

UNIVERSITE DE NANTES

FACULTE DE MEDECINE

ECOLE DOCTORALE BIOLOGIE-SANTE

Année 2013

N° BU : 08

**Caractérisation des lymphocytes B reconnaissant la MOG
dans la sclérose en plaques**

THESE DE DOCTORAT

Discipline : Sciences de la vie et de la santé

Spécialité : Immunologie

Présentée et soutenue publiquement par

Annie ELONG NGONO

Le 28 Octobre 2013, devant le jury ci-dessous

Pr David BRASSAT, Université Paul Sabatier de Toulouse III (Rapporteur)

Dr Olivier THAUNAT, Université Claude Bernard de Lyon I (Rapporteur)

Directeur: Pr Jean-Paul SOULILLOU

Co-directeur: Dr David-Axel LAPLAUD

Remerciements

Je tiens à remercier le Pr David Brassat et le Dr Olivier Thauvat d'avoir accepté d'être rapporteurs de cette thèse. C'est un privilège pour moi de présenter ma thèse devant ce jury.

Je remercie le Dr Ignacio Anegón de m'avoir accueillie dans son laboratoire.

Un grand merci au professeur Jean-Paul Soulillou pour son encadrement et sa disponibilité au cours de cette thèse. Je tiens à vous remercier pour votre rigueur, votre confiance et votre motivation. Merci aussi pour vos anecdotes à chaque début de réunion, travailler avec vous m'a fait grandir intellectuellement et pas seulement (*j'ai enfin lu Trois femmes puissantes de Marie Ndiaye*). Merci aussi pour vos conseils professionnels, j'espère travailler de nouveau avec quelqu'un d'aussi passionné (et passionnant) que vous.

Je remercie aussi le Dr David Laplaud pour mon recrutement au sein de l'équipe SEP et pour son encadrement tout au long de ma thèse. Merci pour le partage de la connaissance clinique.

Je tiens à remercier le Dr Sophie Brouard pour sa disponibilité et son engagement. Merci pour toute cette aide sur les LB. Merci également aux Dr Arnaud Nicot et Nicolas Degauque pour leur disponibilité et nos discussions scientifiques.

Je remercie aussi les membres de mon comité de suivi de thèse pour leur disponibilité durant ces trois années de thèse (Dr Denis Hudrisier et Dr Henri Vié)

Je remercie aussi mes collègues : Athémaïs (ma roumaine préférée après O-Zone), Flora G (ou Flora Louboutin), Marion (Merci pour ton aide très professionnelle), Alexandra (le pilier de notre équipe), Mélanie C (viva Portugal !!!), les futurs Docteurs Antoine, Elodie M, Elodie P, Manu. Merci pour les superbes soirées, les barbecues, les fous rires... je pense que cette ambiance est exceptionnelle. Je n'oublie pas Laetitia (entre sudistes, on se comprend), Justine (ma copine des pays de l'est), Angélique (merci pour tes bonnes paroles lors des moments difficiles), Maud et mes partenaires du midi pour nos discussions sur l'Afrique et la vie (malgré les odeurs de poissons de L..) Mélanie N, Joelle, Gaëlle P (RDV aux USA, callientass), bien-sur the Boss (Faouzi B), Laura (Barça en force), Cécilia, Laure –Hélène (C'est promis, je lui ferai des tresses), Julien, P-J, Sean-Paul J, Une dédicace à Laure, à Anne G et à Nazhli (les absentes). Merci pour vos « Il est trop marrant ton accent ou parle nous camerounais ou STP dis 488 ou trop marrant ton OUI », j'ai apprécié partager cette

différence avec vous. En fait, je remercie tout le monde sans exception, merci à ceux qui ont contribué (ou pas) à mon quotidien au laboratoire.

Je remercie aussi ma petite Gaelle pour son amitié et sa disponibilité, Christelle pour toutes les étapes que nous avons traversées depuis Chateaubriant (we are survivors), Laure (ma jumelle à une teinte près), la petite Nono, Audrey et la parisienne Oumy.

Je remercie aussi Alexie, Gaby pour nos longues discussions sur la vie, RDV dans 5 ans. Fredo pour son amitié, Adrien, Hervé et tous ceux que je ne cite pas mais à qui je pense et les membres de l'association ACASEN.

Je dédie cette thèse à ma famille (Elong Ngon) et mes bébés Lucie et Julie. Je remercie le ciel de vous avoir tous car vous êtes une bénédiction pour moi. Merci à mes parents d'avoir contribué à faire de moi la personne que je suis aujourd'hui. Votre simplicité, votre motivation, votre ambition, votre amour m'ont permis de me sentir bien ces 11 dernières années loin de vous. Mes frères et sœurs, je vous remercie pour tous ces instants que j'apprécie énormément où juste votre présence suffit à me faire passer des vacances exceptionnelles et inoubliables (Samy, Rmine, Gasto, Paul D, Yohanna, Lulu et Juju) **Na Tondi Bigno**. J'espère que nous n'allons pas trop confondre nos cartes de visite, avec autant de Docteur portant le même nom 😊. Merci à Annie Ducros pour sa gentillesse envers ma famille. Merci à mes cousins Roland, Olivia et Jojo.

Merci.

Après cette étape, il ne me reste plus qu'à commencer le début du reste de ma vie ...

Liste des abbréviations

Ac	Anticorps
Ag	Antigène
AID	Activation-induced cytidine deaminase
APC	Allophycocyanine
APRIL	A proliferating inducing ligand
BAFF	B cell activator factor of the TNF family
BBR	Beads-B cell rosette
BCR	B cell receptor
BHE	Barrière Hématoencéphalique
BLNK	B-cell linker protein
Btk	Bruton tyrosine kinase
CD	Cluster of differentiation
CFA	Complete Freund Adjuvant
CG	Centre germinatif
CIS	Clinically Isolated Syndrome
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
CMV	Cytomegalovirus
CPA	Cellules présentatrices d'Ags
CSA	Cellules sécrétrices d'anticorps
CSL	Cellules souches lymphoïdes
EAE	Encéphalomyélite autoimmune expérimentale
EBNA1	Epstein-Barr nuclear antigen
EBV	Epstein-Barr Virus
EDSS	Expanded Disability Status Scale
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
ELISPOT	Enzyme-linked immunospot
FO	Folliculaire
HA	Hemaglutinine
HLA	Human leucocyte antigen
IFN	Interféron
Igm	Immunoglobuline membranaire
IL	Interleukine

IRM	Imagerie par résonance magnétique
IRM	Imagerie par Résonance Magnétique
ITAM	Immunoreceptor tyrosine-based activation motif
LB	Lymphocytes B
LCMV	Lymphocytic Choriomeningitis Virus
LCR	Liquide céphalorachidien
LT	Lymphocytes T
MAG	Myelin-associated glycoprotein
MBP	Myelin basic protein
MNI	Mononucléose infectieuse
MNNI	Maladies neurologiques non-inflammatoires
MO	Moelle osseuse
MOE	Moelle épinière
MOG	Myelin oligodendrocyte glycoprotein
MZP	Marginal zone precursor
NK	Natural Killer
OLS	Organes lymphoïdes secondaires
PAMPS	Pathogen associated molecular patterns
PBMC	Peripheral blood mononuclear cells
PHRC	Plan hospitalier pour la recherche clinique
PLP	Proteolipid protein
PRR	Pattern recognition receptor
PSGL1	P sélectin glycoprotein Ligand-1
PTX	Toxine pertussique
RAG	Recombinaison activating gene
rMOG	MOG recombinante
RR	Forme rémittente
RTX	Rituximab
SEP	Sclérose En Plaques
SLC	Surrogate light chains
SNC	Système nerveux central
SP	Secondairement progressif
T regs	Lymphocytes T régulateurs

TCR	T cell receptor
TdT	Terminal deoxynucleotidyl transferase
Tg	Transgénique
TLR	Toll like receptor
TLR	Toll-like receptor
TNF	Tumor necrosis factor
TT	Toxine tétanique
VD	Vitamine D
VLA4	Very late antigen 4
ZM	Zone marginale

INTRODUCTION.....	1
I. La Sclérose En Plaques (SEP) : Généralités.....	2
1) Historique et définition de la SEP	2
2) Epidémiologie de la SEP	3
a) Prévalence et incidence	3
b) Age et sexe	3
3) Etiologie de la SEP.....	4
a) Les différents facteurs impliqués.....	4
i. Les facteurs génétiques.....	4
ii. Les facteurs environnementaux	4
b) Les différentes formes cliniques.....	9
II. La SEP : une maladie auto-immune.....	11
1) Les différents arguments soutenant une composante auto-immune	11
a) Les modèles animaux	11
b) Les données anatomopathologiques	13
c) Les traitements	14
2) La physiopathologie de la SEP.....	17
a) Les hypothèses majeures de la SEP.....	17
b) Implication des LT dans la SEP	18
c) Implication des LB dans la SEP	21
d) La barrière hémato-encéphalique et la transmigration leucocytaire.....	22
e) Les auto-antigènes impliqués dans la SEP	26
III. Les lymphocytes B dans la SEP.....	29
1) Généralités sur les lymphocytes B	29
a) Le BCR.....	29
b) Activation du Lymphocyte B	31
2) Le répertoire des lymphocytes B.....	33
a) La diversité du répertoire B	34
b) Les mécanismes de contrôle de la tolérance au soi	35
c) Les différents points de contrôle	37
3) Développement et phénotype des lymphocytes B	39
a) Développement et homéostasie des lymphocytes B conventionnels ou B2	39
b) Différentiation et phénotype des lymphocytes B2	40
c) Différentiation des lymphocytes B1	50
4) Implication des LB dans la SEP	51

a) Le modèle animal et les lymphocytes B	51
b) Les sous-populations de LB dans la SEP	53
c) La production d'anticorps.....	54
d) La fonction présentatrice d'antigène	56
e) La production de cytokines	57
OBJECTIFS DE LA THESE	59
RESULTATS	60
Article I	61
Article II	92
DISCUSSION ET PERSPECTIVES	125
ANNEXES	132
REFERENCES	149

Table des illustrations

<u>Figure 1</u> Infection des lymphocytes B (LB) par le virus EBV	7
<u>Figure 2</u> Evolution du handicap au cours du temps	10
<u>Figure 3</u> Les différentes interfaces de la barrière hématoencéphalique	23
<u>Figure 4</u> Transmigration leucocytaire.	25
<u>Figure 5</u> Structure du BCR.....	30
<u>Figure 6</u> Les différents points de contrôle de la tolérance B chez l'homme.....	38
<u>Figure 7</u> Développement des LB dans la moelle osseuse de la cellule souche hématopoïétique (CSH) au stade de LB immature.	40
<u>Figure 8</u> Le centre germinatif.....	43
<u>Figure 9</u> Phénotype des amygdales	45
<u>Figure 10</u> Les mécanismes de contrôle de la tolérance au soi au cours du développement du LB.....	49
<u>Tableau 1</u> Phénotype des sous-populations des LB dans le sang	47
<u>Tableau 2</u> Les sous-populations de LB dans la SEP	53

Avant-propos

Le titre de cette thèse est la caractérisation des lymphocytes B reconnaissant la MOG dans la sclérose en plaques. Pour traiter ce sujet, je vous présenterai les généralités sur la maladie, ensuite je vous décrirai sa composante autoimmune pour enfin vous décrire le lymphocyte B et la place qu'il occupe dans la maladie. En annexe, vous trouverez le second projet que j'ai mené au cours de cette thèse sur l'étude de la fréquence des LT reconnaissant la myéline dans la SEP. Cette étude bénéficie d'un plan hospitalier pour la recherche clinique que je vous détaillerai.

INTRODUCTION

I. La Sclérose En Plaques (SEP) : Généralités

1) Historique et définition de la SEP

La sclérose en plaques (SEP) est un terme qui a été utilisé pour la première fois par Jean Martin CHARCOT en 1868 pour désigner un désordre neurologique caractérisé par une gêne motrice observée chez certains de ses patients (Murray, 2009). Bien que les documents les plus anciens mettant en évidence un ensemble de troubles cliniques identiques à ceux décrits par JM Charcot datent de 1421, il est impossible de savoir exactement depuis quand la SEP existe. Grâce aux différentes descriptions faites par de nombreux biologistes, la SEP peut donc être décrite comme une maladie touchant le Système Nerveux Central (SNC) (1) avec une atteinte accompagnée par des atrophies et/ou la présence de plaques disséminées au niveau de la moelle épinière, du cerveau et du tronc cérébral (2) avec la présence de corps gras (Maintenant connu sous le nom de débris de myéline) associée aux lésions (3) avec des signes cliniques associés à l'atteinte observée dans le SNC et dont le handicap peut évoluer épisodiquement (Poussées) ou progressivement. Le progrès des techniques d'imagerie et en particulier l'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM), introduite en 1981 (Young et al., 1981), a été une grande avancée pour la caractérisation de la SEP. L'IRM a permis en effet de visualiser pour la première fois l'activité de la maladie au niveau cérébral chez des patients alors que seules de rares pièces d'autopsies étaient disponibles.

Aujourd'hui, la SEP peut être définie de manière simple comme une maladie chronique du SNC, caractérisée par une démyélinisation inflammatoire et des signes cliniques comme la perte de certaines fonctions motrices, sensitives et cognitives observées chez les patients. La gaine de myéline est la membrane qui entoure les axones; c'est cette membrane qui est dégradée dans la SEP. La gaine de myéline facilite la propagation de l'influx nerveux et sa destruction dans la maladie entraîne l'apparition de signes cliniques énoncés ci-dessus. La myéline est l'un des constituants essentiels de la substance blanche. C'est une structure pauvre en H₂O contrairement à la substance grise (80%), constituée en majorité de lipides (70%) et de protéines (30%).

Malgré les progrès considérables, beaucoup de zones d'ombres restent sur la compréhension de l'étiologie et du développement de la maladie.

2) Epidémiologie de la SEP

La SEP est une maladie du SNC qui cause un handicap progressif dans la majorité des cas, elle touche aujourd'hui plus de 2,5 millions de personnes dans le monde dont 80 000 sur le territoire français.

a) Prévalence et incidence

La prévalence correspond au nombre de personnes atteintes par la maladie pour 100 000 habitants. La prévalence de cette maladie est hétérogène à travers le monde. Plusieurs études de prévalence ont montré une différence entre les pays et même au sein des pays. En effet, les pays du nord présentent des prévalences très élevées par rapport à ceux du sud. De même au sein d'un pays les régions du nord sont les plus touchées (Fromont et al., 2010; Kurtzke, 1975). La prévalence moyenne en France est de 94.6/100 000 habitants, la France étant considérée comme une zone de prévalence moyennement élevée. L'incidence d'une maladie représente le nombre de nouveaux cas par an pour 100 000 habitants. En France, la SEP a une incidence de 7.5 pour 100 000 habitants avec les valeurs les plus élevées dans les régions du nord alors que les pays de la Loire présentent une incidence très faible.

b) Age et sexe

La SEP est une maladie affectant les jeunes adultes entre 20 et 40 ans mais il existe des cas de SEP pédiatrique dont le début de la maladie se fait avant l'âge de 10 ans. Les études épidémiologiques ont montré une préférence en fonction du sexe avec un sex ratio (Femme/Homme) de 2.6. Ainsi, la prévalence en France est de 130.5 chez les femmes pour 54.8 chez les hommes et l'incidence de 10.4 chez les femmes pour 4.2 chez les hommes (Fromont et al., 2010). Jusqu'à présent, la cause de ce sex ratio en défaveur des femmes n'est pas établie. Il a été observé une baisse des poussées pendant la grossesse et une aggravation de la maladie après l'accouchement (Runmarker et Andersen, 1995). Confavreux a suivi 254 femmes dont 269 grossesses. Il a tenu compte pour son étude du nombre de poussées et de l'EDSS (Expanded Disability Status Scale) pendant la grossesse et 12 mois après l'accouchement. Son étude montre une baisse des poussées durant la grossesse, surtout pendant le troisième trimestre cependant le nombre de poussées augmente après l'accouchement pour ensuite être identique aux valeurs obtenues un an avant la grossesse (Confavreux et al., 1998). L'administration d'estrogène présente des effets thérapeutiques sur les patientes rémittentes (Sicotte et al., 2002) et semble montrer un effet des hormones sexuelles sur la SEP rémittente.

3) Etiologie de la SEP

a) Les différents facteurs impliqués

La SEP est vraisemblablement une maladie d'origine multifactorielle. Comme il a été décrit dans le paragraphe précédent, c'est une maladie qui présente une répartition bien précise à travers le monde. Il semble que cette répartition soit liée à des facteurs environnementaux et génétiques. Plusieurs études ont en effet mis en évidence récemment l'influence de facteurs génétiques et environnementaux.

i. Les facteurs génétiques

Dès le début du 19^{ème} siècle, Ernst Leyden suggère pour la première fois la possibilité d'une composante héréditaire dans la SEP. Ce n'est qu'en 1930 que les premières études évaluant l'aspect génétique de la SEP démontrent clairement un clustering familial de la maladie. Une étude génétique canadienne de 30 000 patients atteints de SEP a confirmé l'existence de facteurs génétiques dans la SEP. Elle démontre par exemple chez des jumeaux homozygotes, un facteur de risque élevé (30%) pour que si l'un développe la SEP, l'autre soit atteint. Ce facteur de risque étant uniquement de 5-7% chez des hétérozygotes (Ebers et al., 1995). La majorité de ces gènes correspond à des gènes de l'immunité. Les variants polymorphiques du complexe majeur d'histocompatibilité en particulier l'allèle HLA-DRB1*1501 présentent une forte association avec la maladie avec un odds ratio de 3.1 (Dyment et al., 2004; Haines et al., 1998). Des études génétiques ont montré que le gène codant pour le complexe majeur d'histocompatibilité CMH II était de loin le gène de susceptibilité le plus significatif de la SEP (Barcellos et al., 2006; Oksenberg et al., 2008). D'autres allèles affectent la susceptibilité de la maladie comme l'allèle des chaînes alpha des récepteurs à l'Interleukine-2 (IL-2) ou à IL-7 ou le CD58 (I M S G Consortium et al., 2007). Certains allèles pourraient avoir un rôle comme le HLADRB1*14 qui associé au HLA-DRB1*1501, atténue considérablement la susceptibilité (Handel et al., 2010). Il existe donc une multitude de gènes portés par des individus et pouvant contribuer au développement d'une SEP chez ces derniers.

ii. Les facteurs environnementaux

Plusieurs facteurs environnementaux tels que les infections virales, l'exposition au soleil et/ou le taux de vitamine D, et le tabac ont été décrits dans la SEP.

- ❖ **Infection virale** : Un rôle probable de l'infection virale dans la SEP a longtemps été suggéré et largement débattu depuis le début des études épidémiologiques. Malgré l'avancée des études, il n'existe pas aujourd'hui de démonstration irrévocable d'une association entre un virus et l'apparition de la SEP. Plusieurs virus ont été étudiés dont le Human herpes Virus 6 (HHV-6), le Chlamydia pneumoniae, le Cytomégalovirus (CMV), l'Epstein-BarrVirus (EBV) et d'autres virus (voir revue Soldan SS (Soldan et Jacobson, 2001).

EBV : Epstein-Barr virus

C'est un virus humain de la famille des herpès virus qui affecte 95% de la population et qui a la capacité d'infecter, d'activer et de rester latent dans les lymphocytes B mémoires tout au long de la vie (**Figure 1**). La primo-infection à l'EBV chez les jeunes enfants peut être en général asymptomatique mais plus de 50 % des primo-infections pendant l'adolescence se manifestent par une infection aiguë de mononucléose infectieuse (MNI). La première suggestion du rôle de EBV dans la pathogénéicité de la SEP débute en 1979 quand Fraser et ses collègues montrent que les lymphocytes B de patients ayant une SEP cliniquement active ont tendance à se différencier plus rapidement et portent des antigènes de EBV tels que les EBNA, Epstein-Barr Nuclear Antigen (Fraser et al., 1979).

