against myelin lipids predicts an aggressive disease course in MS. *J Clin Invest* 115, 187–194.
- Vinuesa, C.G., Linterman, M.A., Yu, D., and MacLennan, I.C.M. (2016). Follicular Helper T Cells. *Annu. Rev. Immunol.* 34, 335–368.
- Walton, C., King, R., Rechtman, L., Kaye, W., Leray, E., Marrie, R.A., Robertson, N., La Rocca, N., Uitdehaag, B., van der Mei, I., et al. (2020). Rising prevalence of multiple sclerosis worldwide: Insights from the Atlas of MS, third edition. *Mult Scler* 26, 1816–1821.
- Wang, J., Jelcic, I., Mühlenbruch, L., Haunerding, V., Toussaint, N.C., Zhao, Y., Cruciani, C., Faigle, W., Naghavian, R., Foegel, M., et al. (2020). HLA-DR15 Molecules Jointly Shape an Autoreactive T Cell Repertoire in Multiple Sclerosis. *Cell* 183, 1264–1281.e20.
- Wanleenuwat, P., and Iwanowski, P. (2019). Role of B cells and antibodies in multiple sclerosis. *Mult Scler Relat Disord* 36, 101416.
- Winges, K.M., Gilden, D.H., Bennett, J.L., Yu, X., Ritchie, A.M., and Owens, G.P. (2007). Analysis of multiple sclerosis cerebrospinal fluid reveals a continuum of clonally related antibody-secreting cells that are predominantly plasma blasts. *J Neuroimmunol* 192, 226–234.
- Wu, H., Deng, Y., Zhao, M., Zhang, J., Zheng, M., Chen, G., Li, L., He, Z., and Lu, Q. (2018). Molecular Control of Follicular Helper T cell Development and Differentiation. *Front Immunol* 9, 2470.
- Wurth, S., Kuenz, B., Bsteh, G., Ehling, R., Di Pauli, F., Hegen, H., Auer, M., Gredler, V., Deisenhammer, F., Reindl, M., et al. (2017). Cerebrospinal fluid B cells and disease progression in multiple sclerosis - A longitudinal prospective study. *PLoS One* 12, e0182462.
- Xie, M.M., and Dent, A.L. (2018). Unexpected Help: Follicular Regulatory T Cells in the Germinal Center. *Front Immunol* 9, 1536.
- Yang, Y., Xu, J., Niu, Y., Bromberg, J.S., and Ding, Y. (2008). T-bet and eomesodermin play critical roles in directing T cell differentiation to Th1 versus Th17. *J Immunol* 181, 8700–8710.
- Yu, X., Graner, M., Kennedy, P.G.E., and Liu, Y. (2020). The Role of Antibodies in the Pathogenesis of Multiple Sclerosis. *Front Neurol* 11, 533388.

Zhang, Y., Da, R.-R., Hilgenberg, L.G., Tourtellotte, W.W., Sobel, R.A., Smith, M.A., Olek, M., Nagra, R., Sudhir, G., van den Noort, S., et al. (2005). Clonal expansion of IgA-positive plasma cells and axon-reactive antibodies in MS lesions. *J Neuroimmunol* *167*, 120–130.

Zhou, D., Srivastava, R., Nessler, S., Grummel, V., Sommer, N., Brück, W., Hartung, H.-P., Stadelmann, C., and Hemmer, B. (2006). Identification of a pathogenic antibody response to native myelin oligodendrocyte glycoprotein in multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* *103*, 19057–19062.

Titre : Analyse de la différenciation lymphocytaire B dans la sclérose en plaques

Mots clés : Sclérose en plaques - Lymphocytes B - Lymphocytes T folliculaires helper

Résumé : La sclérose en plaques (SEP) est une maladie auto-immune démyélinisante affectant le système nerveux central. Longtemps considérée comme médiée par les lymphocytes T, l'efficacité des traitements éliminant les lymphocytes B (LB) a montré leur importance dans la maladie. Cependant, l'échec de l'atacept, un traitement bloquant la différenciation des LB en plasmocytes a mis en évidence le rôle protecteur des plasmocytes dans la maladie. De plus, de récentes études ont montré que les LB IgA⁺ ont une fonction régulatrice probablement importante dans la gestion de la neuroinflammation. A l'aide d'un modèle *in vitro* de différenciation des LB, nous avons étudié les plasmablastes et la réponse à IgA dans la SEP. En raison du rôle majeur des lymphocytes T folliculaires helper (Tfh) dans la différenciation des LB, nous avons également caractérisé ces cellules dans la SEP.

Nous avons identifié une prolifération et différenciation en plasmablastes amoindries des LB des patients. Une concentration diminuée d'IgA a été retrouvée dans le surnageant des LB et le sérum de patients.

Concernant les Tfh, nous avons observé une infiltration de Tfh1 dans le liquide céphalo-rachidien (LCR) des patients SEP au début de la maladie. Des tests de transmigration ont confirmé que les Tfh1 ont une capacité de migration accrue à travers un modèle de barrière hémato-encéphalique. Enfin, par une analyse RNAseq, nous montrons que les Tfh infiltrant le LCR ont une signature Tfh1 avec un profil pro-inflammatoire.

En conclusion, nos travaux suggèrent que les LB IgA⁺, décrits comme un réservoir de LB régulateurs, sont moins fonctionnels dans la SEP. De plus, nous montrons que les Tfh1 sont des acteurs importants de la neuroinflammation locale survenant chez les patients.

Title : Analysis of B cell differentiation in multiple sclerosis

Keywords : Multiple sclerosis – B cells – Follicular helper T cells

Abstract : Multiple sclerosis (MS) is a demyelinating autoimmune disease affecting the central nervous system. Long considered of a T-cell mediated disease, the efficacy of B-cell depleting therapies showed the importance of these cells in the pathophysiology of MS. However, the failure of the atacept, a treatment that inhibits the differentiation of B cells into plasma cells, has highlighted the probable protective effect of plasma cells in MS. Furthermore, recent studies have shown that IgA-secreting cells have a regulatory function which could be important in the management of neuroinflammation. Using an *in vitro* model of B cell differentiation, we analyzed plasmablasts and IgA response in MS. Due to the major role of follicular helper T cells (Tfh) in promoting B cell differentiation, we characterized these cells in MS patients.

We show that B cells from MS patients have a lower proliferation and differentiation into plasmablasts. A lower concentration of IgA was found in both B cells supernatant and serum of MS patients.

Concerning Tfh cells, we found that Tfh1 cells infiltrate the cerebrospinal fluid (CSF) of MS patients at the onset of the disease. Transmigration assays confirmed that Tfh1 cells have an increased migratory ability across a model of blood-brain barrier. Finally, performing RNA-seq analysis, we show that CSF-infiltrating Tfh cells have a Tfh1 signature with a pro-inflammatory profile.

In conclusion, our work suggests that IgA⁺ B cells, which have been described as a reservoir of regulatory B cells, are less functional in MS patients. Moreover, we show that Tfh1 cells are important actors in local neuroinflammation occurring in MS patients.