Plusieurs études montrent que l'infection à EBV pourrait être essentielle dans l'étiologie de la SEP comparée à d'autres infections virales. L'EBV est un virus ayant la capacité de vivre dans une cellule hôte tout au long de sa vie contrairement à d'autres virus qui sont éliminés après la phase inflammatoire. L'EBV est le seul virus qui infecte la quasi-totalité des patients atteints de SEP et dont l'infection précède le début de SEP car tout individu développant une SEP est infecté par EBV (Levin et al., 2005). C'est aussi le seul agent viral qui infecte et modifie les lymphocytes B (LB). De ces différentes études, plusieurs hypothèses ont été émises pour comprendre comment EBV pouvait avoir un rôle dans le développement de la SEP (Pender, 2011). Parmi celles-ci :

(1) l'hypothèse de la cross-réactivité des Lymphocytes T (LT) EBV-spécifiques avec des antigènes du SNC. Lünemann et al. ont montré que des CD4⁺ anti-EBNA1 des patients réagissaient avec 15 peptides dérivés de 4 protéines majeures de la myéline, la Myelin Basic Protein (MBP), la ProteoLipid Protein (PLP), la Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein (MOG) et les 2',3'-Cyclic Nucleotide 3'Phosphodiesterase (Lünemann et al., 2008). D'autres agents infectieux ont la capacité d'induire une cross-réactivité avec des antigènes du SNC et

cette cross-réactivité a été aussi observée chez des témoins et n'est pas exclusivement réservée à EBV (Pender, 2003). Cette hypothèse n'explique donc pas une action unique de l'EBV dans le développement de la SEP. **(2)** L'hypothèse de l'effet bystander qui suggère que les dommages secondairement causés dans le SNC sont le résultat d'une attaque initialement dirigée contre EBV (Serafini et al., 2007). Cette hypothèse suggère une fragilité du SNC après une attaque immunitaire contre l'EBV d'où sa dégradation. L'effet bystander pourrait contribuer à la progression de la SEP sans en être la cause principale (Pender, 2003). **(3)** L'hypothèse suggère que l'infection du SNC par un agent microbien augmente l'expression de l' $\alpha\beta$ -crystalline dans les oligodendrocytes. Ce phénomène va induire la production de signaux de danger dans le SNC pouvant contribuer au développement d'une inflammation (Thoua et al., 2000). L' $\alpha\beta$ -crystalline est une petite protéine de choc thermique de 20KDa, présente dans les oligodendrocytes. Cette hypothèse ne concerne pas cependant un virus en particulier mais l'EBV pourrait être un agent potentiel car il induit la production de l' $\alpha\beta$ -crystallin dans les LB qui la présente aux LT $CD4^+$ (Sechel et al., 1999). Sachant que chez les témoins sains, l' $\alpha\beta$ -crystallin n'est pas présente dans les tissus lymphoïdes, cette étude suggère un rôle des LB infectés par l'EBV dans l'initiation d'une réponse T dans le SNC pouvant aboutir à une démyélinisation. **(4)** L'hypothèse des LB autoréactifs infectés par EBV publiée en 2003 par Pender suggère que chez les individus ayant une susceptibilité génétique, les cellules B autoréactives infectées par l'EBV migrent dans les organes cibles et produisent des autoanticorps. Ces cellules peuvent stimuler les LT autoreactifs en envoyant des signaux de survie (Pender, 2003). Ces LT autoréactifs vont donc mener une attaque immune en recrutant des macrophages et des lymphocytes B.

CMV : Cytomégalovirus.

Le CMV pourrait ainsi avoir un impact dans la SEP en modulant la réponse immunitaire. Cette modulation pourrait avoir des conséquences néfastes ou bénéfiques pour le développement d'une pathologie auto-immune chez un sujet infecté (Alcami and Koszinowski, 2000; Mocarski, 2004). Moins d'études se sont focalisées sur cet agent, de plus les résultats obtenus restent très controversés sans doute à cause du faible nombre d'individus inclus dans les études. Aujourd'hui aucune association n'a été faite entre la séropositivité au CMV et la SEP (Pakpoor et al., 2013) mais un rôle protecteur de cette infection est mis en évidence (Pirko et al., 2012). Pirko a utilisé un modèle animal d'Encéphalomyélite Auto-immune Expérimentale (EAE) induit par le virus Theiler. Il montre qu'une infection par le MCMV (CMV murin) atténue le développement de la maladie chez les souris. Dans la même

optique, Robert Zivadinov a montré que les patients ayant une SEP et étant CMV positif présentaient un début plus tardif de maladie avec un faible EDSS et un taux de rechute faible par rapport aux patients séronégatifs (Zivadinov et al., 2006).

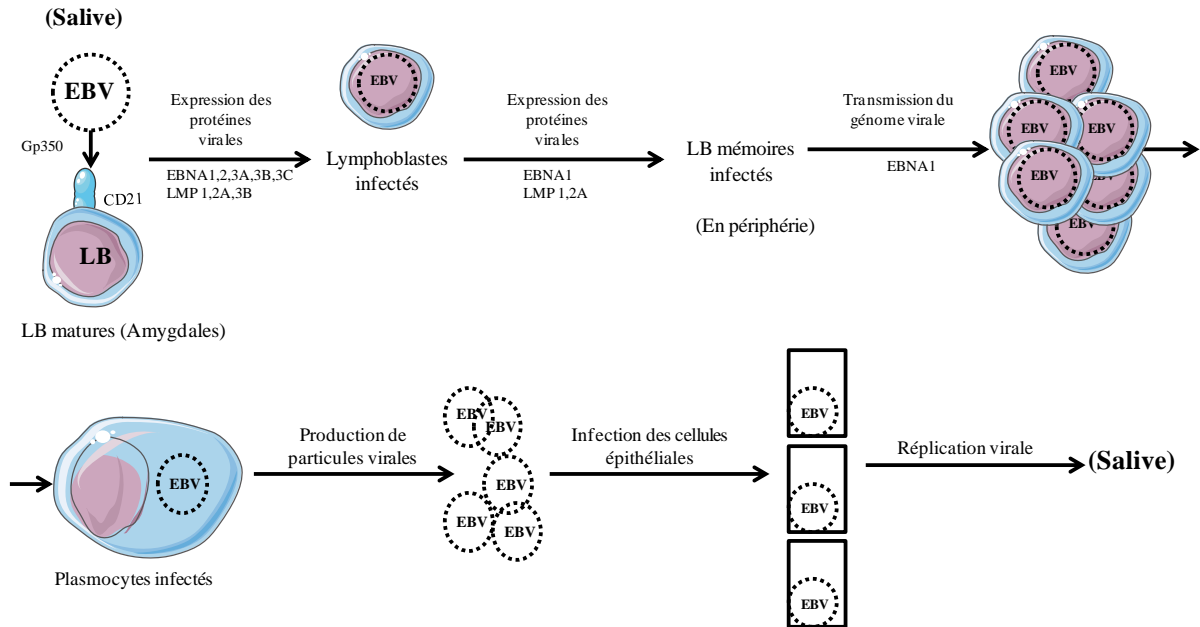


Figure 1 Infection des lymphocytes B (LB) par le virus EBV: EBV infecte le LB en se liant au récepteur du complément CD21. Le virus va ensuite mimer les signaux d'activation pour permettre aux LB infectés de se différencier normalement. La faible expression de protéines virales (EBNA1) pendant la division cellulaire permet aux virus de rester dans les LB sans être attaqués par les cellules immunitaires (CD8+ cytotoxiques).

- ❖ **Vitamine D et l'exposition au soleil :** La répartition géographique de la SEP suit un certain gradient Nord-Sud avec une prévalence élevée dans le nord. La prévalence de la SEP est donc moins élevée dans les zones géographiques ensoleillées. Très tôt l'hypothèse de l'existence d'un rôle protecteur de la production de vitamine D (VD) dans la SEP a été soulignée. Son précurseur obtenu par l'action des UV ou apporté par l'alimentation subit plusieurs transformations pour aboutir à la forme active 1,25-hydroxyvitamin D qui va se lier au récepteur VDR et induire la transcription de très nombreux gènes. Plusieurs arguments suggèrent un rôle de la vitamine D dans la physiopathologie de la SEP. Ascherio et ses collègues abordent ces arguments en 3 points : (1) La prévalence de la SEP augmente avec la latitude. (2) Dans des zones septentrionales, la prévalence est faible dans les populations dont l'alimentation est riche en VD. (3) Le risque de SEP semble baisser dans les populations migrantes de hautes à basses latitudes (Ascherio et al., 2010). Quelques études thérapeutiques

montrent que la supplémentation en VD semble réduire l'inflammation au niveau du SNC (Kimball et al., 2007; Wingerchuk et al., 2005). D'autres études se sont intéressées aux effets de la vitamine D sur la réponse immune dans la SEP. Une corrélation entre le taux de 1,25-hydroxyvitamine D dans le sang et l'activité des T régulateurs (T regs) a été rapportée (Royal et al., 2009; Smolders et al., 2009). Ainsi, Royal W a montré que le taux de 1,25-hydroxyvitamin D corrèle avec la fréquence et l'activité des T regs mais est inversement corrélé à celles des T effecteurs capables de migrer à travers la barrière hématoencéphalique. Ces études ne montrent cependant qu'une action de la vitamine D sur la réponse immune mais pas dans la SEP. Certaines études (Munger et al., 2006; Raghuwanshi et al., 2008), mais pas toutes (ghadirian 1998, Van der Mei 2003), montrent un taux d'hydroxyvitamine D bas corrélé au risque de développer une SEP et inversement.

- ❖ **Tabac** : Les études faisant le lien entre la SEP et le tabac ont débuté dans les années 60. Deux études ont montré une incidence élevée chez les femmes fumant plus de 15 cigarettes par jour par rapport à celles n'ayant jamais fumé, et cette incidence est près de 2 fois supérieure à celle des contrôles. Ces résultats sont issus d'études qui répondaient au préalable à une question de corrélation entre les contraceptions orales et les risques de SEP, donc constituées uniquement de femmes (Thorogood and Hannaford, 1998; Villard-Mackintosh and Vessey, 1993). Une étude plus récente effectuée chez les hommes a montré une incidence élevée dans le groupe des fumeurs (plus de 12 cigarettes par jour) par rapport à celui des non-fumeurs (Carlens et al., 2010). Les résultats obtenus par Di Pauli suggèrent que le tabagisme pourrait être un facteur de risque de conversion précoce d'un CIS (Clinical Isolated Syndrom) en SEP (Di Pauli et al., 2008). En effet, un patient CIS qui fume augmente de 1.8 fois ses risques de conversion en SEP en 3 ans comparé aux CIS non fumeurs bien que le groupe de patients CIS ait une forte proportion de fumeurs par rapport à la population générale.

L'aggravation des symptômes chez les patients atteints de SEP après un début de tabagisme a été mis en évidence dans des études bien que les mesures utilisées soient variables d'une étude à l'autre. La conversion de la forme rémittente en forme progressive est utilisée dans la majorité des études (Hernán et al., 2005) par rapport à l'EDSS (Expanded Disability Status Scale) (Pittas et al., 2009; Sundström and Nyström, 2008). D'autres études comme celle de Healy et al. n'ont cependant pas montré de lien entre la progression de la maladie et le tabac en comparant les EDSS

sur 2 et 5 ans. Il montre quand même une différence significative en terme d'augmentation des lésions T2 chez les fumeurs par rapport aux non-fumeurs (Healy et al., 2009). De même, Koch et son groupe ne retrouvent pas de lien entre le tabagisme et la progression de la maladie. Ils utilisent des modèles de régression de Cox et des analyses de Kaplan-Meier pour évaluer l'influence du tabac sur le développement et l'âge de début de la forme secondaire (Koch et al., 2007). Bien que ces études comportent chacune des biais dus aux recrutements ou aux méthodes utilisées pour la collecte des informations, elles permettent de montrer que le tabac est un facteur qui pourrait avoir un impact sur l'apparition de la maladie.

b) Les différentes formes cliniques

Différents phénotypes cliniques de la SEP existent. 85% des patients atteints de SEP débutent leur maladie par une poussée (Confavreux and Vukusic, 2006; Scalfari et al., 2010) correspondant à un premier événement démyélinisant appelé CIS avec à ce stade des caractéristiques évocatrices de la SEP. Le terme CIS décrit des symptômes et des manifestations suggérant une atteinte inflammatoire et démyélinisante du SNC dont le dernier épisode doit avoir une durée d'au moins 24 H en absence de fièvre, d'infection ou de critères d'encéphalopathie. En général, le CIS correspond à un épisode isolé dans le temps et dans l'espace (monofocal) très rarement multifocal. Cet épisode touche généralement les jeunes adultes et peut affecter le nerf optique, le tronc cérébral ou la moelle épinière. Plusieurs études ont montré l'importance d'analyser le Liquide CéphaloRachidien (LCR) et de faire une IRM pour prédire la conversion d'un CIS en SEP. Une fois la SEP déclarée, l'évolution de la maladie peut présenter différentes formes (Confavreux et al., 2000). La **figure 2** illustre l'évolution des différentes formes décrites en fonction du handicap et au cours du temps.

- ❖ La forme rémittente (RR) : 85% des individus débutent leur SEP par cette forme (Lublin et Reingold, 1996). La plupart des patients débute la maladie par des épisodes de poussée suivis de rémission avec une reprise complète ou partielle des fonctions altérées.
- ❖ Les formes progressives : Les formes progressives sont caractérisées par l'aggravation des symptômes et la progression du handicap avec ou sans poussées. Les formes primaire et secondaire progressives de la SEP (PP et SP) partagent beaucoup de similitudes (Antel et al., 2012). Approximativement, 60% des patients rémittents progressent vers une forme secondaire en moyenne 10 ans après le début de la maladie (Confavreux et al., 2003). Seulement 15% des patients développent une forme Primaire

Progressive qui à l'inverse de la forme rémittente débute tardivement et n'affecte pas plus de femmes que d'hommes. Cette forme est caractérisée par une progression du handicap dès le début avec des périodes de stabilité occasionnelles et temporaires. La progression est caractérisée par une perte axonale, une atrophie, une démyélinisation corticale mais sans apparition de lésions inflammatoires (Kremenutzky et al., 2006). Il faut savoir que les patients atteints de cette forme ne réagissent pas aux traitements actuellement disponibles. Cette observation évoque que la forme primaire progressive peut être une maladie à part entière. Il existe enfin environ 5% des patients atteints de SEP qui développent une forme progressive avec poussées. Elle est caractérisée par une progression rapide du handicap dès le début avec une ou plusieurs poussées pendant la maladie (Eriksson et al., 2003; Hauser and Oksenberg, 2006).

Ces différentes présentations cliniques de la SEP augmentent la complexité de la maladie. Pour chaque étude, il est important de bien identifier les formes cliniques afin de bien orienter les études et d'établir des conclusions en tenant compte de cette diversité.

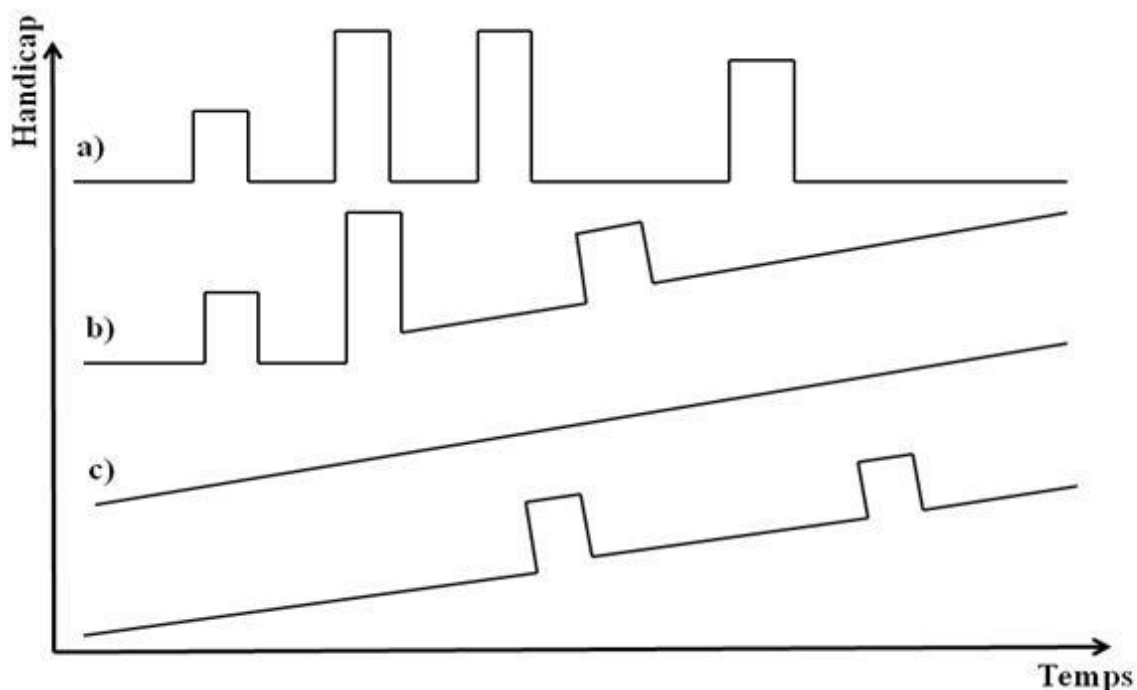


Figure 2: Evolution du handicap au cours du temps. Les trois formes sont : a) forme rémittente, alternance de poussées et de rémission. b) forme secondaire progressive, débute par des poussées suivies de phases de rémission avec une augmentation progressive du handicap. c) forme primaire progressive caractérisée par une progression du handicap dès le début de la maladie sans poussée ou avec poussées.

II. La SEP : une maladie auto-immune

1) Les différents arguments soutenant une composante auto-immune

La définition simple de l'auto-immunité est la rupture des mécanismes de tolérance au soi qui conduit à l'activation du système immunitaire contre des constituants autologues de l'organisme. Plusieurs arguments ont permis de mettre en évidence une composante auto-immune dans la SEP.

a) Les modèles animaux

Les premiers arguments soutenant l'hypothèse de maladie auto-immune proviennent des expériences effectuées sur les modèles animaux d'EAE. Dès 1933, il est noté que l'injection répétée d'extraits de cerveaux de lapins à des macaques entraîne des difficultés motrices et une démyélinisation chez deux des huit primates testés (Rivers et al., 1933). L'injection répétée d'extraits protéiques préparés à partir d'homogénats de cerveaux conduit aussi à des difficultés motrices associées à des infiltrats péri-vasculaires et à une dégénérescence de la myéline au niveau du cerveau et de la moelle épinière des animaux. Ce modèle a depuis été amélioré en ajoutant de l'adjuvant complet de Freund (CFA), qui stimule le système immunitaire, et la toxine pertussique (PTX), qui augmente la perméabilité de la barrière hématoencéphalique (BHE) (Hofstetter et al., 2002; Munoz et al., 1984). L'EAE est caractérisée par (1) la destruction de la gaine de myéline, (2) la présence d'immunoglobulines (Igs) dans le SNC et dans le LCR, (3) la présence de lésions au sein du SNC majoritairement localisées dans les zones périvasculaires du parenchyme cérébral et de la moelle épinière. L'EAE est étudiée sur un large panel d'espèces (le cochon d'Inde, le lapin, le marmoset, le macaque) mais plus communément sur le rat et la souris (Baxter, 2007) et déclenchée avec des antigènes différents en majorité dérivés de myéline comme la PLP, la MBP, la MOG. Près d'une vingtaine d'autoantigènes protéiques ont été utilisés pour induire une EAE. Il existe deux méthodes différentes d'induction d'une EAE, la méthode active (immunisation avec des extraits de SNC ou des antigènes purifiés) et la méthode passive (immunisation par transfert de LT autoréactifs activés *in vitro* ou provenant d'un animal malade) (Schroeter et al., 2003).

L'immunisation des rats lewis avec de la MBP par Ben-Nun a permis l'isolation de lignées pures de T CD4⁺ effecteurs anti-MBP (Ben-Nun et al., 1981a). Ces LT autoréactifs ont la capacité de transférer une EAE à des animaux naïfs mais des investigations plus précises sur ces cellules ont mis en évidence leur présence chez des rats naïfs non immunisés et sains

(Schluesener and Wekerle, 1985). Un autre modèle d'encéphalomyélite permet d'étudier des aspects précis de la maladie et est induit par un virus comme le Theiler virus qui reste le meilleur modèle viral (Ercolini and Miller, 2006; Theiler, 1934). L'obtention d'une encéphalomyélite dans ces modèles animaux induits par des virus apporte un argument expérimental en faveur de l'implication du facteur viral dans la pathologie (Soldan et Jacobson, 2001). Le virus de Theiler induit chez la souris, une encéphalite aigue suivie d'une infection de la substance blanche. Cette démyélinisation déclenchée grâce à une infection virale peut être expliquée par plusieurs mécanismes comme le mimétisme moléculaire ou un effet *bystander*. Le mimétisme moléculaire souligne une similitude entre un pathogène et un antigène du soi au niveau de la séquence en acides aminés ou de la structure conformationnelle. Des peptides viraux ou bactériens mimant la PLP ont été utilisés dans les modèles animaux mettant en évidence induction d'une maladie auto-immune expérimentale par mimétisme moléculaire (Carrizosa et al., 1998). L'EAE a permis de découvrir ou de confirmer certaines caractéristiques de la maladie : par exemple les souris transgéniques exprimant le HLADRB1*1502 développent une EAE sévère après immunisation avec de la MOG recombinante (rMOG) de rat (Khare et al., 2005), ce qui confirme le facteur de susceptibilité représenté par ce gène HLADR2 dans la SEP. Un autre exemple est le gène codant la chaîne α de l'IL-7 récepteur qui a été identifié comme facteur de risque pour développer une EAE chronique et plus tard décrit comme gène de susceptibilité dans la SEP (Sundvall et al., 1995). Beaucoup de travaux sur l'EAE nous ont permis de mettre en évidence l'implication de plusieurs facteurs dans la maladie. D'autres modèles d'EAE spontanée ont été utilisés pour étudier les aspects de la maladie sans tenir compte des facteurs liés au modèle classique comme l'adjuvant. Les souris H-2^u RAG1 déficientes expriment des T transgéniques spécifiques du peptide MBP₍₁₋₁₁₎. 100 % de ces souris développent une EAE de manière spontanée et seulement 14% d'incidence pour les souris transgéniques RAG1⁺. Ces résultats suggèrent que les T CD4⁺ pourraient contribuer au développement de la maladie *in situ* (Lafaille et al., 1994). Deux autres groupes ont décrit des souris doublement transgéniques qui développent spontanément une EAE ressemblant à la maladie de Devic humaine souvent considérée comme une forme de SEP. Ces souris possèdent des LT dont le TCR est spécifique d'un épitope de la MOG et environ 30% de ces LB possèdent un BCR spécifique de la MOG et secrètent des auto anticorps de la même spécificité (Bettelli et al., 2006; Krishnamoorthy et al., 2006).

Nous remarquons quand même que l'usage du modèle EAE a permis d'approfondir les connaissances sur la physiopathologie de la SEP et surtout d'explorer la place du système immunitaire dans le développement de la maladie. C'est un modèle qui a aidé au développement de nouveaux traitements utilisés maintenant en pratique courante chez les patients atteints de SEP bien que d'autres traitements ont été de grands échecs ne garantissant pas ainsi leur efficacité biologique chez l'homme (Wekerle, 2008).

Cependant ces modèles restent imparfaits car la SEP est une maladie complexe qui se présente et évolue de différentes manières donc il est impossible de représenter entièrement la maladie par un seul modèle animal. Les différentes variantes de la maladie humaine sont reproduites en fonction de l'auto antigène utilisé, de la souche animale et du mode d'immunisation (Storch et al., 1998).

b) Les données anatomopathologiques

Sur le plan clinique, le diagnostic d'une SEP est souvent définitif après une IRM permettant de visualiser les plaques de démyélinisation traduisant une lésion au sein du SNC. Les poussées et l'installation du handicap sont corrélées avec la formation de plaques détectables à l'IRM (Confavreux et al., 2000). L'autopsie de patients atteints de SEP ayant différentes formes de la maladie ont permis de mieux caractériser ces lésions constituées d'un infiltrat perivasculaire avec une expansion clonale de CD8⁺, et la présence de CD4⁺, de LT $\gamma\delta$, de monocytes alors que très peu de lymphocytes B (LB) et de plasmocytes sont présents (Babbe et al., 2000; Booss et al., 1983; Prineas and Wright, 1978). La présence de macrophages avec des débris de myéline phagocytés, de compléments et d'Igs a été aussi montrée par Prineas en 1978 dans les lésions actives de patients (Prineas and Wright, 1978). L'infiltrat enfin, est souvent localisé au bord de la plaque dans les lésions chroniques actives traduisant la présence de l'activité inflammatoire tout au long de la formation de la lésion (Lucchinetti et al., 1996). Ces données histopathologiques évoquent fortement une influence inflammatoire d'origine auto-immune dans la maladie déclarée.

Les lésions histologiques du tissu encéphalique de la SEP sont caractérisées par la destruction de la myéline, la mort des oligodendrocytes et la perte axonale. Une étude approfondie des données anatomopathologiques a permis à Lucchinetti de décrire 4 types différents de lésions (Lucchinetti et al., 2000). Ces différents types de lésions semblent hétérogènes d'un patient à l'autre mais homogènes au sein des lésions actives d'un même patient. Les types I et II présentent beaucoup de points communs comme la présence d'un infiltrat majoritaire en LT et

en macrophages dans les lésions. Ces lésions touchent le plus grand nombre de patients atteints de différentes formes de SEP. Le type I est caractérisé par la présence de macrophages activés qui pourraient induire la démyélinisation par la production de certaines molécules comme le TNF α (Hofman et al., 1989). Le type II est caractérisé par un dépôt d'anticorps et de complément C9neo-antigène au niveau des lésions actives, avoisinants les vaisseaux sanguins (Prineas and Graham, 1981). Les types I et II sont aussi observés dans le modèle animal (en fonction du fond génétique et de l'immunisation). Les types III et IV sont caractérisés principalement par un infiltrat majoritaire en LT, de macrophages associés à une dégénérescence des oligodendrocytes qui évoque l'effet d'un virus ou une toxine (Lucchinetti et al., 2000). La dégénérescence des oligodendrocytes peut être observée en analysant la répartition de la protéine myelin-associated glycoprotéin (MAG), la MBP ou la PLP pourrait refléter des premiers signes de dégénérescence des oligodendrocytes et leur éventuelle implication dans la démyélinisation (Itoyama and Webster, 1982). De manière plus précise, le type III touche les patients avec une SEP active de moins de 2 mois alors que le type IV touche les patients atteints de forme PP. Une étude plus récente sur du matériel autopsique de patients atteints de SEP suggère que l'hétérogénéité des lésions retrouvée par Lucchinetti est uniquement observée en début de maladie (Breij et al., 2008). Breij dans son étude a montré une homogénéité du type de lésions actives retrouvées chez les patients avec une SEP établie.

c) Les traitements

Aucun traitement curatif n'a été découvert pour la SEP, sans doute à cause de la complexité de la maladie et l'étiologie qui reste inconnue. Seuls les traitements ciblant la composante immunologique de la maladie ont montré des effets bénéfiques chez l'homme. Les stratégies thérapeutiques immuno-modulatrices ou immuno-suppressives font partie des deux grandes classes de traitements utilisés dans la SEP. Deux types d'immuno-modulateurs sont prescrits aux patients atteints de SEP. Les traitements de fond de première ligne s'appliquent aux patients qui débutent une SEP non chronique avec poussées. Si ces traitements ne sont pas tolérés ou n'ont pas d'effets bénéfiques sur la maladie, les traitements de deuxième ligne sont utilisés. Les traitements de fond permettent de stopper transitoirement l'évolution de la maladie.

Plusieurs traitements ciblant les cellules immunitaires ou les mécanismes de réponse immunitaire présentent des effets thérapeutiques importants confirmant le rôle de l'auto-immunité dans la SEP établie.

- ❖ **IFN- β** : c'est un membre de la famille des interférons (IFN) de type I. Cette molécule a des effets multiples sur l'organisme comme des effets sur la modulation des cellules présentatrices d'antigènes (CPA) en inhibant l'activation des monocytes (Van Weyenbergh et al., 1998), des cellules dendritiques en diminuant la production d'IL-12 (Bartholomé et al., 1999) et la production de cytokines anti-inflammatoires IL-10 (Rudick et al., 1996). Elle peut aussi moduler les voies d'apoptose et inhiber la migration à travers l'endothélium en diminuant l'expression de VLA4 (very late antigen-4) (Calabresi et al., 1997). Les patients traités par IFN- β présentent une baisse du nombre de poussées, une réduction des lésions et un ralentissement de la progression du handicap (Panitch and Bever, 1993). Cependant un nombre important de patients ne répond pas à ce traitement auquel sont associés beaucoup d'effets secondaires.
- ❖ **Copaxone** : La copaxone ou acétate de glatiramère est un polymère de 4 acides aminés avec un rôle protecteur dans l'EAE induite par injection de MBP (Teitelbaum et al., 1971). Chez les patients RR, le traitement par copaxone en général bien toléré, réduit considérablement l'évolution de l'EDSS donc le handicap et diminue de 30 % les poussées (Johnson et al., 1995). Cette molécule ralentit la progression de la maladie (Johnson et al., 2000) et conduit les LT vers un profil Th2 en périphérie mais aussi au niveau du SNC (Neuhaus et al., 2001) bien que aucun effet sur le répertoire T des patients traités à la copaxone n'ait été observée (Berthelot et al., 2010).

Le fingolimod, le natalizumab, le rituximab ou le mitoxantrone sont des traitements de fond de deuxième ligne.

- ❖ **Fingolimod (FTY720)** : Le fingolimod est le premier immunomodulateur oral admis comme traitement dans la SEP. Le FTY720 est un inhibiteur des récepteurs S1P, Sphingosine 1 Phosphate. Les récepteurs S1P sont portés par les LT mais aussi par les cellules du SNC comme les oligodendrocytes, les astrocytes et les neurones (Chun and Hartung, 2010). Cette thérapie réduit le nombre de LT naïfs et mémoires en périphérie. Chez les patients traités, une réduction de 30 % du handicap et de 54% du nombre de poussées par an est observée (Kappos et al., 2010). Cependant, le traitement par FTY720 peut causer des troubles cardiaux-vasculaires car les récepteurs S1P sont importants pour la vaso-régulation et le développement cardio-vasculaire (Chun and Hartung, 2010).

- ❖ **Natalizumab** : le natalizumab ou Tysabri® est un anticorps monoclonal ciblant la molécule d'adhésion VLA-4 contrôlant la migration des LT et LB à travers la BHE. Son effet a été observé dans les années 90 dans le modèle animal, où il réduit le développement clinique de l'EAE (Yednock et al., 1992). Cette thérapie réduit les poussées et les lésions actives chez les patients RR (Bielekova and Becker, 2010). Cependant, le cas de LeucoEncéphalopathie Multifocale Progressive (LEMP), une affection habituellement mortelle sous Natalizumab a été estimé à 1/1000 chez les patients atteints de SEP traités (Ransohoff, 2007; Yousry et al., 2006).
- ❖ **Mitoxantrone** : La mitoxantrone est un immunosuppresseur inhibant la prolifération des LT, LB et des macrophages en s'intercalant aux molécules d'ADN et d'ARN. La mitoxantrone semble également avoir des propriétés immunomodulatrices en diminuant le taux des cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF α , l'IL-2 et l'IFN γ (Fidler et al., 1986). Ce traitement est utilisé pour les formes agressives à évolution rapide. Chez les patients traités, cette thérapie diminue les poussées, le progression de la maladie et le nombre de lésions prenant le gadolinium (Edan et al., 1997). Ce traitement est cependant limité par son potentiel effet de toxicité cardiaque (Marriott et al., 2010).
- ❖ **Rituximab** : le RTX est un anticorps monoclonal ciblant le CD20 exprimé à la surface des LB durant leur développement du stade pré-B au stade de plasmablastes. Utilisé initialement dans les lymphomes, il a montré son intérêt dans les maladies auto-immunes telles que la polyarthrite rhumatoïde, le lupus et la SEP. Cette thérapie permet de dépléter efficacement les LB en périphérie et de manière moins importante dans les organes lymphoïdes secondaires (OLS) pendant 6 à 9 mois après la première dose (Reff et al., 1994). L'utilisation du RTX déplete aussi les LB et les LT dans le LCR des patients RR (Cross et al., 2006), ce qui est moins évident chez les patients PP (Monson et al., 2005). Cette observation suggère la coopération LB et LT dans le SNC. Cette thérapie entraîne une réduction des poussées et des lésions chez les patients atteints de SEP RR (Hauser, 2008). D'autres études avec des résultats similaires sont référencées dans la revue de Castillo-Trivino T (Castillo-Trivino et al., 2013).

Ainsi, beaucoup de traitements sont utilisés pour la SEP, chacun ayant une cible immunitaire précise ou des effets plus ou moins satisfaisants pour le patient. Le fait que ces traitements ciblent le système immunitaire et soient bénéfiques dans la SEP rémittente, est un argument soutenant la composante auto-immune de la maladie.

2) La physiopathologie de la SEP

a) Les hypothèses majeures de la SEP

Le rôle de l'autoimmunité en tant que facteur étiologique initial n'est pas solidement établi. Il existe plusieurs hypothèses mécanistiques pour expliquer le déclenchement de la maladie (Salou et al., 2013). **(1)** Cette hypothèse suggère une activation des LT Th1 (T helper) en périphérie par mimétisme moléculaire (présentation des épitopes de l'EBV proche de ceux de la myéline). Les LT Th1 activés vont ensuite migrer à travers la BHE par des mécanismes encore mal décrits et contribuer à la création d'un environnement inflammatoire. Cette activation va permettre le recrutement d'autres cellules immunitaires dans le SNC (Sospedra and Martin, 2005). **(2)** Une autre hypothèse met en avant un défaut de régulation chez les patients atteints de SEP. Les auteurs suggèrent que l'activation en périphérie des LT par mimétisme moléculaire ne va pas être atténuée par les mécanismes de régulation. Les LT Th17 premièrement, entreraient par les plexus choroïdes et permettraient après activation des cellules endothéliales, l'entrée des autres cellules immunitaires notamment les Th1 (Nylander and Hafler, 2012). **(3)** La troisième hypothèse prend en compte les composantes génétique, environnementale et immunitaire (Pender et al., 2012). L'infection à EBV dans cette hypothèse serait mal contrôlée par les LT CD8⁺ à cause d'un dysfonctionnement d'ordre génétique chez les patients prédisposés à la SEP. L'EBV va fragiliser la BHE (Casiraghi et al., 2011) et ainsi les LB infectés par EBV pourraient gagner le parenchyme cérébral. Les LB autoréactifs activeraient les LT autoréactifs grâce à des signaux de co-stimulation et la présentation antigénique entraînant ainsi une réaction inflammatoire locale. **(4)** Une autre hypothèse fait également intervenir le système immunitaire mais secondairement à une dégénérescence primaire de l'oligodendrocytes suivie d'un relargage des peptides myéliniques en périphérie entraînant une activation de celui-ci et les dommages associés (Barnett and Prineas, 2004). Récemment, une hypothèse a été publiée pouvant contribuer à la compréhension du développement de la SEP (Soulillou, 2013). **(5)** Dans cette hypothèse, la dérégulation de la perméabilité de la BHE coïncide avec l'augmentation des LT et des LB activés en périphérie qui agissent plus comme des amplificateurs de cette dérégulation que des initiateurs. Cette dérégulation favorisant l'entrée des cellules immunitaires dans le SNC est modulée par l'interaction Ag-anticorps dirigés contre des déterminants exprimés par les cellules endothéliales de la BHE (Soulillou, 2013). Les anticorps anti-Neu5Gc sont retrouvés chez l'homme (Padler-Karavani et al., 2008) et spécifiquement sur les cellules endothéliales du cerveau (Pham et al., 2009). Le neu5Gc est stocké dans les cellules endothéliales,

métabolisé et réincorporé par les glycoprotéines de la cellule. En présence d'anticorps et de complément, une inflammation locale et chronique pourrait se déclencher et entraîner l'entrée des cellules immunitaires dans le cerveau. L'EBV semble un bon candidat pour induire cette réponse immunitaire car lors de la MNI le taux d'anticorps anti-Neu5Gc est élevé (Burgio and Monafó, 1983) souvent accompagné d'une forte augmentation des LT dirigés contre EBV en périphérie (Pender, 2011).

La SEP est une maladie ayant une composante auto-immune. Les cellules immunitaires comme les LT, les LB sont des acteurs majeurs de cette composante. Il est important de comprendre leur implication dans la maladie.

b) Implication des LT dans la SEP

Pendant longtemps, la SEP a été considérée comme une maladie essentiellement médiée par les LT CD4⁺. La présence de ces cellules dans les lésions du SNC a conforté cette idée. Le transfert dans une souris naïve de LT CD4⁺ reconnaissant des protéines dérivées de la myéline comme la MBP, induit une EAE (Pettinelli and McFarlin, 1981). Une autre étude sur l'EAE a montré que la répartition des lésions retrouvées dans le SNC pouvait être le reflet des différentes réponses LT dirigés contre les protéines de la myéline (Berger et al., 1997). De même en étudiant les effets thérapeutiques d'un ligand (peptide altéré) mimant le peptide immunogène MBP₍₈₃₋₉₉₎ reconnu par les CD4⁺ chez des patients, Bielekova remarque par IRM une aggravation des lésions chez les patients ayant reçu le ligand. Ce résultat met en évidence l'impact des LT CD4⁺ anti-MBP dans le développement des lésions (Bielekova et al., 2000). Comme décrit précédemment, des études génétiques ont identifié plusieurs gènes de susceptibilité dont certains codent des molécules du CMH de classe II. Le CMH II présente des molécules aux LT CD4⁺ et des études sur souris humanisées transgéniques ont confirmé cet argument. Il a été observé un développement d'EAE spontanée chez des souris humanisées HLADR2 et avec un TCR transgénique spécifique de la MBP. De plus, l'EAE spontanée est augmentée sur des souris RAG2 *recombination-activating genes 2* (Madsen et al., 1999).

Implication des LT Th1 : Les cellules T Th1 sont pro-inflammatoire, elles sécrètent en majorité de l'IFN γ mais aussi du TNF α , du TNF β et de l'IL-2. L'IL-12, constitué de deux sous-unités (SU) IL-12p40/IL-12p35, est une cytokine importante pour la différenciation des Th1. Dans la SEP, le taux d'IL-12 et d'IFN γ augmente dans le parenchyme et dans le LCR et cette augmentation est corrélée à la sévérité de la maladie (Gutcher and Becher, 2007). L'IL-

12 et l'IFN γ induisent l'expression des CMH I, II au sein du SNC et le recrutement de monocytes et macrophages (Gutcher and Becher, 2007). Ces derniers, une fois activés, vont induire une réponse pro-inflammatoire dans le SNC à l'origine d'une perte axonale dans l'EAE (Olsson, 1992). Une résistance à l'EAE est observée chez les souris déficientes en IL-12p40, mettant en évidence le rôle des CD4⁺ Th1 (Segal and Shevach, 1996). Ce résultat est difficile car l'IL-23 partage la même sous-unité que l'IL-12 (IL-12p40).

Implication des LT Th17: L'IL-23 est produite par les macrophages et les cellules dendritiques et a un effet sur les T mémoires et les macrophages. C'est une cytokine importante pour le développement des T CD4⁺ sécrétrices d'IL-17, les CD4⁺ Th17 (Korn et al., 2009). Des souris transgéniques IL-12-p40 ^{-/-} et IL-23-p19 ^{-/-} sont résistantes à EAE alors que les souris transgéniques IL-12p35 ^{-/-} sont sensibles ((Becher et al., 2002; Cua et al., 2003). L'IL-23 a donc un rôle important dans le développement d'une EAE. De plus, le transfert adoptif de cellules Th17 provoque une EAE plus sévère que celui effectué avec des cellules Th1 (Langrish et al., 2005). Les souris IL-17 ^{-/-} développent une EAE moins sévère que les WT, bien que le début de la maladie soit identique dans les deux groupes (Komiyama et al., 2006). Des expériences dans l'EAE ont montré la capacité d'une sous-population de Th17 sécrétrice d'IFN γ à migrer dans le SNC à travers la BHE pendant la phase effective de la maladie (Kebir et al., 2009). Dans la SEP, Matusевичius D a quantifié l'ARNm de l'IL-17 par hybridation *in situ* dans le sang et dans le LCR. L'augmentation d'ARNm d'IL-17 est plus forte dans le LCR des patients par rapport au sang. Dans le sang, l'augmentation est plus forte pendant les poussées (Matusевичius et al., 1999). Une population de T Th17 sécrétrices d'IFN γ dans les lésions de patients rémittents a été identifiée (Kebir et al., 2009). L'IL-17 joue donc un rôle important très vraisemblable dans le développement de la maladie.

Implication des T CD8⁺: Chez l'homme, les LT CD8⁺ sont retrouvés en majorité dans les lésions par rapport aux CD4⁺ (Babbe et al., 2000; Friese and Fugger, 2009; Goverman, 2009). Les LT CD8⁺ par leurs effets cytotoxiques semblent être mieux disposés à causer des lésions au sein du SNC par rapport aux CD4⁺ (Sospedra and Martin, 2005). Les infiltrats de LT CD8⁺ présentent une répartition oligoclonale et sont retrouvés dans plusieurs endroits du cerveau (Junker et al., 2007). Ces observations suggèrent une sélection dépendante de l'antigène et l'implication des CD8⁺ dans la SEP. *In vitro*, des études ont montré que les CD8⁺ cytotoxiques pouvaient être à l'origine de la transection axonale (Neumann et al., 2002). En effet, en condition inflammatoire, les axones, les oligodendrocytes et les neurones peuvent produire des molécules de CMH I ce qui fait de ces cellules des cibles potentielles pour la lyse

par les CD8⁺ cytotoxiques (Sospedra and Martin, 2005). La présence de CD8⁺ produisant de IL-17 a été aussi mise en évidence dans les lésions actives chez l'homme (Tzartos et al., 2008) mais le rôle de ces cellules reste à définir. Récemment une sous-population de CD8⁺ CD161^{high} a été décrite, ce sont des cellules MAIT, Mucosal associated invariant T. Ces cellules portent un TCR invariant reconnaissant des motifs bactériens (Le Bourhis et al., 2010) et ont été décrits dans la SEP (Miyazaki et al., 2011).

Implication des T régulateurs (Tregs): Ce sont des cellules aux propriétés suppressives. Il existe différents types de LT régulateurs : les Tregs naturelles (nTregs) sont générés dans le thymus et sont des cellules importantes dans le maintien de la tolérance au soi et les T regs induites (iTregs). Elles expriment de manière constitutive la chaîne α du récepteur à l'IL-2, le CD25 (Sakaguchi et al., 1995) qui est aussi un marqueur des cellules activées. D'autres marqueurs ont été identifiés bien qu'ils ne soient pas spécifiques du phénotype régulateur: le GITR (Glucocorticoid-Induced TNF Receptor), le CD45RO (Cellules mémoires), le CD134 (OX40), le CD103 (Intégrine $\alpha E\beta 7$), le CD122 (Chaîne β du récepteur à l'IL-2), le CD62L (L-sélectine) et le CD152 ou le CTLA-4 (Cytotoxic T-Lymphocyte antigen 4). Récemment, le facteur de transcription FoxP3 (Forkhead box P3) a été identifié comme marqueur des T regs naturels (Fontenot et al., 2003). Cependant, ce marqueur ne permet pas d'isoler les Tregs à cause de sa localisation intracellulaire. FoxP3 joue un rôle important dans le maintien de la fonction suppressive des T regs (Hori et al., 2003). Dans l'EAE, le transfert adoptif de LT CD4⁺CD25⁺ isolés à partir de ganglions lymphatiques de souris naïves réduit l'incidence et la sévérité de la maladie (Kohm et al., 2002; Zhang et al., 2004). Les cellules régulatrices CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ semblent être impliquées dans la rémission de la maladie car une accumulation de LT CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ dans le SNC corrèle avec la rémission de la maladie chez des souris EAE induites avec la MOG (McGeachy et al., 2005). Une étude plus récente sur la coopération entre LB et LT régulateurs suggère que les LB seraient essentiels dans le contrôle de l'induction initiale de la maladie expérimentale et les LT régulateurs favoriseraient plus l'entrée en rémission (Matsushita et al., 2010). Certaines études ont montré une fonction régulatrice altérée dans la SEP (Astier et al., 2006; Kumar et al., 2006; Viglietta et al., 2004) même si toutes les études retrouvent une fréquence identique de CD4⁺CD25⁺ entre patients et témoins (Feger et al., 2007; Haas et al., 2005; Viglietta et al., 2004). Une autre étude a confirmé ce défaut de suppression mais aussi une diminution des transcrits Foxp3 dans les cellules (Venken et al., 2008). Ce défaut ne concerne que les patients atteints de SEP RR car il n'est pas retrouvé chez les patients ayant une forme SP. Le défaut de

suppression observé dans la SEP pourrait expliquer l'échappement des LT autoréactifs et le développement de la maladie. Cependant ce défaut de régulation dans la SEP est controversé (Michel et al., 2008). Dans cette étude, notre équipe a montré que les T regs $CD4^+CD25^{high}CD127^{low}$ des patients rémittents avaient une fonction régulatrice identique à ceux des témoins sains lorsqu'ils sont sélectionnés. Le CD127 est la chaîne α de l'IL-7 récepteur, présents sur les LT activés mais pas sur les T regs (Liu et al., 2006). Le défaut de suppression des T regs des patients atteints de SEP observé précédemment peut être dû à la sélection des T regs et à une activation anormale du CD127 chez les patients (Michel et al., 2008).

Implication des T spécifiques d'un antigène dérivé de la myéline: Plusieurs études ont analysé la fréquence des LT autoréactifs en périphérie. Les résultats obtenus sont contradictoires, certains trouvent une augmentation (différence quantitative) de la fréquence des LT autoréactifs chez les patients atteints de SEP (Bahbouhi et al., 2010; Pender et al., 2000), d'autres ne trouvent aucune différence quantitative (Berthelot et al., 2008; Hellings et al., 2001) mais plus une différence qualitative (Chou et al., 1992; Zhang et al., 1994). Il semblerait que les LT autoréactifs des patients ont un état d'activation plus élevé que ceux des témoins. Des méthodes d'analyse différentes, des ags différents, les approches différentes rendent certainement compte des résultats discordants. Cette analyse est reportée dans la revue que j'ai réalisée et qui est présentée en annexe (Elong Ngonu et al., 2012). En effet, dans cette revue, les différentes techniques pour caractériser les LT autoréactifs sont décrites. En plus, l'utilisation de la technique TRAP, *T cell recognition of APC by Protein transfer* adaptée dans la SEP par notre équipe et l'utilisation d'un antigène complet (extrait de myéline humaine) (Bahbouhi et al., 2010) semble être une nouvelle approche plus sensible et spécifique pour évaluer les LT reconnaissant des épitopes de la myéline et comprendre leur implication dans la SEP.

c) Implication des LB dans la SEP

L'implication des LB dans la SEP a moins été étudiée que celle des LT. La présence des LB, des plasmocytes et des anticorps a été mise en évidence dans les lésions histologiques de patients atteints de SEP (Esiri, 1977; Genain et al., 1999; Gerritse et al., 1994), suggérant leur implication dans la pathogénéicité. L'implication des LB dans la SEP semble probable comme le suggèrent la synthèse intrathécale d'Igs oligoclonale dans le LCR de 90% des patients atteints de SEP (Freedman et al., 2005; KABAT et al., 1948), la présence au sein des méninges des structures similaires aux follicules B chez 40 % des patients ayant une forme

secondairement progressive (Magliozzi et al., 2007), la découverte que ces LB présents dans les follicules ectopiques sont infectés par l'EBV (Franciotta et al., 2008) et aussi l'efficacité thérapeutique des anti-CD20 sur les patients ayant une forme RR (Hauser et al., 2008). L'implication des B dans la SEP peut mettre en jeu différentes fonctions des LB : (1) la capacité à produire des anticorps après différenciation en plasmocytes, (2) la capacité à présenter des antigènes à des LT autoréactifs par la molécule du CMH II et (3) celle de produire des cytokines anti/pro-inflammatoire selon le contexte immunologique. La partie trois de cette introduction est réservée aux lymphocytes B, j'aborderai de manière détaillée l'implication des LB dans la SEP.

d) La barrière hémato-encéphalique et la transmigration leucocytaire

La barrière hématoencéphalique a été décrite pour la première fois par Paul Ehrlich en 1885. Ce physiologiste lors d'une expérience a injecté en circulation à une souris du colorant vital qui a diffusé partout dans l'organisme sauf dans le cerveau. Ce n'est qu'en 1913, lorsqu'Edwin en faisant la même expérience au sein du LCR montre que la coloration diffuse dans le liquide mais pas dans le système nerveux périphérique (Golmann, 1913). Ces observations mettent en évidence l'existence d'une barrière entre le sang et le SNC. Une autre étude plus tard spécifie sa localisation au niveau des capillaires (Reese et Karnovsky, 1967). C'est une membrane constituée de cellules endothéliales qui a pour fonction la régulation des échanges d'ions, de molécules, de cellules entre le sang et le SNC. Elle a comme particularité d'être quasi-imperméable aux molécules et substances circulant dans l'organisme ce qui lui confère le rôle très important d'isolement et de protection du cerveau. Le SNC a été considéré pendant longtemps comme un organe immunoprivilégié mais plusieurs arguments aujourd'hui le décrivent plus comme un site immunologique spécialisé (Ransohoff et al., 2003). L'homéostasie du SNC est assurée par la BHE ayant plusieurs interfaces et assurant son rôle de protection entre le cerveau et la périphérie. Ces interfaces possèdent des propriétés anatomiques et immunologiques bien précises. La faible perméabilité est due à sa structure, car la BHE est constituée de cellules endothéliales vasculaires ayant des jonctions dites serrées associées à des péricytes et des pieds astrocytaires (Abbott, 2006). Seules les petites molécules ou les substances lipophiles peuvent diffuser à travers la membrane endothéliale selon leur gradient de concentration (Grieb et al., 1985). Les cellules endothéliales de la BHE diffèrent de celles retrouvées dans les tissus non-neuronaux grâce à leurs fortes polarisations dues aux jonctions serrées entre elles. Ces jonctions ont une très grande importance pour limiter le passage de molécules ou d'ions entre les cellules endothéliales. L'altération des

fonctions de la BHE est un facteur très important dans le développement des pathologies neurologiques. Les différentes interfaces sont la barrière sang-LCR et la barrière sang-cerveau (**Figure 3**).

La barrière sang-parenchyme cérébral est localisée au niveau des vaisseaux cérébraux. Elle est constituée de cellules endothéliales qui diffèrent des autres cellules endothéliales de l'organisme par l'absence de fenestration et la présence de jonctions serrées. L'endothélium de la BHE repose sur une lame basale, composée de laminines, de collagène de type IV, de fibronectine et de protéoglycanes. Cet endothélium et sa lame basale sont entourés de péricytes et d'un réseau de pseudopodes astrocytaires qui vont isoler le réseau vasculaire au sein même du SNC (Rubin and Staddon, 1999).

La Barrière sang-Liquide céphalo-rachidien (LCR) est localisée au niveau des plexus choroïdes. Elle est constituée de cellules endothéliales et de cellules épithéliales. A la différence de la barrière sang-parenchyme cérébral, les cellules endothéliales sont fenestrées et n'assurent pas la fonction de barrière. Cette fonction est assurée par les cellules épithéliales épendymaires en contact direct avec le LCR (Engelhardt and Sorokin, 2009). Leur fonction de barrière est assurée par la présence des jonctions serrées composées par de claudines, d'occludines et de la protéine Zona occludens 1 (Wolburg et al., 2001).

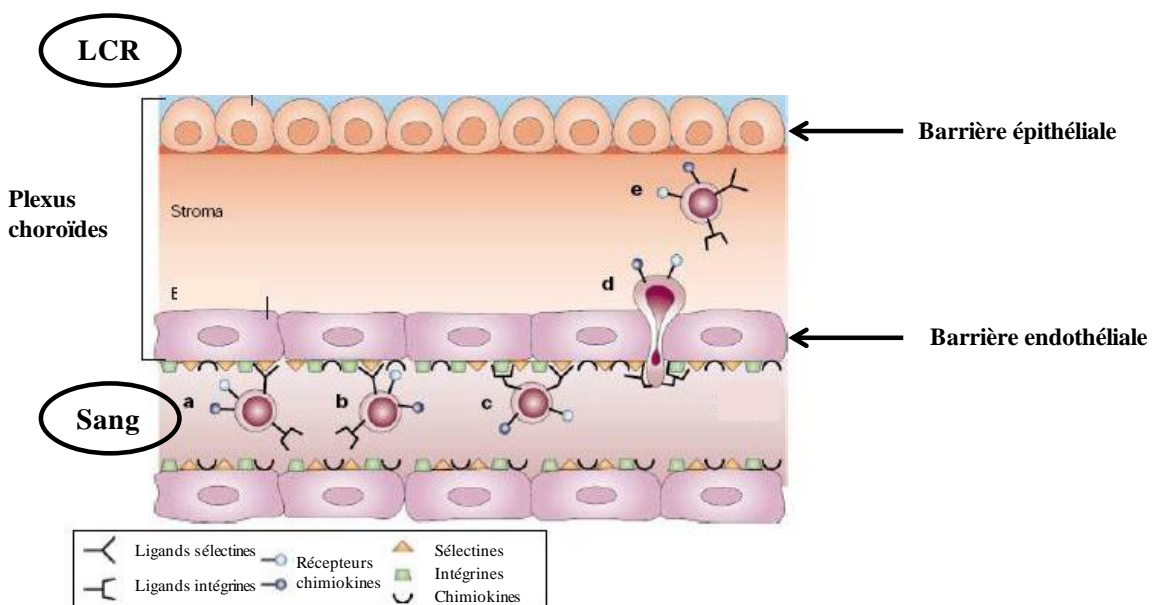


Figure 3 les différentes interfaces de la barrière hématoencéphalique : Les lymphocytes peuvent rejoindre le LCR en traversant deux barrières. La première est la barrière endothéliale et la seconde est la barrière épithéliale. A,b,c,d sont des étapes de la transmigration leucocytaire détaillées à la figure 4, adapté de Ransohoff, 2003, Nature reviews

Le LCR considéré comme du plasma ultra filtré à cause de sa composition avoisinante celle du plasma est produit par les cellules épithéliales sécrétrices des plexus choroïdes. Il circule entre les ventricules et l'espace sous-arachnoïde (au niveau des méninges entre la membrane arachnoïde et la pie mère). Le volume du LCR est un système régulé. Il permet d'assurer des échanges nutritifs avec les tissus nerveux, et peut agir comme un réservoir régulateur du volume encéphalique. Le LCR est constitué à 90% d'eau et ions facilités par la présence de canaux aqueux tels que l'aquaporine (Speake et al., 2003) et de transporteurs ioniques. Le tissu cérébral n'étant pas accessible facilement pour faire avancer la recherche, le LCR pourrait permettre d'avoir un reflet du SNC. Concernant les LB, une étude a montré récemment que des clones B spécifiques d'antigènes étaient partagés entre les deux compartiments (LCR-SNC) et pouvaient être retrouvés dans le sang (von Büdingen et al., 2012).

❖ La transmigration leucocytaire

Dans un cerveau sain, les cellules endothéliales de la barrière limitent le passage des leucocytes et la circulation des substances à travers le SNC comme décrit ci-dessus. Dans des conditions de maladies neurologiques telles que la SEP, l'altération de la BHE a pour conséquence la migration des leucocytes à travers le SNC (Lou et al., 1997). La migration leucocytaire induit en retour une cascade de signaux de transduction importante pour la perte des jonctions serrées et la rupture de la BHE (Bolton and Holland, 1998). Il existe trois principales voies empruntées par les leucocytes (Ransohoff et al., 2003).

Première voie : Les cellules transmigrent du sang vers le LCR à travers les cellules endothéliales fenestrées des plexus choroïdes. Ce mécanisme semble avoir une importance physiologique car dans le LCR d'individus sans histoire neurologique, il est retrouvé environ 1.10^6 leucocytes/litre de LCR composés en majorité d'un phénotype $CD4^+$ mémoire central ($CD27^+CD45RO^+$) et de 1% de lymphocytes B (de Graaf et al., 2011). Cette voie utilise les molécules d'adhésion de la famille PECAM.

Deuxième voie : La migration des leucocytes de la circulation sanguine à l'espace sous-arachnoïdien, ils utilisent deux mécanismes, le roulement et l'adhésion pour transmigrent. Ces mécanismes utilisent les molécules d'adhésion P-selectine et surtout les $\alpha4$ intégrines. Les leucocytes migrent des micro-vaisseaux post capillaires de la surface de la pie mère vers les

espaces sous-arachnoïdiens et péri-vasculaires de Virchow-Robin, où ils vont pouvoir interagir avec les CPA.

Troisième voie : Migration des leucocytes du sang à l'espace péri-vasculaires parenchymateux, où ils entrent directement dans le parenchyme. Cette voie utilise les molécules d'adhésion PSGL1.

La transmigration des cellules à travers le SNC nécessite une procédure bien particulière comme le montre la **figure 4**. Cette procédure est constituée de 4 étapes : (1) l'enroulement et l'attachement, (2) le roulement (3) l'adhésion aux cellules de la membrane (4) la diapédèse. Les chimiokines induisent et activent adhésion des leucocytes aux cellules endothéliales. Elles établissent un gradient chimiotactique permettant le recrutement à travers la BHE.

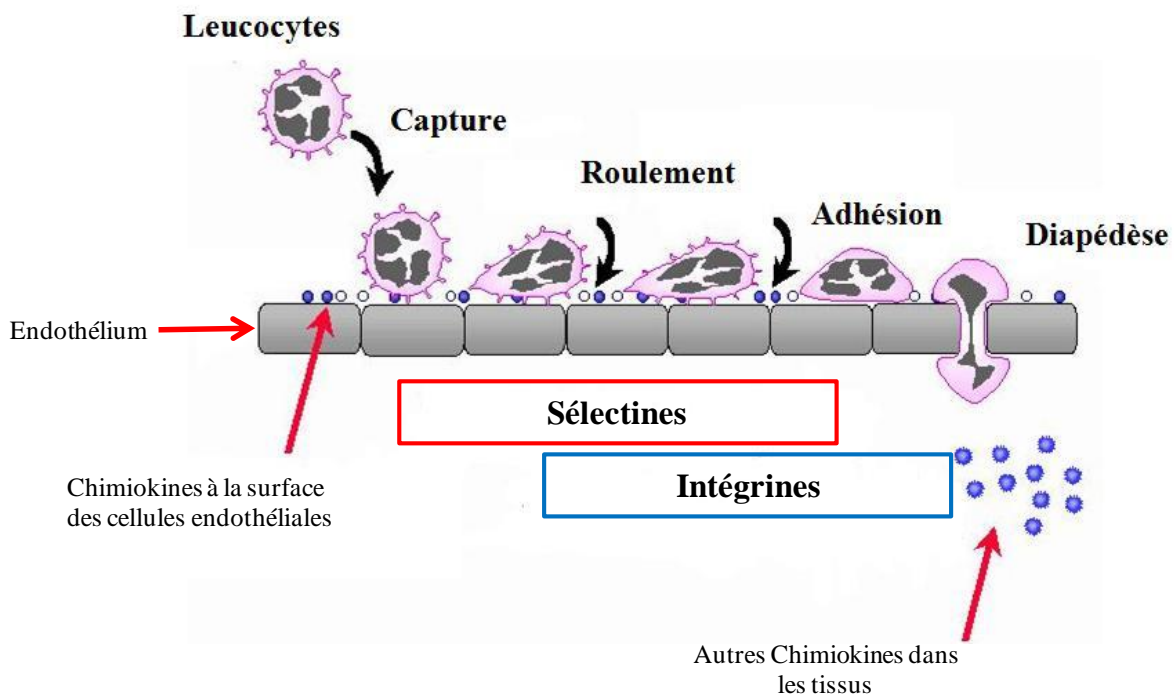


Figure 4 Transmigration leucocytaire: La transmigration des leucocytes se déroule en 4 étapes. (1) capture ou enroulement sur l'endothélium, les leucocytes sont attirés par les chimiokines. (2) le roulement des leucocytes à la surface de l'endothélium caractérisé par l'activation des intégrines. (3) l'adhésion et (4) la diapédèse qui permet le passage du leucocyte des capillaires aux tissus.

La migration des cellules immunitaires est en majorité régulée par les chimiokines (Nelson and Krensky, 2001). Il existe deux types de chimiokines: les chimiokines inflammatoires qui induisent la transmigration vers les tissus inflammés et les chimiokines régulatrices qui vont maintenir l'homéostasie migratoire vers les organes lymphoïdes (Krumbholz et al., 2006) . Les études dans la SEP au niveau des lésions ont montré l'implication dans le développement des lésions des chimiokines inflammatoires comme le CXCL10, le CCL5, le CCL4 (Simpson

et al., 2000; Sørensen et al., 1999) qui concernent en majorité les monocytes et les LT mais aussi le CXCL12 et le CXCL13 qui favorisent la migration des LT et des LB dans le SNC (Krumbholz et al., 2006). Dans la SEP, la transmigration des LB à travers la BHE n'a pas beaucoup été étudiée même si plusieurs études ont mis en évidence la production intrathécale d'anticorps spécifiques au sein du LCR (Baranzini et al., 1999). Une équipe américaine a montré *in vitro* que les LB d'individus sains migrent plus efficacement que les LT (Alter et al., 2003).

e) Les auto-antigènes impliqués dans la SEP

La présence de cellules autoréactives dirigés contre des Ags dérivés de la myéline pouvant être responsable de la démyélinisation dans la phase active de la maladie a été montré précédemment. Existe-t-il un unique antigène caractéristique de la SEP ? Un grand nombre d'antigènes dérivés de la myéline présent dans la substance blanche du SNC ont montré leur capacité à induire une EAE. De plus, les études sur les anticorps ou sur les LT auto-réactifs ont identifié d'autres Ags du SNC comme des Ags potentiels de la maladie. Les antigènes dérivés de la myéline les plus utilisés sont:

ProteoLipid Protein (PLP) et Myelin Basic Protein (MBP) : Ce sont les protéines les plus abondantes de la myéline (50% et 25% des protéines de la myéline). Elles sont retrouvées dans le SNC mais aussi dans le Système nerveux périphérique (SNP) non atteints dans la SEP. La PLP est une protéine très hydrophobique de 30 KDa avec un isoforme connu sous le nom de DM20. Plusieurs peptides de la PLP sont immunogènes mais le peptide ₍₁₃₉₋₁₅₁₎, absent de la DM20 est le plus immunogène (Kennedy et al., 1990).

Myelin Associated Glycoprotein (MAG) et Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein (MOG) : La MAG est une glycoprotéine localisée à l'intérieur de la gaine de myéline. Elle constitue 1% de la myéline du SNC et est très peu abondante dans le SNP. Certains peptides de la MAG se sont avérés très encéphalogéniques. Dans la SEP, La MAG entraîne une réponse T et B élevée par ELISPOT (Andersson et al., 2002).

La MOG est une protéine de 28 KDa chez l'homme pouvant former un dimère de 55 KDa. La MOG est une glycoprotéine mineure de la myéline appartenant à la superfamille des Igs à cause de son domaine extracellulaire ressemblant à la partie variable d'une Ig. Elle représente 0.01 à 0.05% des protéines totales de la myéline. La MOG, contrairement à la PLP et à la MBP, est restreinte au SNC (Johns and Bernard, 1999). Le bar et ses collègues ont proposé pour la première fois que la démyélinisation observée dans l'EAE après injection

d'homogénats pouvait être induite par une protéine de la myéline connu sous le nom de M2 plutôt que par ses composants majeurs tels que la PLP ou la MBP (Lebar et al., 1976). Plus tard, Linington va en 1984 par une étude comparative entre la M2 et la MOG montrer que la M2 est identique à la MOG et ainsi l'identifier comme un antigène potentiel de la SEP sur le fait de son action dans le modèle animal EAE. En effet, L'induction d'EAE par injection de MOG native, recombinante, de peptides ou de T anti-MOG induit le développement de caractéristiques cliniques, pathologiques et immunologiques évoquant la SEP (Linington et al., 1993). Le développement d'un anticorps 8-18C5 reconnaissant la MOG a permis d'étudier plus spécifiquement sa structure. Ainsi, il est reporté que la MOG s'exprime préférentiellement à la surface de la gaine de myéline (Brunner, 1989) et peut servir de marqueurs de maturation des oligodendrocytes par son expression tardive (Scolding et al., 1989). Son expression à la surface de la gaine de myéline pouvant la rendre plus facilement accessible aux anticorps, est l'argument qui plaiderait en faveur de sa pathogénéicité. La MOG a certaines fonctions physiologiques : Chez le rat, elle intervient dans le développement et la réparation de la myéline (Li et al., 2002a). Elle peut aussi intervenir dans l'adhésion cellulaire par la présence en son domaine de type Ig de l'épitope L2/HNK-1 (Burger et al., 1993), un acide glucuronique sulfaté lié aux résidus lactosamines impliqués dans les mécanismes d'adhésion cellulaire (Quarles, 1997). Elle peut aussi grâce à sa structure d'Ig se lier de manière dose-dépendante au C1q et pourrait ainsi activer la voie classique du complément (Johns and Bernard, 1997).

Une étude récente a identifié un nouvel antigène potentiel chez les patients atteints de SEP.

Kir4.1 : C'est une sous-unité des canaux potassiques K^+ . Cette sous unité KIR4.1 est exprimée en majorité mais pas exclusivement (Li et al., 2001) par les cellules gliales du SNC (Takumi et al., 1995). KIR4.1 est important pour le développement de la moelle épinière et la maturation des oligodendrocytes. Les souris Knock Out (KO) KIR4.1 -/- présentent de sévères problèmes moteurs causés par une démyélinisation et une dégénérescence axonale (Kofuji et al., 2000; Neusch et al., 2001). Une étude récente a décrit la réponse anticorps anti- KIR4.1 dans le sérum de patients atteints de SEP et mis en évidence la présence d'IgG1 et IgG3 qui se lient aux cellules gliales dans les tissus cérébraux. 47% des patients atteints de SEP ont des IgG anti KIR4.1 alors que seulement 1% des patients avec d'autres maladies neurologiques et aucun témoin sain (Srivastava et al., 2012). Bien que cette étude ne montre pas directement l'action des anticorps KIR4.1 dans la démyélinisation, leur action peut être indirectement suggérée. Srivastava a montré que l'injection d'anticorps KIR4.1 dans le

cerveau des souris réduit le taux de KIR4.1 localement (Action Anticorps-Complément). Il est possible de penser que la présence de ces anticorps pourrait être due à une action sur les canaux KIR4.1 localisés sur les astrocytes, ce qui pourrait induire une démyélinisation. De plus, cette molécule est proche de l'aquaporine 4 (AQP4) exprimée au niveau des astrocytes, un autoantigène identifié dans la maladie de Devic, une maladie longtemps considérée comme une forme de SEP avant la découverte des autoanticorps anti AQP4 (Lennon et al., 2005). L'action démyélinisante des anticorps anti-AQP4 a été mis en évidence *in vitro* par Hinson (Hinson et al., 2012). La fréquence élevée d'anticorps anti KIR4.1 dans le sérum des patients fait de cette molécule un antigène potentiel de la SEP. Tout de même, le fait que cet anticorps manque chez 50 % des patients questionne toujours sur son rôle étiologique.

D'autres travaux se sont intéressés à des glycoprotéines axo-gliales. Une étude a montré que des T spécifiques de la **contactin-2/TAG-1** avaient la capacité d'induire une EAE (Derfuss et al., 2009) et une autre a mis en évidence la présence d'Ac dirigés contre la **neurofascine** (Mathey et al., 2007). Une équipe a trouvé des Ac anti-**dérivés oxydés de cholestérol** dans le sérum des patients (Quintana et al., 2008), une autre étude a montré qu'une co-immunisation de **sulfatides** et d'anticorps anti-sulfatides aggravait la maladie chez des souris EAE induites avec le peptide PLP₍₁₃₉₋₁₅₁₎ (Kanter et al., 2006). Les sulfatides sont des composants lipidiques majeurs de la gaine de myéline qui semblent avoir un rôle pathologique dans la démyélinisation au niveau du SNC (Jeon et al., 2008). D'autres antigènes lipidiques ont été étudiés mais aucun ne semble être la cible principale de la réponse immunitaire observée dans la SEP.

Plusieurs antigènes sont étudiés dans la SEP, la littérature nous montre une grande diversité d'antigènes myéliniques ayant des effets plus ou moins immunogènes. Bien que la liste soit exhaustive plusieurs antigènes sont utilisés dans l'EAE et dans des études sur la SEP pour nous permettre d'éclaircir des zones d'ombres. Une approche plus récente dans notre équipe a montré que l'utilisation d'un **extrait totale de myéline humaine** (Voir annexe pour la composition) pourrait abroger les résultats souvent contradictoires dus à l'utilisation d'Aggs myéliniques différents pour une question commune (Bahbouhi et al., 2010). Ces résultats confirment que la gaine de myéline est une cible dans la SEP mais y a-t-il une cible plus précise ? La MOG semble être un Ag myélinique approprié pour nous permettre de comprendre certains points mécanistiques de la maladie, cependant aucune protéine ne semble être la cible principale.

III. Les lymphocytes B dans la SEP

Le lymphocyte B (LB) est une cellule centrale dans la réponse immunitaire humorale ou cellulaire contre divers pathogènes. Un défaut dans le processus ontogénique des cellules B peut altérer la différenciation et l'homéostasie B et contribuer au développement des maladies auto-immunes.

1) Généralités sur les lymphocytes B

a) Le BCR

Le BCR, récepteur porté par les LB, est un complexe composé de trois parties, une partie extracellulaire, une partie transmembranaire et une partie intracellulaire, comme le montre la **figure 5**. La partie extracellulaire N terminale est composée de quatre chaînes polypeptidiques reliées par des ponts disulfures intra-chaînes et inter-chaînes formant l'Ig membranaire (Igm), élément de reconnaissance de l'Ag. L'Igm associé à un hétérodimère $Ig\alpha$ - $Ig\beta$ est nécessaire pour l'expression du BCR à la surface (Flaswinkel and Reth, 1994). L'Igm peut être une IgM, une IgD ou une IgG, IgA ou IgE après activation par un LT (Yankee and Clark, 2004). La reconnaissance de l'Ag va transmettre un signal d'activation à l'intérieur de la cellule à travers l'hétérodimère $Ig\alpha/Ig\beta$ (Cambier et al., 1994; Venkitaraman et al., 1991). Ce rôle est possible grâce à la présence intracellulaire d'une molécule *Immunoreceptor Tyrosine-based activation motif* ITAM (Yao et al., 1995). Une étude a montré qu'une mutation ou une délétion du motif ITAM $Ig\alpha$ modifiait le signal du BCR (Flaswinkel and Reth, 1994). Les motifs ITAM sont aussi responsables de la communication entre le BCR et les protéines cytoplasmiques, les tyrosines kinases (PTK) (Flaswinkel and Reth, 1994; Law et al., 1993). Ce sont les PTK qui initient le signal BCR en phosphorylant les tyrosines du motif ITAM servant de site d'ancrage pour le complexe de signalisation (Fuentes-Pananá et al., 2004). Le signal BCR semble important pour le développement et la fonction des LB (Torres et al., 1996). Le signal BCR est augmenté par son association à un co-récepteur constitué de 3 molécules : le CD21 ou CR2, le CD81 et le CD19. Les souris CD19^{-/-} ont une réponse B déficiente contre la plupart des Ags. Le CD19 semble donc très important pour les LB (Charles A Janeway et al., 2001). Le signal du BCR est modulé par la tyrosine phosphatase CD45 et le co-récepteur CD22. En effet, chez les souris CD45^{-/-}, le signal BCR est faible contrairement à un signal fort observé chez les souris CD22^{-/-} (Cyster et al., 1996). Le signal BCR peut être régulé de manière négative par le CD22 qui régule la mort cellulaire et la

réponse T indépendante (Cyster and Goodnow, 1997) ou indirectement par des PTK comme Lyn qui vont phosphoryler et activer le CD22 (Nishizumi et al., 1998). Les différents stades d'expression du BCR seront abordés lors du développement des LB dans la moelle osseuse.

Pendant le développement, les LB sont sélectionnés en fonction de l'affinité et des caractéristiques fonctionnelles du BCR. Cette sélection peut favoriser le développement du LB avec un BCR fonctionnel (**sélection positive**) ou favoriser l'élimination des LB capables de répondre à auto-antigène (**sélection négative**) (Fuentes-Pananá et al., 2004). Les étapes du développement des LB dans la moelle osseuse (MO) et la rate requièrent la présence d'un BCR fonctionnel et d'un micro-environnement adapté (Carsetti, 2000).

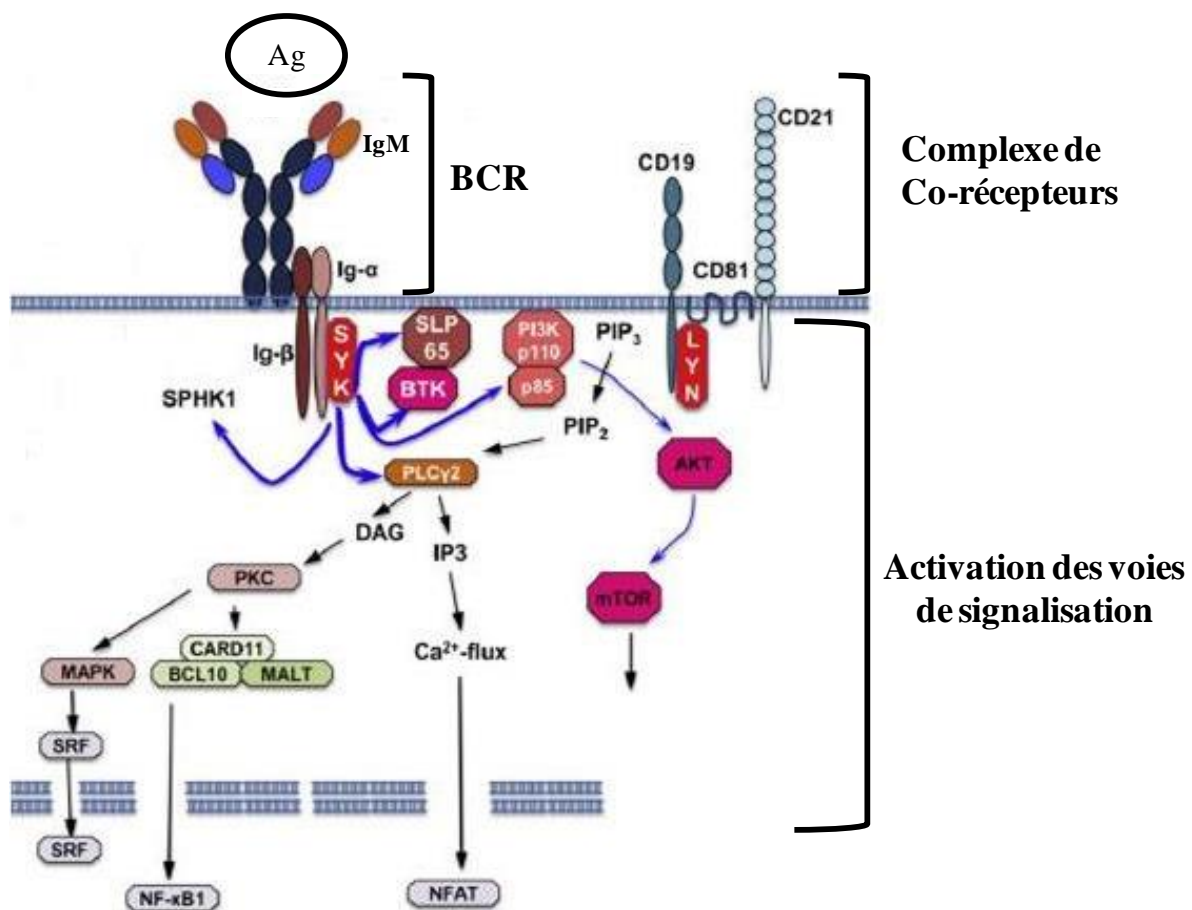


Figure 5 Structure du BCR: Le BCR est constitué d'une Ig membranaire et d'un hétérodimère Igα/Igβ avec le complexe de co-récepteurs (CD19, CD81 et CD21) nécessaire pour la signalisation après reconnaissance de l'antigène (Ag). La cascade de signalisation qui est en second plan sur ce schéma n'est pas détaillée dans mon introduction. Adapté de Pieper, Grimbacher and Eibel, 2013, *J allergy Immunol*.

b) Activation du Lymphocyte B

L'activation du LB requiert 2 signaux. Le **premier signal d'activation** correspond à la reconnaissance de l'Ag par le clone B spécifique et le second est le signal de costimulation. La liaison BCR-Ag se déroule en général dans les organes lymphoïdes secondaires (OLS). Deux types de réponses sont envisageables : les réponses T-dépendantes (principalement les B folliculaires) ou les réponses T-indépendantes (les cellules B1 ou les LB de la zone marginale (ZM)). Bien que les petits Ags soient reconnus directement par les LB, les Ags de plus grande taille ont besoin d'être apprêtés et présentés aux LB par les CPA comme les cellules dendritiques folliculaires (Bajénoff and Germain, 2009) ou les macrophages du sinus sous-capsulaires (Carrasco and Batista, 2007). Les LB vont ensuite présenter par leur molécule de CMH II (Lanzavecchia, 1985) des Ags aux LT CD4+ *follicular helper* (Tfh). Les Tfh vont fournir aux LB avec lesquels ils sont en contact des signaux de costimulation, c'est **le second signal d'activation**. Les Tfh grâce à l'expression du CXCR5 vont se localiser à l'interface des zones T et B pour rencontrer les LB ayant reçu le premier signal par leur BCR (Choi et al., 2011). Le contact Tfh-B est stabilisé par la protéine de signalisation intracellulaire SAP (signalling lymphocyte Activation molecule-associated protein) (Qi et al., 2008).

Le signal du BCR est très important dans le développement et l'activation du LB et nécessite aussi d'autres signaux dépendant de facteurs de transcription également requis pour le développement des LB.

- ❖ **BAFF** *B cell activator factor of the TNF family* est un facteur de transcription qui empêche l'apoptose des cellules sécrétrices d'Ac dérivés de cellules mémoires, il a donc une fonction importante dans le contrôle de la production d'anticorps (Avery et al., 2003). Il se lie à trois récepteurs : BCMA B-cell Maturation Antigen, TACI Transmembrane Activator and Calcium-modulator and cyclophilin ligand (CAML) Interactor et BAFF-R, BAFF récepteur. Le récepteur BCMA est exprimé par les B matures et encore plus par les plasmocytes (Thompson et al., 2000). Le récepteur TACI quand à lui est exprimé par les LB et par une sous-population de T activées (von Bülow and Bram, 1997). Le troisième récepteur, BAFF-R lie BAFF et est exprimé par tous les LB sauf les plasmocytes de la moelle osseuse (MO). BAFF-R est uprégulé par les T activées et est exprimé par les T regs (Mackay and Leung, 2006).

- ❖ **APRIL** *A proliferating inducing ligand* est un facteur exprimé en faible quantité par les cellules lymphoïdes et en grande quantité par les cellules tumorales (Hahne et al., 1998).

BAFF et **APRIL** sont essentiellement produits par les cellules de l'immunité innée telles que les neutrophiles, les macrophages, les monocytes et les cellules dendritiques (Mackay et al., 2003). Les LT et les LB activés produisent BAFF et APRIL en faible quantité (Mackay and Leung, 2006). Certaines cellules non-hématopoïétiques comme les astrocytes produisent ces facteurs chez les patients atteints de SEP (Krumbholz et al., 2005). Cette production par les cellules non hématopoïétiques semble aider à la création de niche de survie qui permet de moduler la fonction des LB et des plasmocytes. BAFF et APRIL pourraient aussi réguler la sécrétion d'anticorps T dépendante en favorisant la survie des plasmablastes provenant soit des B1 soit de la zone marginale (ZM) (Balázs et al., 2002). Chez les souris déficientes en BAFF et BAFF-R, une perte des LB ZM et des cellules B2 est observée. Cependant, les cellules mémoires et les B1 ne semblent pas avoir besoin du signal BAFF (Mackay et al., 2003). Ils semblent contrôler le développement et la survie des LB B2 et LB ZM et participent aussi à la construction des centres germinatifs (CG) car en leur absence les CG ne sont pas stables (Rahman et al., 2003). BAFF présente d'autres fonctions comme la régulation de certains marqueurs de surface comme le CD21 et le CD23 (Gorelik et al., 2004). APRIL régule la commutation isotypique CD40 indépendante et permet la survie des plasmocytes (He et al., 2010). Les récepteurs jouent aussi des rôles bien précis. Par exemple, le récepteur BCMA contribue à la maintenance des plasmocytes (O'Connor et al., 2004) et induit la fonction de CPA des LB (Yang et al., 2005). Le récepteur TACI quand à lui participe à l'activation de la réponse humorale des LB de l'immunité innée, des LB ZM et des cellules B1 (Bossen et al., 2008).

Les différentes sous-populations de LB citées ci-dessus seront détaillées dans la partie du développement des LB.

- ❖ **BTK**, Bruton Tyrosine Kinase : c'est un composant majeur du signal du pré-BCR et du BCR. Il permet la liaison entre l'activation du pré-BCR ou du BCR et le flux calcique Ca^{2+} (Guo et al., 2000). Il intervient dans l'activation des voies MAPKinases (Mitogen-activated protein kinase) et régule l'activité des facteurs de transcriptions comme le $NF\kappa B$ (Nuclear factor κB) (Matthias and Rolink, 2005). Chez l'homme le

développement des LB dans la MO semble être dépendant de l'activité de BTK (Conley et al., 1994).

- ❖ **BLNK**, B-cell linker protein : c'est un composant important dans le signal du pré-BCR et du BCR, il semble aussi important pour la génération des B regs sécrétrices d'IL-10 (Jin et al., 2013).
- ❖ **TLR** *Toll-like receptor* : Ce sont des récepteurs PRRs (Pattern Recognition Receptors) qui ont la capacité de reconnaître des motifs moléculaires conservés des agents pathogènes, les PAMPS (Pathogen associated Molecular patterns). Ils entraînent des réponses immédiates contre les pathogènes et induisent les réponses immunes adaptatives en recrutant les cellules dendritiques et en initiant leur maturation (Akira et al., 2001). Les TLRs sont exprimés par les cellules non-immunitaires comme les kératinocytes (Kinoshita et al., 2009), les fibroblastes et par les cellules immunitaires comme les cellules dendritiques, les mastocytes, les LT et les LB (Bourke et al., 2003). La reconnaissance des PAMPS par les TLRs va impliquer la protéine adaptatrice MYD88. MYD88 va activer les voies de signalisation NF κ B et MAPKs (Kawai and Akira, 2007). Ce processus aboutit à la synthèse de multiples cytokines inflammatoires telles que l'IFN γ , l'IFN β , l'IL-6, le TNF α et l'IL-12 (Kawai and Akira, 2008) ainsi que l'expression des molécules de stimulation CD80, CD86 et CMHII (Newell et al., 2010). Les TLRs semblent avoir une importance dans l'activation des LB naïfs. En effet, L'activation des B naïfs nécessite trois signaux : la stimulation du BCR, la collaboration des cellules T et l'activation des TLRs (Jiang et al., 2007; Ruprecht and Lanzavecchia, 2006). Les LB naïfs présentent un seuil d'activation plus élevé que celui des cellules mémoires (Arpin et al., 1997) car les LB mémoires sont plus réactifs à l'Ag en partie grâce à un niveau d'expression des TLRs élevé (Bernasconi et al., 2003). Une fois le TLR activé, le LB mémoire va s'activer rapidement, proliférer et se différencier en plasmocyte (Iskra et al., 2010). Il a été montré que le LB mémoire et switché exprime de manière constitutive le TLR9 (Bernasconi et al., 2003).

2) Le répertoire des lymphocytes B

Les LB sont produits tout au long de la vie. Cependant, le nombre de LB reste constant ou retourne au niveau basal après une dérégulation due à une réponse immune. Les niches de

survie fournissent les signaux de survie spécifiques aux différentes populations de LB pouvant expliquer cette homéostasie.

a) La diversité du répertoire B

La recombinaison V(D)J : C'est un mécanisme qui a lieu dans la MO (Tonegawa, 1983). Le développement précoce du LB est ordonné par des réarrangements successifs de segments de gènes IgH et IgL. Premièrement, le segment D_H (IgH Diversity segment) se réarrange avec le segment J_H (IgH joining segment), ensuite le segment V_H au segment DJ_H formant le segment V(D)J_H et enfin le réarrangement V_LJ_L de la chaîne légère (Melchers, 2005). Ce mécanisme est coordonné par les enzymes de recombinaison RAG1, RAG2 (Recombinaison Activating Gene) et TdT (Terminal deoxynucleotidyl Transferase) qui assemblent les gènes du récepteur en catalysant les jonctions V-D-J (Tonegawa, 1983). La TdT va permettre l'addition de nucléotides au niveau des extrémités coupées des séquences codantes (Alt and Baltimore, 1982). Un réarrangement productif de la chaîne lourde va permettre son expression à la surface du LB avec des composants de la chaîne légère de substitution (CLS), λ5 et VpreB (Melchers, 2005). Cette expression à la surface va induire le réarrangement des gènes de la chaîne légère d'Ig.

L'hypermutation somatique (HMS) : C'est un mécanisme responsable de la diversité du répertoire B (McKean et al., 1984). Ce mécanisme débute après une rencontre entre le LB et l'Ag pendant la réponse immune T dépendante. L'activation des LB et la costimulation apportée par les LT CD4⁺ helper entraînent la formation de CG dans les OLS où se passent l'HMS et la commutation isotypique. Ces mécanismes sont initiés par une seule enzyme, l'AID, Activation-induced cytidine deaminase, exprimée par les B activés (Revy et al., 2000). L'HMS permet l'apparition de mutations au sein des gènes des régions variables des Igs et génère des BCR de forte affinité car les hypermutations somatiques augmentent l'affinité du BCR pour l'Ag (Klein et al., 1998a). Ce mécanisme est plus intense dans le compartiment mémoire. Une étude a démontré que la majorité des CD27⁺IgD⁺ présentait des mutations de la région variable (29/31 cellules testées) contrairement aux cellules CD27⁻IgD⁺ (1/19 cellules testées) (Klein et al., 1998a, 1998b).

La nature aléatoire de la recombinaison VDJ et les mutations somatiques des gènes des Igs va être à l'origine d'un répertoire divers d'anticorps. Ce répertoire peut générer des auto-anticorps et donc engendrer des pathologies auto-immunes. Pour éviter des phénomènes

d'auto-immunité, les LB au cours de leur développement subissent des mécanismes de tolérance contrôlant la spécificité des cellules ou leur nombre.

b) Les mécanismes de contrôle de la tolérance au soi

Les LB autoréactifs semblent être pathogéniques dans les maladies auto-immunes telles que la polyarthrite rhumatoïde ou le lupus (Mandik-Nayak et al., 2008). Les études sur des souris Tg exprimant un BCR reconnaissant des protéines du soi ont permis de déterminer plusieurs mécanismes de tolérance (Cambier et al., 2007; Shlomchik, 2008) intervenant au niveau central et au niveau périphérique.

Receptor editing : C'est un mécanisme de tolérance identifié indépendamment par deux équipes depuis plus de 20 ans en utilisant des souris Tgs (Gay et al., 1993; Tiegs et al., 1993). Ils ont remarqué une proportion de B immatures auto-réactifs qui n'était pas seulement éliminée par délétion mais exprimait un nouveau BCR non auto-reactif. Ce mécanisme intervient après un réarrangement V (D) J des locus des chaînes lourdes et légères. Il implique la réactivation des gènes RAG et de nouveaux réarrangements de la chaîne légère (moins communément de la chaîne lourde) pour aboutir à la formation d'un BCR spécifique d'un antigène exogène (Basten and Silveira, 2010). Il est prédominant dans les mécanismes de tolérance centrale des B auto-réactifs à forte ou à avidité modérée (Pelanda and Torres, 2006). Le *receptor editing* ne semble pas être exclusivement dû à la voie de signalisation du BCR mais d'autres voies seraient impliquées. Des études sur des patients déficients en protéines MyD88, IRAK-4 ou UNC 93B, de la voie des TLRs ont permis de mettre en évidence leur rôle majeur dans ces mécanismes (Isnardi et al., 2008). Chez l'homme, malgré une sélection négative efficace dans la MO, une auto-reactivité et une poly-reactivité persiste néanmoins dans le compartiment des B mature à faible avidité en périphérie (Wardemann and Nussenzweig, 2007).

Délétion clonale : C'est un mécanisme qui intervient dans la tolérance périphérique et dans la tolérance centrale. Elle a été décrite pour la première fois par Nemazee en 1989 en utilisant des souris transgéniques H-2k (CMH-I) ayant des LB sécrétant des IgM anti-H-2k (Nemazee and Bürki, 1989). Ce processus d'apoptose se déclenche au bout de 3 jours après reconnaissance d'autoAg, si un nouveau BCR non-autoréactif n'a pas été réarrangé (Pelanda and Torres, 2006). La délétion est donc un mécanisme secondaire ne concernant que les cellules ayant échappées au receptor editing. Cette sélection négative dépend de l'activation d'une molécule pro-apoptotique, Bim de la famille bcl-2 (Enders et al., 2003). La protéine

Bim (bcl2-interacting mediator of cell death) semble avoir un rôle important dans la régulation de l'homéostasie lymphocytaire (Bouillet et al., 1999).

Inclusion allélique : C'est un phénomène qui empêche les LB de produire deux chaînes avec des spécificités différentes pour une même cellule. En effet lors du réarrangement V(D) J, un signal d'inhibition des activateurs de recombinaison RAG1 et RAG2 va permettre l'exclusion d'un allèle et l'expression d'un seul isotype de la chaîne légère (λ ou κ) pour produire un récepteur fonctionnel. Ainsi le LB exprime un récepteur à sa surface d'une spécificité unique et produit une multitude d'anticorps ayant la même spécificité. Cependant, dans certains cas, lors du *receptor editing*, un autre réarrangement productif peut se produire sur l'autre allèle ou sur un autre isotype ne codant pas un autoanticorps. Ainsi, il est possible d'obtenir des LB avec deux réarrangements productifs (Li et al., 2002b; Liu et al., 2005). Ces LB ont deux possibilités : soit ils co-présentent les deux récepteurs, soit ils ont la capacité d'internaliser le BCR autoréactif et d'exprimer uniquement le BCR non-autoréactifs. Li et al ont montré dans leur étude que le second récepteur pouvait diminuer l'autoréactivité du premier, la cellule peut être déroutée vers la zone marginale (Li et al., 2002b). Dans le second cas, Liu et al ont montré que le BCR autoréactif internalisé ne va pas rencontrer d'Ag mais plutôt se différencier en plasmocytes et sécréter des autoanticorps de type IgM (Liu et al., 2005).

Anergie clonale et ignorance clonale : Ce sont des mécanismes de sélection négative qui interviennent à tous les stades de développement du LB. Il s'agit d'une inactivation fonctionnelle des LB se manifestant après la reconnaissance d'un autoAg et aboutissant à une perte de réponse du signal BCR (Cambier et al., 2007; Nossal and Pike, 1980; Shlomchik, 2008). L'anergie clonale se caractérise par une incapacité pour le LB à présenter des Ags ou à produire des anticorps. Les B anergiques ont une dépendance à de fortes quantités du facteur de survie BAFF, une incapacité à interagir avec des T *helper* et une courte espérance de vie (Lesley et al., 2004; Thien et al., 2004). Ces caractéristiques distinguent les LB anergiques des LB naïfs et limitent la capacité de ces cellules à participer à la réponse immunitaire (Cambier et al., 2007). L'ignorance clonale est un mécanisme qui survient lorsque le signal généré par la reconnaissance Ag-BCR est trop faible pour entraîner une réponse (Aplin et al., 2003; Hannum et al., 1996; Shlomchik et al., 1993). Ces LB peuvent quitter la MO pour se retrouver en périphérie comme des B non auto-réactifs. Ce mécanisme passe par les voies inhibitrices du signal BCR, les voies SIAE/Siglec (Surolija et al., 2010). Chez des patients atteints de maladies autoimmunes, les défauts de variants SIAE (Sialic acid Acetyl Esterase) ont été

retrouvés montrant l'implication de cette voie dans la tolérance immunitaire (Pillai et al., 2011).

c) Les différents points de contrôle

Les mécanismes de contrôle de l'auto/poly-réactivité ont été bien étudiés par le groupe de Nussenweig chez l'homme. Ces études ont utilisé des clones de B de la MO et du sang en différenciant les cellules précurseurs, les pré-B, les immatures précoces et les LB immatures chez trois volontaires sains (Wardemann et al., 2003). Des transcrits des chaînes lourdes et légères d'Ig de LB ont été amplifiés, séquencés puis clonés. Les clones sont testés contre les lysats cellulaires HEp-2 (cellules tumorales humaines permettant de détecter une auto-réactivité anti-nucléaire ou anti-cytoplasmique) et un panel d'Ags pour tester la poly-réactivité. Dans cette étude, 75,9 % des LB précoces immatures ont une auto-réactivité à l'HEp-2 et 55,2% sont poly-réactifs (Wardemann et al., 2003), cette proportion diminue au cours du développement du LB. Cette étude a permis de mettre en évidence chez l'homme, différents points de contrôle ayant lieu pendant le développement du B. **Le premier point de contrôle** intervient dans la MO entre le stade des LB pré-immatures et le stade des LB immatures comme le montre la **figure 6**. C'est un point de contrôle central. **Le deuxième point de contrôle** intervient en périphérie entre le stade transitionnel et le stade des LB matures naïfs. Pourtant, 20% des LB matures sont auto-réactifs après cette sélection, parmi lesquels 4% sont poly-réactifs. Cette auto-réactivité physiologique pourrait contribuer au développement des anticorps naturels intervenant dans la réponse immune (Wardemann et al., 2003).

Une étude sur les auto-anticorps produits par les LB mémoires IgM⁺ a montré **un troisième point de contrôle en périphérie** (Tsuiji et al., 2006). Ils ont utilisé des anticorps recombinants clonés à partir de LB mémoires IgM⁺ et ont testé l'auto et la poly-réactivité. Ils ont retrouvé 2% de LB mémoires IgM⁺ auto-réactifs et 1% de LB mémoires IgM⁺ poly-réactifs alors que pour les B matures naïfs, ils retrouvent 20% d'auto-réactivité et 6% de poly-réactivité comme Wardeman en 2003. Les résultats suggèrent un point de contrôle entre le stade des B matures et celui des B mémoires IgM⁺. Pour déterminer si cette sélection se produit avant ou après l'HMS, les auteurs ont testé de nouveau la réactivité des anticorps reconstruits à partir de leur forme non-mutée. Aucun des anticorps testés ne présentait d'auto- ou de poly-réactivité. Ce point de contrôle semble donc intervenir avant les mutations hypersomatiques (Tsuiji et al., 2006) **figure 6**. Une autre étude en utilisant la même méthode a testé l'auto-réactivité des LB mémoires IgG⁺ (Tiller et al., 2007). Ils retrouvent 46,8%

d'autoréactivité et 22,7% de poly-réactivité chez les LB mémoires IgG^+ . Ces résultats sont significativement plus élevés dans ce compartiment par rapport aux LB matures naïfs. Le développement de LB switchés dépend des centres germinatifs et du signal du T *helper*. Le compartiment switché est caractérisé par l'hypermutation somatique qui change l'affinité des anticorps et peut créer de l'auto-réactivité (Ray et al., 1996; Shlomchik et al., 1990). Les résultats obtenus par Tiller suggèrent une augmentation de la réactivité des cellules (auto et poly) qui s'acquiert au moment de l'HMS au sein des centres germinatifs chez les témoins sains (Tiller et al., 2007). **Les centres germinatifs** jouent un rôle important dans le développement du répertoire B. Les CG représentent un microenvironnement dans les follicules où les LB hypermutés sont positivement sélectionnés sur la base de l'affinité et négativement sélectionnés en fonction de l'autoréactivité due à la compétition locale pour l'Ag présenté par des cellules dendritiques folliculaires et l'accès aux T *helpers* folliculaires (Vinuesa et al., 2009).

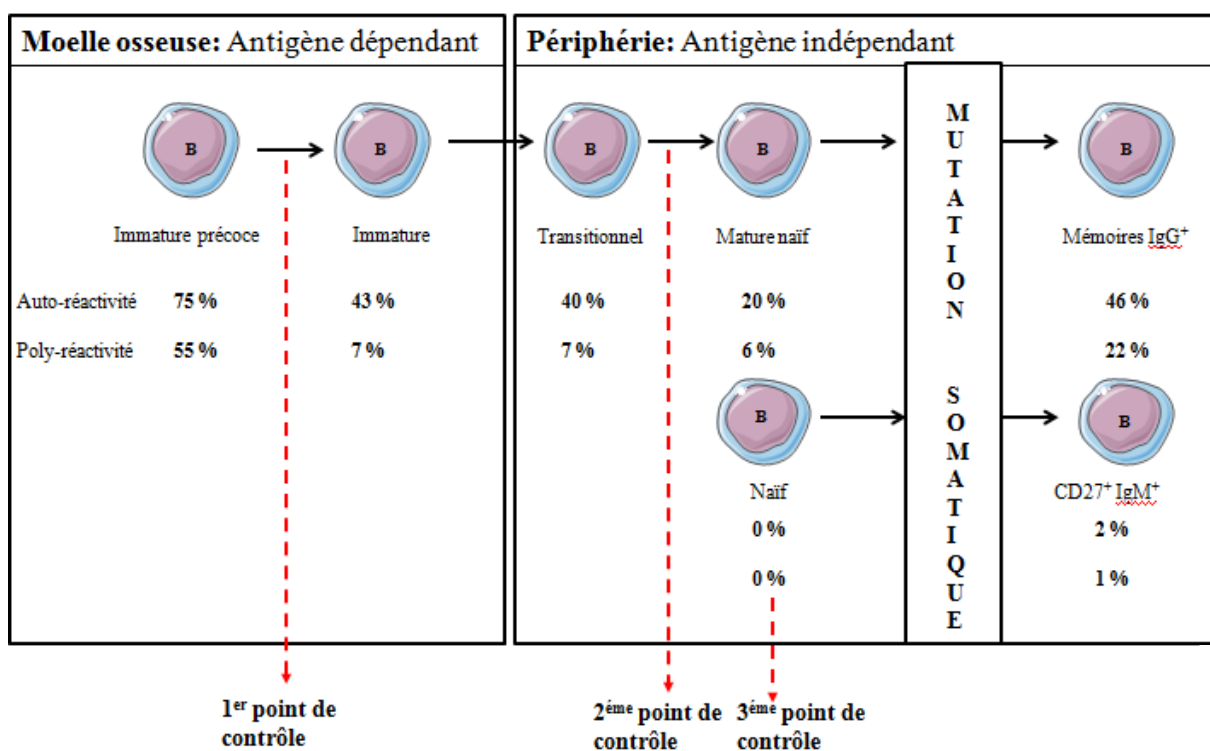


Figure 6 Les différents points de contrôle de la tolérance B chez l'homme: le premier point intervient entre le stade de pré-immature (75%) et le stade immature (45%). le second se déroule entre le stade transitionnel (40%) et le stade mature(20%) en périphérie. Le dernier point de contrôle en périphérie permet l'élimination complète des LB naïfs autoréactifs (0%). Adapté de Wardemann, *Adv Immunol*, 2007.

3) Développement et phénotype des lymphocytes B

Des arguments sur leur origine, leur phénotype et leur fonction nous permettent de subdiviser les LB en deux lignages distincts : les B2 qui sont des LB conventionnels et les B1.

a) Développement et homéostasie des lymphocytes B conventionnels ou B2

Les cellules B sont générées dans la moelle osseuse et proviennent de cellules souches hématopoïétiques qui possèdent la capacité d'auto renouvellement et d'engagement dans différents lignages. Les cellules stromales de la moelle osseuse (MO) sont des éléments clés de la différenciation B en apportant signaux cytokiniques et contacts cellulaires nécessaires à leur développement (Egawa et al., 2001; Nagasawa, 2006). La figure 7 résume le développement des LB. Ainsi sous l'influence de deux facteurs de transcription EBF (early B cell factor) et LRF (LiverRegeneration Factor), la cellule souche hématopoïétique (**CSL**) va se différencier en cellules **pré-proB**. L'expression du facteur de transcription Pax 5 assure la différenciation des pré-proB en **proB**. Pax 5 inhibe Notch1 et la différenciation T mais régule l'expression de gènes spécifiques du lignage B comme ceux codant le CD19 ou la protéine Ig α (Nutt et al., 1998). Les souris ayant des pré-B déficients en pax5 montrent un défaut de recombinaison V-D-J. Pax 5 semble donc également impliqué dans le réarrangement des segments géniques V-D,-J de la chaîne lourde μ (Nutt et al., 1997). L'ensemble formé par les 2 chaînes μ H, les 2 chaînes légères de substitution SLC (Surrogate light chains) λ 5 et VpreB et les 2 molécules de signalisation Ig α (CD79a), Ig β (CD79b) constitue le pré-BCR. Le pré-BCR va intervenir à deux niveaux, premièrement, il va stopper l'activité et l'expression de l'enzyme catalysant le réarrangement des segments de la chaîne lourde (exclusion allélique) (ten Boekel et al., 1998) et dans un deuxième temps, il va initier le réarrangement de la chaîne légère. Ce récepteur est porté par les cellules **pré-B** et est central pour la suite du développement B (Borst et al., 1996). En effet les déficits immunitaires observés chez l'homme, dans le cadre de mutations mono-géniques ciblant les gènes du système immunitaire, ont pu mettre en évidence le rôle central des molécules de signalisation du BCR dans le développement B. Ainsi des délétions pour la *burtontyrosine kinase* ou *B-cell linker protein* induisent des déficits immunitaires sévères en bloquant la différenciation B au stade pro-B. De plus une délétion des gènes de recombinaison (RAG1/RAG2) et ceux codant les chaînes α et β (Ig α et Ig β) inhibe le développement du LB (Gong and Nussenzweig, 1996; Kitamura et al., 1992). L'activation des molécules de signalisation est importante pour passer au stade de différenciation suivant. Ces molécules vont assurer la transmission de signaux

nécessaires à la survie et à une prolifération intense des pré-B. A ce stade les cellules B vont internaliser le pré-BCR et exprimer de nouvelles chaînes légères. La synthèse des chaînes légères κ ou λ en remplacement des chaînes de substitution, entraîne l'expression d'une IgM monomérique sur des **LB immatures** (Lazorchak et al., 2006; Rolink et al., 1998). Le LB immature peut rester dans la MO ou migrer dans la rate où il termine son développement. La migration des LB vers la périphérie va se faire en partie avec l'aide de la chimiokine S1P, Sphingosine-1-phosphate. Cette chimiokine est produite par les cellules endothéliales (Venkataraman et al., 2008) et est en forte quantité en périphérie ce qui permet la migration des LB.

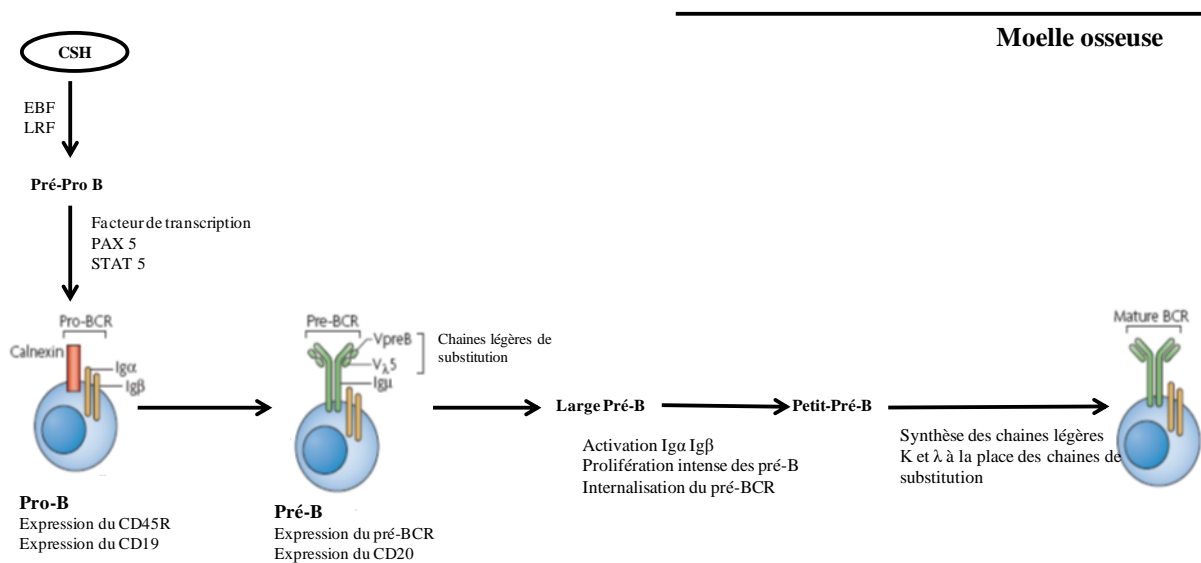


Figure 7 Développement des LB dans la moelle osseuse de la cellule souche hématopoïétique (CSH) au stade de LB immature.

b) Différentiation et phénotype des lymphocytes B2

i. La Différentiation des B2 dans la rate

Au cours de leur différenciation, les LB immatures initialement formés dans la MO terminent leur maturation dans la rate. Au cours de cette étape, les lymphocytes B auto-réactifs sont éliminés par délétion clonale ou "receptor editing" (Carsetti et al., 1995; Gay et al., 1993). Les cellules qui ont recombinaison leur BCR avec succès (10%) continuent leur maturation en passant par des stades de transition (T1 et T2). Cette sous-population B transitionnelle a été décrite pour la première fois chez la souris en 1995 (Carsetti et al., 1995). Ces cellules sont retrouvées dans la MO mais également en périphérie dans la rate et le sang. Trois sous-types

de B transitionnels ont été identifiés chez la souris et les transitionnels de type 1 ou **T1**, de type 2 ou **T2**, et les transitionnels de type 3 ou **T3** (Allman et al., 2001). Dans la rate, les LB transitionnels vont exprimer une seconde Ig membranaire l'IgD et le récepteur du complément CD21. Le CD21 joue un rôle dans la réponse immunitaire innée et humorale (Carroll and Fischer, 1997). Les T1 et T2 sont classés selon l'expression de ces marqueurs, les transitionnels T1 sont IgD⁻CD21⁻ tandis que les T2 sont CD21⁺IgD⁺ (Carsetti et al., 1995). La progression du stade T1 au stade T2 est régulée par la protéine kinase (PTK) Syk et Igα (Turner et al., 1995). Les T3 sont des cellules peu différentes des matures naïves, par conséquent la littérature à leur sujet est rare (Allman et al., 2001).

Chez l'homme, les premières études phénotypiques et fonctionnelles chez l'homme ont permis d'identifier les cellules transitionnelles comme étant des cellules CD19⁺IgM⁺IgD⁺CD24^{hi}CD38^{hi}CD27⁻ (Sims et al., 2005). Il existe des sous-types de LB transitionnels, T1 et T2. Au départ, les deux sous-types se différençaient en fonction de l'expression du CD24 et du CD38 (Anolik et al., 2007). Le CD38 est une ADP-Bybocyclase, molécule de costimulation capable de transduire des signaux de survie de prolifération aux cellules B. Le CD24 est exprimé sur les pré-B et se perd au cours de la différenciation. Les cellules immatures et mémoires réacquièrent son expression. Son rôle est très peu défini néanmoins, cette protéine est un ligand de la P-sélectine, un récepteur exprimé à la surface des CE activées suggérant un rôle dans l'adhérence des cellules B (Aigner et al., 1997) est aussi exprimé sur les pré-B et disparaît au cours de la différenciation. Le phénotype des LB transitionnels reste encore mal connu car beaucoup d'études ont utilisé des marqueurs différents pour caractériser cette population (Agrawal et al., 2013). Sur le plan fonctionnel, les T2 prolifèrent plus en présence de certaines cytokines comme IL-4, IL-10, IL-13, IL-21 et sécrètent plus d'IgM après différentes stimulations (CpG, CD40L or CpG/CD40L avec ou sans IL-21) par rapport aux cellules T1. Les T2 semblent donc plus matures que les T1 (Suryani et al., 2010). Ils confirment dans cette étude que les T1 sont les premières cellules migrantes à quitter la MO car après transplantation de cellules souches hématopoïétiques (TCSH), ce sont les premières cellules à être identifiées en périphérie.

Le T2 se différencie ensuite dans la rate en LB folliculaire ou en LB ZM. Le devenir de la cellule T2 est dépendant de l'affinité du BCR et du clivage de Notch2. Les LB T1 et T2 qui reconnaissent des Ags avec une forte affinité vont induire l'activation de Btk et se différencier en LB folliculaire. Au contraire, les LB transitionnels qui reconnaissent l'Ag avec une faible affinité vont faiblement activer le Btk et se différencier en LB ZM. Une faible activation de

Btk permet l'action de Notch2 alors qu'une forte activation de Btk va inhiber l'action de Notch2 (Pillai and Cariappa, 2009). L'activation de Notch2 par son ligand DL1 est nécessaire pour la rétention et le développement des B au niveau de la ZM dans la rate (Saito et al., 2003). La métalloprotéinase ADAM-10 semble aussi avoir un rôle dans la voie de différenciation empruntée. Des études sur des souris Tg ayant des LB n'exprimant pas ADAM-10 ont montré une absence de développement des LB ZM. Les auteurs montrent que ADAM-10 régule le signal Notch2 (Gibb et al., 2010).

Les lymphocytes B2 de la zone folliculaire : Ils sont localisés au niveau des follicules primaires grâce à l'action de la chimiokine CXCL13, ils migrent à travers le réseau réticulaire des follicules à la rencontre de l'ag présenté par les cellules dendritiques folliculaires ou par les macrophages des sinus sous-capsulaires (Phan et al., 2009; Suzuki et al., 2009). L'activation du BCR sera déterminante pour la suite de la différenciation. Si le BCR n'est pas activé, les LB folliculaires (FO) quittent le follicule et retrouvent la circulation sanguine grâce à l'action du récepteur lysophospholipidique S1P1 exprimé à leur surface (Schwab and Cyster, 2007). En effet l'activation du BCR va induire la migration des B folliculaires vers la zone T grâce à l'expression de CCR7 et va permettre leur présence au niveau de l'interface T-B (Reif et al., 2002). Cette localisation va être favorable à une interaction entre les LB et les LT auxiliaires CD4⁺ (Th) exprimant le récepteur CXCR5 appelés Th pré-folliculaire (Förster et al., 1999). Cette interaction va donner lieu à deux types cellulaires : (1) Les LB peuvent se différencier en **plasmocytes extra-folliculaires** de courte durée de vie sécrétant en majorité des IgM (Tarlinton et al., 2008) et même des autoanticorps (William et al., 2002). Les LB FO peuvent aussi migrer dans les follicules dits secondaires grâce à l'expression du bcl6 (B-cell lymphoma 6) et former en leur centre des micro-environnements favorables à la différenciation du LB appelés centre germinatif (CG) (Cyster, 2010). Les CG sont composés d'une zone claire et d'une zone sombre (**figure 8**). Au niveau de la zone sombre, (2) les LB folliculaires vont exprimer le CXCR4, inhiber l'expression du BCR pour se différencier en **centroblastes** avec une forte capacité proliférative (Allen et al., 2004). Les centroblastes expriment l'enzyme AID (Activation-induced cytidine deaminase) et le BCR va subir des hypermutations somatiques des domaines variables des chaînes lourdes et légères. Ces mutations augmentent la diversité du répertoire BCR. Dans la zone claire, le BCR est réexprimé à la surface de la cellule et testé contre des ags présentés par les cellules dendritiques folliculaires. L'interaction cellule dendritique folliculaire-centroblaste va permettre l'internalisation de l'Ag, l'arrêt du cycle cellulaire et la différenciation en

centrocytes. Les centrocytes vont activer les Th folliculaires et l'affinité du BCR pour l'Ag va de nouveau induire une sélection positive ou négative. Une faible affinité pour l'Ag va induire l'apoptose des centrocytes par la surexpression des molécules pro-apoptotiques telles que la molécule Fas, *programmed death ligand* PD-L1 et PD-L2 (sélection négative) (Takahashi et al., 2001). Une affinité plus forte va induire la survie du centrocyte par l'expression du CD40L et la sécrétion de cytokines comme l'IL-4 et IL-21 (sélection positive) (Vinuesa et al., 2005). Les centrocytes sélectionnés positivement vont subir une commutation isotypique conduisant à la production d'anticorps de différentes classes IgG, A, E (Reynaud et al., 2003). Les centrocytes vont ensuite quitter le CG.

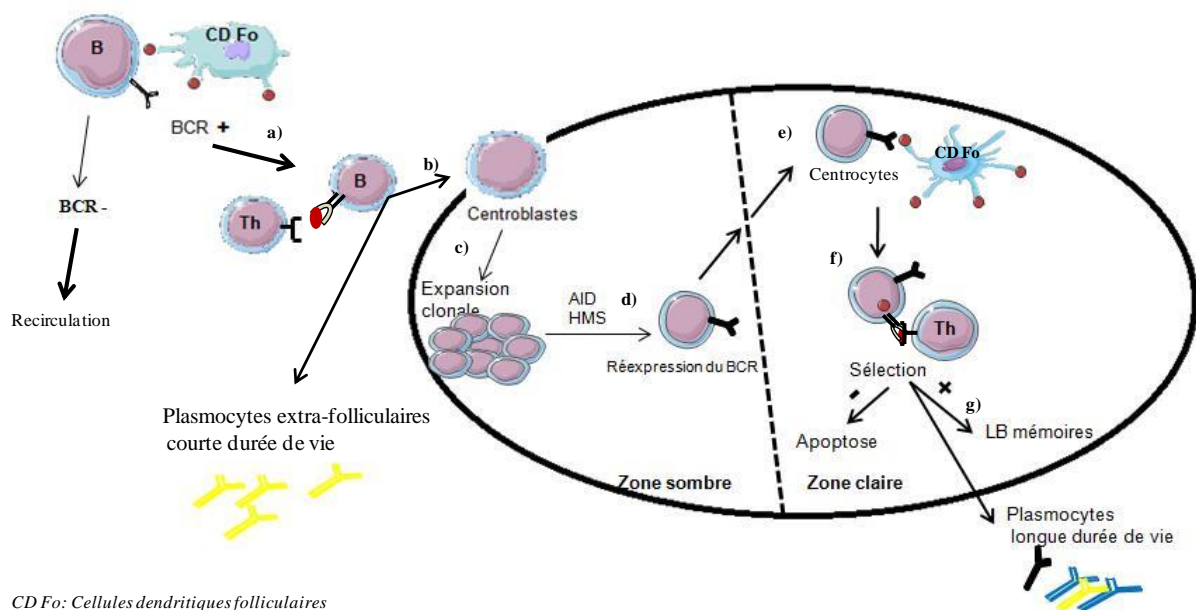


Figure 8 Le centre germinatif: Réaction simplifiée du développement du LB dans le centre germinatif (de a) à g)). Après l'expansion clonale du centroblaste dans la zone sombre du CG, l'enzyme AID va induire des hyper-mutations somatiques (HMS) pour augmenter l'affinité du BCR. Dans la zone claire, le centrocyte va effectuer des interactions aboutissant soit à une sélection négative (apoptose) soit à une sélection positive (différentiation).

Les lymphocytes B2 de la zone marginale : le signal BCR faible et le signal Notch2 (Saito et al., 2003) conduit à la différenciation des cellules transitionnelles en LB ZM sans l'implication des LT et du signal CD40L (Weller et al., 2001). Chez les souris, les LB ZM répondent vigoureusement aux pathogènes véhiculés par le sang et sont $IgM^{high}IgD^{low} CD23^{-} CD21^{+} CD1d^{+}$, constituant 10 à 15% du pool total des LB (Lee-Chang et al., 2011; Pillai et al., 2005). La forte expression de CD1d facilite la présentation des antigènes lipidiques par les LB ZM aux LT *Natural Killer Invariant* (iNKT), la ZM splénique pourrait être une source d'anticorps dirigés contre des lipides (Barral et al., 2008). De même, la forte expression du CD21 à la

surface de LB ZM facilite le transport des complexes immuns de la circulation aux follicules dans la rate où ces complexes seront capturés par les cellules dendritiques folliculaires pour les présenter aux LB folliculaires (Cinamon et al., 2008). Les LB ZM sont des cellules générées comme des LB naïfs avec des propriétés de cellules mémoires, elles ont aussi une forte expression du CMH II, CD40, CD80 et CD86 traduisant un phénotype de cellules pré-activées, une capacité d'autorenouvellement et une longue durée de vie (Pillai et al., 2005). Les LB ZM peuvent aussi participer à la réponse immune T dépendante. Elles sont capables de présenter des ags protéiques directement aux cellules T par leur molécule de CMH II et des molécules de costimulation de la famille B7 (CD80, CD86) (Attanavanich and Kearney, 2004). Ainsi, les LB ZM constituent la première ligne de défense de l'organisme contre des pathogènes tels que les bactéries encapsulées provenant du sang (Zandvoort and Timens, 2002) avant même que la réponse adaptative soit assurée par les LB FO (Oliver et al., 1999). Le développement et l'homéostasie des LB ZM semble dépendre des signaux transmis par le TIRAP (Toll-IL1 receptor domain containing adaptator protein) induit par les TLRs exprimés à la surface du LB (Weller et al., 2012) et débute dans la rate car le ligand delta-like 1 (DL1) indispensable pour leur développement est fortement exprimé dans la rate et absent dans la MO (Tan et al., 2009). Ces LB ZM expriment les récepteurs S1P1 et S1P3 qui les retiennent efficacement dans la ZM (Cinamon et al., 2004).

Les LB de la ZM humaine partagent des similitudes phénotypiques et fonctionnelles avec les LB de la ZM murine bien que la structure de la ZM humaine soit différente de celle des souris. Chez l'homme, ces cellules peuvent être $IgM^+ IgD^{low} CD23^- CD21^+ CD1c^+$ ou $IgM^+ CD27^+$, pour la plupart $CD5^-$ et représentent 10 à 15% des B circulants ((Weller et al., 2004). L'ontogénie et la fonction des LB de la ZM chez l'homme reste très controversées (Tangye and Good, 2007; Tarlinton, 2008; Weill et al., 2009). En revanche les LB de la ZM humaine sont recirculantes à l'inverse de souris restreintes à la rate. Ces cellules ont la capacité de sécréter des Igs naturelles pouvant être polyréactives et sont suspectées comme étant un pool d'Ac autoréactifs (Weill et al., 2009).

ii. *Différentiation des B2 dans les amygdales*

Les amygdales ont permis d'étudier chez l'homme, le phénotype des LB des OLS. Dans les amygdales, l'expression de marqueurs tels que l'IgD et CD38, a permis de caractériser 5 sous populations : Bm1, Bm2, Bm3, Bm4 et Bm5 comme le montre la figure ci-dessous (**figure 9**).

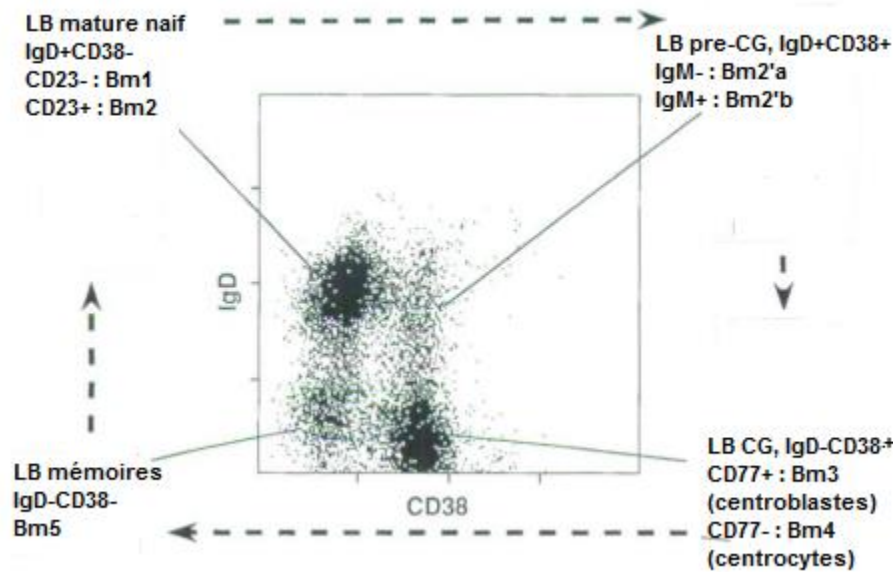


Figure 9 Phénotype des amygdales. Classification des LB retrouvés dans les amygdales. L'utilisation des marqueurs de surface IgD et CD38 subdivise la population des LB en 4: les LB matures naïfs (Bm1, Bm2), les LB pré-centre germinatif (Bm2'a, Bm2'b), les LB des centres germinatifs (Bm3, Bm4) et les LB mémoires (Bm5). D'après Stephen Jackson, 2008, *advances in Immunology*

Les cellules **Bm1** expriment fortement IgD tandis que les **Bm2** expriment le marqueur précoce d'activation CD23. Bm1 et Bm2 ne présentent pas de mutations somatiques des domaines variables des Igs, ce sont donc des cellules naïves $\text{IgD}^+\text{CD38}^-$ (Pascual et al., 1994). Kolar a mis en évidence une sous population intermédiaire entre les LB matures naïfs et les B du centre germinatif, les B **pro-CG**. Ces cellules portent les mêmes marqueurs que les LB matures naïfs, $\text{IgD}^+\text{CD38}^-$. Les pro-CG ont une taille plus grande et des mutations de la région V de l'IgH. Ces cellules sont à un stade G1 du cycle cellulaire contrairement aux LB matures naïfs qui restent au stage G0 du cycle cellulaire (Kolar et al., 2007). Une fois que le LB naïf entre dans le CG, la sélection de l'antigène, la maturation de l'affinité, la recombinaison isotypique et la différenciation des cellules peuvent prendre place. Les **pre-GC** quant à elles sont des cellules double positive $\text{IgD}^+\text{CD38}^+$ qui expriment IgM et diffèrent des cellules $\text{IgD}^+\text{CD38}^+(\text{IgD}^{\text{only}})$ n'exprimant pas l'IgM et ayant un fort potentiel autoréactif (Zheng et al., 2004). Les **Bm3** perdent l'IgD, prolifèrent intensément et présentent des hyper mutations somatiques des domaines variables des Igs (Pascual et al., 1994). Ce sont des centroblastes $\text{IgD}^-\text{CD38}^+\text{CD77}^-$. La population **Bm4** correspond aux Bm3 après sélection positive en fonction de l'affinité du BCR. Ce sont des centrocytes $\text{IgD}^-\text{CD38}^+\text{CD77}^+$. Enfin, les **Bm5** ($\text{IgD}^-\text{CD38}^-$), sont les cellules mémoires exprimant des isotypes IgG ou IgA à leur surface et des marqueurs d'activation tardifs tels que le CD80, CD86 et CD95 (Liu et al., 1995). Dans

les amygdales, les cellules naïves vont se retrouver dans la région folliculaire du tissu alors que les mémoires colonisent les muqueuses épithéliales (Liu et al., 1995).

iii. Les sous-populations B2 dans le sang périphérique

Dans le sang périphérique, les LB sont circulants. Les LB naïfs, mémoires, transitionnelles sont retrouvées dans le sang à des proportions différentes des autres compartiments. Je vais focaliser ce paragraphe sur les B mémoires

Lymphocytes B mémoires : Le principe de la vaccination dépend exclusivement de la mémoire immunologique qui est effectuée par les LB mémoires. Des études sur les survivants de l'épidémie de grippe en 1918 ont montré la présence de LB mémoires spécifiques d'ag qui persiste en absence d'antigène plus de 90 ans après l'épidémie (Yu et al., 2008). Une avancée plus récente a permis de déterminer un marqueur représentant les LB mémoires, le CD27 essentiellement chez l'homme (Klein et al., 1998a). Le CD27 est une glycoprotéine de type I exprimée par certains LB et par la majorité des LT. Les LB CD27⁺ sont aussi caractérisées par des hypermutations somatiques du gène codant le domaine V des Igs augmentant leur affinité pour l'ag. Le signal émis par le CD27 induit la différenciation des LB mémoires en plasmocytes (Agematsu et al., 2000). L'expression du CD27 sur les LB augmente en fonction de l'âge. En effet, le CD27 n'est pas exprimé par les B du cordon ombilical (cordon ombilical = B naïfs à 99%) bien que 40% des LB soient CD27⁺ chez l'adulte (Agematsu et al., 1997). Les cellules mémoires présentent des différences morphologiques par rapport aux LB CD27⁻ et sont des cellules larges avec un cytoplasme abondant. In vitro après une activation polyclonale, ce sont des cellules qui ont la capacité de s'activer rapidement et de produire une quantité élevée d'IgA, M, G et E (Agematsu et al., 1997; Nagumo and Agematsu, 1998). Beaucoup de précisions restent à être apportées au phénotype des LB mémoires. En effet, plusieurs études ont identifié des LB mémoires CD27⁻IgG⁺ qui expriment des mutations des gènes codant la région variable avec des quantités élevées de CD80 et CD86 par rapport aux LB naïfs IgG⁻ (Fecteau et al., 2006; Wei et al., 2007). De plus la stricte définition des LB mémoires comme des cellules « switchées » générées par des réactions du CG T dépendant pourrait exclure des réponses mémoires importantes médiées par des LB « non-switchés » et issus des voies indépendantes des CG. Dans cette lancée, une étude a montré qu'une petite proportion de LB CD27⁺IgD⁺ avaient la capacité de produire des IgM de forte affinité comme les LB switchés (Shi et al., 2003). Une étude récente a mis en évidence l'existence de plusieurs sous-populations de LB mémoires en fonction de leurs origines : les LB mémoires

CD27⁻IgG⁺ dont l'origine est la rate, les CD27⁺IgM⁺IgD⁻ et les LB mémoires « switchées » CD27⁺IgG/A⁺ dont l'origine est le CG (Berkowska et al., 2011). Il est possible aussi de différencier les LB mémoires en fonction de Ig de surface exprimé (IgD^{+/-}), de l'affinité du BCR pour l'antigène, la fréquence des mutations du BCR et l'isotype sécrété après culture *in vitro* (Jackson et al., 2008).

Tableau 1 Phénotype des sous-populations des LB dans le sang périphérique.

Population	Type	Phénotype
Transitionnelle	T1	IgD ⁺ CD27 ⁻ CD10 ⁺ CD24 ^{high} CD24 ^{high} CD38 ^{high} CD5 ⁺ CD10 ⁺ CD27 ⁻ CD21 ^{low}
	T2	IgD ⁺ CD27 ⁻ CD5 ⁺ CD10 ⁺ CD27 ⁻ CD21 ^{high} IgD ^{high}
	T3	IgD ⁺ CD27 ⁻ CD24 ^{int} CD38 ^{int}
Naïve		CD19 ⁺ CD27 ⁻ CD38 ⁻ IgD ⁺
Naïve activée		CD19 ⁺ CD27 ⁻ CD38 ⁺ IgD ⁺
Mémoires	Double - négative	IgD ⁻ CD27 ⁻
	non-switchés	IgD ⁺ CD27 ⁺ IgM ⁺ IgD ⁺ CD27 ⁺ IgM ⁻
	IgM-only	IgM ⁺ IgD ⁻ CD27 ⁺
	Switchés	IgD ⁻ CD27 ⁺ IgM ⁻
CSA	Plasmablastes	IgD ⁻ CD27 ^{high} CD19 ⁺ CD38 ^{high} CD138 ⁻
	Plasmocytes	CD19 ⁻ CD38 ^{high} CD138 ⁺

Les B régulateurs : Ce sont des LB produisant de l'IL-10. L'IL-10 est une cytokine anti-inflammatoire ayant des fonctions suppressives, inhibant la production de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IFN γ , IL17 et diminuant l'expression de CMH II (Saraiva and O'Garra, 2010). Cette cytokine est impliquée dans le maintien de l'expression de FoxP3 par les T regs (Darrasse-Jèze et al., 2009). C'est aussi un facteur de croissance favorisant la différenciation en plasmocytes (Calame, 2001). Les B regs sont CD19⁺CD38⁺CD24⁺CD5⁺CD1d⁺ (Sims et al., 2005). Leur origine et leur développement sont

controversés. Lampropoulou suggère que les Bregs proviendraient des LB FO naïfs qui acquièrent des fonctions suppressives grâce à des signaux reçus lors des réponses immunitaires contre un pathogène (Lampropoulou et al., 2008). Ces signaux engagent les TLR, le CD40 et le BCR. Cependant, il est difficile d'affirmer cette hypothèse car les LB FO produisent très peu d'IL-10 et ne possèdent aucune fonction suppressive (Evans et al., 2007). Une autre étude suggère que les B regs proviendraient d'un progéniteur commun T2-MZP (*marginal zone progenitor*) (Mauri and Bosma, 2012). Ce sont des B immatures autoréactifs qui sont programmés pour répondre rapidement à des pathogènes (Su et al., 2004). Les auteurs proposent que durant la réponse contre un pathogène, l'activation des T2-MZP par les TLRs induise une première sécrétion d'IL-10 entraînant l'activation des LT. Cette activation va permettre aux B regs de recevoir d'autres signaux (CD40, BCR, CD80, CD86) qui vont stabiliser leur production d'IL-10. Des études sur les LB CD24⁺CD38⁺ produisant de l'IL-10 ont montré que ces cellules avaient des propriétés régulatrices dans le lupus. Elles ont la capacité de réduire la fréquence de T CD4⁺ produisant le TNF α et l'IFN γ (Blair et al., 2010). Les Bregs semblent aussi avoir la capacité d'inhiber la prolifération des T (Bouaziz et al., 2010).

Plasmocytes : C'est le stade final de la différenciation des LB. Les plasmocytes sont des cellules sécrétrices d'anticorps. Ils sont en faible quantité en circulation mais sont surtout retrouvés dans la MO où ils expriment la molécule CD138 (González-García et al., 2006; Medina et al., 2002) . Ces cellules ont une longue durée de vie (Slifka and Ahmed, 1998) et sont responsable de la production d' anticorps spécifiques d'un ag donné (Slifka and Ahmed, 1998). Certaines études montrent qu'une sous-population de B mémoires générés durant la réponse antigénique recircule dans la MO et peut se différencier en plasmocytes pour repeupler le compartiment (Paramithiotis and Cooper, 1997). In Vitro, seules les LB CD27⁺ sont capables de se différencier en plasmocytes (Arpin et al., 1995). Le facteur de transcription Blimp1 semble avoir un rôle important dans l'initiation de la différenciation en plasmocytes bien que les souris RAG1^{-/-} avec des LB déficients en Blimp1 ont des quantités normales d'Igs dans le sérum (Kallies et al., 2007). Les plasmocytes vont migrer des amygdales vers le sang puis vers la MO grâce à leur récepteur CXCR4 (Medina et al., 2002).

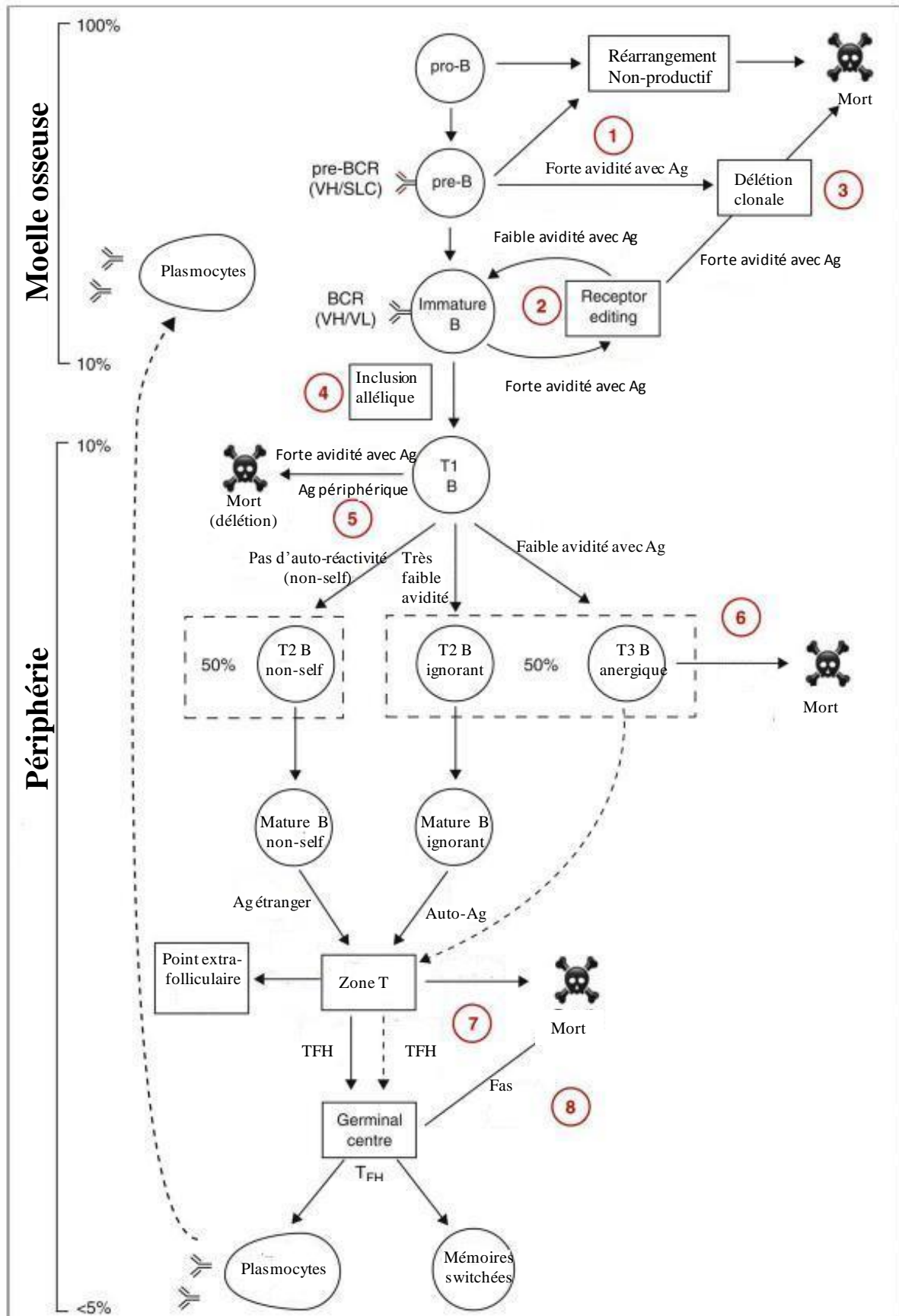


Figure 10 Les mécanismes de contrôle de la tolérance au soi au cours du développement du LB (Basten A et Silveira P, 2010, Curr Opin Immunol).

c) Différentiation des lymphocytes B1

Les B1 ont une capacité d'autorenouvellement (Hayakawa et al., 1986), elles ont une efficacité de présentation antigénique plus importante que les B2 (Zhong et al., 2007). Les B1 ont été identifiés initialement chez la souris comme des cellules IgM⁺IgD⁺ exprimant le marqueur CD5 (Caligaris-Cappio et al., 1982; Hayakawa et al., 1983). Cette population majoritaire chez le nouveau-né est minoritaire chez l'animal adulte. L'origine des B1 est très controversée : certains leur confèrent une origine fœtale alors que d'autres pensent qu'ils sont d'origine hématopoïétique. En effet, le transfert de MO chez des souris irradiées ne permet pas de reconstituer la population B1 contrairement au transfert de foie fœtal (Hayakawa et al., 1985). La majorité des B1 résident dans les cavités pleurales et péritonéales des poumons et des intestins (Kroese et al., 1989), très peu sont retrouvés dans la rate et ils sont absents dans le sang. Des études montrent que les B1 de la rate et ceux de la cavité péritonéales diffèrent en fonction de l'expression du CD11b et de la sécrétion d'Igs (Tumang et al., 2004). Le développement des B1 nécessite un signal BCR mais aussi un BCR avec une spécificité fonctionnel (Chumley et al., 2000; Hardy and Hayakawa, 2001). En effet, le nombre de B1 est réduit lorsque le signal BCR est insuffisant. Deux types de B1 ont été décrits chez la souris : les cellules **B1a** et les **B1b**. les cellules **B1a** sont des cellules qui vont produire des anticorps IgM indépendamment de toute stimulation antigénique (T-indépendant) (Hayakawa et al., 1984). Ces anticorps sont appelés des anticorps naturels avec un répertoire limité et polyréactif pour la reconnaissance d'une large gamme de motifs Antigéniques portés par des pathogènes (Hayakawa and Hardy, 2000). Ce sont des cellules en première ligne de défense contre la plupart des infections et les seules contre des bactéries encapsulées (Kruetzmann et al., 2003). Les B1a sont des cellules importantes dans l'immunité innée anti infectieuse (Briles et al., 1981). Les **B1b** n'expriment pas le CD5. Ce sont des cellules responsables des réponses immunes adaptatives contre les ags polysaccharidiques et d'autres ags indépendants du signal T (Haas et al., 2005). La sécrétion des auto-anticorps par les B1 pourrait contribuer au développement de certaines maladies autoimmunes tels que le lupus (Berland and Wortis, 2002). Les B1 semblent être une source majeure IL-10 mais les effets des B1 sécrétrices d'IL-10 semblent controversés dans le modèle animal de lupus (Ishida et al., 1994). Les B1 peuvent également induire l'activation et la prolifération des LT naïfs de manière efficace, ce sont des présentatrices d'antigènes efficaces (Sato et al., 2004).

Chez l'homme, la population LB CD5⁺ n'est pas considérée comme la population B1 et l'identification de ces cellules reste hypothétique. Cependant une étude récente relance le

débat (Griffin et al., 2011). Les auteurs ont caractérisé une population B1 dans le cordon ombilicale et le sang périphérique. Elle se subdivise en deux, les B1 CD11b⁻ qui sécrètent spontanément des IgM et les B1 CD11b⁺ qui expriment fortement le CD86 et stimule efficacement les LT CD4⁺ (Griffin and Rothstein, 2011). La fréquence des B1 reste controversée chez les témoins sains ce qui a amené à des nouveaux critères d'identification (Griffin and Rothstein, 2012).

4) Implication des LB dans la SEP

Dans la SEP, la spécificité des LB pour un antigène donné a souvent été étudiée à travers la spécificité des anticorps sécrétés bien que dans l'EAE, le transfert d'anticorps soit incapable d'induire la maladie (Oliver et al., 2003)

a) Le modèle animal et les lymphocytes B

Les premiers travaux sur le modèle animal ont mis en avant les T CD4⁺ comme des effecteurs essentiels dans le développement de la maladie. Schluesener a montré que l'injection d'anticorps monoclonaux anti-MOG chez des souris présentant une EAE par induction active, contribue à la démyélinisation (Schluesener et al., 1987) mais les quantités injectées dans cette étude (200 µg/g selon le poids de l'animal) semblent très éloignées de la concentration d'anticorps pouvant être produite de manière endogène. Dans une autre étude, l'immunisation des souris avec la MOG recombinante humaine (rMOG), donne une EAE sévère avec une forte production d'anticorps (Oliver et al., 2003) mais ces anticorps ne sont pas capables d'induire une EAE chez des animaux naïfs. L'auteur dans son étude a comparé les effets de la MOG recombinante (rat, humain) à ceux de peptides MOG₍₃₅₋₅₅₎ correspondant sur le développement de la maladie (La MOG de rat est identique à celle de la souris mais diffère de la MOG humaine au niveau de la position 42 par le remplacement d'une proline par une sérine). Cette étude montre que la région MOG₍₃₅₋₅₅₎ de rat est cruciale pour le développement d'une EAE. Cependant ce même peptide humain n'induit qu'une très faible EAE bien qu'il soit très immunogène *in vitro*. Ce résultat confirme que le modèle induit par la MOG₍₃₅₋₅₅₎ de rat est essentiellement caractérisé par une réponse T et indépendante de B. L'immunisation des souris déficientes en LB avec le peptide MOG₍₃₅₋₅₅₎ entraîne le développement d'une EAE. Cependant, l'immunisation de ces souris avec la rMOG humaine n'aboutit pas au développement d'une EAE (Lyons et al., 1999) mais la susceptibilité est rétablie par induction d'anticorps spécifiques d'antigène : l'action des B sur la maladie dans ce modèle passe par la production d'anticorps (Lyons et al., 2002). Ces études nous montrent

combien il est important de choisir la méthode d'induction et l'antigène pour étudier l'implication de certaines cellules dans la maladie.

L'utilisation des modèles transgéniques a permis d'éclairer sur la fonction et le devenir des LB spécifiques d'un antigène myélinique. Litzemberger a utilisé un modèle Transgénique (Tg) de souris ayant un BCR Tg dont la chaîne H provient d'un anticorps pathogénique spécifique de la MOG (Litzemberger et al., 1998). Cet anticorps (8.18-C5) a la capacité d'induire une démyélinisation et une aggravation des signes cliniques dans les modèles EAE (Linnington et al., 1988). C'est un modèle obtenu par Knock In (KI), le gène cible sur le locus est invalidé et ensuite le gène d'intérêt est introduit dans la région souhaitée. Ces souris Tg ne développent pas une EAE de manière spontanée mais elles développent une EAE sévère si elles sont immunisées avec des antigènes de la myéline ou des LT antigènes spécifiques de la MOG. Deux autres groupes ont décrit des souris doublement transgéniques qui développent spontanément une EAE ressemblant à la maladie de Devic humaine souvent considéré comme une forme de SEP et mettent en avant l'importance de la coopération entre des LT et des LB reconnaissant le même auto-antigène dans la maladie (Bettelli et al., 2006; Krishnamoorthy et al., 2006).

Le LB a plusieurs fonctions dont les majeures sont : la production d'anticorps après différenciation, la présentation d'antigène aux LT CD4⁺ et la production de cytokines.

b) Les sous-populations de LB dans la SEP

Plusieurs études se sont intéressées à la redistribution des sous-populations B dans la SEP. Les sous-populations de LB ont été explorées en majorité dans le sang mais aussi dans le LCR des patients atteints de SEP. Le tableau ci-dessous résume les différentes études qui mettent en avant une différence entre patients et témoins (**Tableau 2**).

Tableau 2 : Les sous-populations de LB chez les patients atteints de SEP.

Marqueurs	Contrôles	Patients	Forme de SEP	Sang	LCR	auteurs
CD19 ⁺ CD5 ⁻	MNNI	Augmentation	RR		X	(Sellebjerg et al., 2002)
CD19 ⁺ CD5 ⁺	MNNI	Augmentation	ND		X	(Mix et al., 1990)
CD19 ⁺ CD5 ⁺	Témoins sains	Augmentation	SP	X		(Bongioanni et al., 1996)
CD19 ⁺ CD5 ⁺	Témoins sains	Diminution	SP	X		(Niino et al., 2012)
CD19 ⁺ CD138 ⁺	MNNI	Augmentation	ND		X	(Cepok et al., 2005)
CD19 ⁺ CCR5 ⁺ CD19 ⁺ CXCR3 ⁺	Témoins sains	Augmentation	RR en poussée RR en poussée	X X	X	(Sørensen, 2002)
CD27 ⁺ CD86 ⁺ CD27 ⁻ CD86 ⁺ CD27 ⁻ CCR5 ⁺	Témoins sains	Augmentation	RR	X		(Niino et al., 2009)
CD3 ⁻ CD20 ⁺ CD27 ⁺ CD43 ⁺ CD20 ⁺ CD27 ⁺ CD43 ⁻	Témoins sains	Diminution	RR	X		(Tørring et al., 2013)
CD20 ⁺ CD27 ⁻ CD43 ⁻	Témoins sains	Augmentation	RR	X		(Tørring et al., 2013)

Les LB CD5⁺ produisent des autoanticorps polyréactifs qui peuvent reconnaître des ags du SNC (Pers et al., 1999). L'augmentation de cette sous-population dans le LCR pourrait avoir un rôle dans le développement de la SEP, de plus une étude montre que l'augmentation de l'expression du CD5 corrèle avec l'activité inflammatoire (prise de gadolinium) (Seidi et al.,

2002). Dans le LCR, la majorité des LB de patients sont des LB mémoires $CD19^+CD27^+$ avec deux sous-populations les LB $CD27^+$ et les LB $CD27^{high}$. Dans la population $CD27^{high}$, une majorité de LB sont des plasmablastes car ils expriment le CD138 (Syndecan-1) (Cepok et al., 2005). Ces plasmablastes pourraient être à l'origine de la synthèse intrathécale d'Igs retrouvée chez la majorité des patients (Cepok et al., 2005). Une autre étude a comparé la répartition des sous-populations de LB entre le LCR et le sang (Corcione et al., 2004). Il montre un enrichissement du LCR en cellules mémoires, en mémoires non-switchées, en centroblastes et en mémoires activées ($CD80/CD86$) par rapport au sang chez les patients atteints de SEP (Corcione et al., 2004). Niino a comparé l'expression des marqueurs comme le CD80, CD86, CD5, CXCR3, CCR5 dans la population mémoire et naïve (voir **tableau 2**) en périphérie. Il souligne aussi que des différences peuvent être observées en fonction de l'état du patient (rémission ou poussée). En effet, les patients rémittents auraient plus de LB mémoires, de LB $CD86^+$, de LB exprimant le CCR5 et de LB $CD80^+$ que les patients en poussées. Plus précisément cette différence entre patients rémittents et patients en poussées s'accroît lorsque l'expression des marqueurs est comparée au sein de la population mémoire ou naïve (Niino et al., 2009).

Les patients atteints de SEP semblent avoir une répartition unique des sous-populations de LB qui varie en fonction de la forme clinique, l'activité de la maladie et le compartiment étudié.

c) La production d'anticorps

90% des patients atteints de SEP présentent des bandes oligoclonales dans le LCR (Freedman et al., 2005; Kabat et al., 1948). Il a été démontré que ce sont les clones B contenus dans le LCR qui sont à l'origine de la synthèse des Igs dans le LCR (Obermeier et al., 2008). De même, l'analyse de la région variable de la chaîne lourde (VH) des Igs présents dans les lésions ou celle des LB dans le LCR a montré une dominance de certaines familles VH et une accumulation de mutations somatiques. Ces résultats sont obtenus lorsqu'une réponse anticorps est dépendante d'un antigène (Baranzini et al., 1999; Owens et al., 1998). Comme mentionné plus haut, le type de lésions le plus fréquent dans la SEP est caractérisé par la présence d'anticorps et de complément. Ces lésions suggèrent une production locale d'anticorps pouvant contribuer à la démyélinisation du SNC (Breij et al., 2008). Les Igs extraites des lésions de patients atteints de SEP reconnaissent en majorité le peptide MBP 83-97 car l'ajout de la forme soluble de ce peptide inhibe la reconnaissance Ig-MBP (Warren and Catz, 1993). D'autres études ont détecté des B spécifiques de MBP et des plasmocytes le tissu cérébral des patients grâce à de la MBP marquée (Gerritse et al., 1994). Une étude

comparative montre la présence d'anticorps anti-MOG à un taux élevé dans le parenchyme des patients par rapport aux LCR et aux sérums (O'Connor et al., 2005). Genain en utilisant une technique immunomarquage de précision et un microscope à haute résolution a identifié des anticorps anti-MOG dans les lésions aiguës chez les patients atteints de SEP et chez les marmosets EAE (Genain et al., 1999)

Bornstein a montré dans un modèle de rat EAE que les anticorps du sérum de ces animaux étaient capables d'induire une démyélinisation sur des cultures de cervelets (Bornstein et Appel, 1965). Les sérums des rats EAE contenaient des anticorps anti myéline. Les anticorps pourraient contribuer à la démyélinisation dans la SEP en opsonisant la myéline pour favoriser la phagocytose (Trotter 1986), et par l'action du complexe d'attaque membranaire du complément (Storch, 1998). Les investigations sur la présence et la spécificité des anticorps contre des protéines myéliniques (MOG, MBP, PLP) ont été faites mais restent sujet à débat (Berger et al., 2003; Kuhle et al., 2007; O'Connor et al., 2005). Certaines études montrent une association entre la présence d' anticorps anti-MBP ou anti-MOG en périphérie et le développement de la maladie (Berger et al., 2003) alors que d'autres non (Kuhle et al., 2007). Une étude d'enfants atteints de SEP et de patients adultes avec différentes formes et CIS a montré des résultats surprenants concernant les anticorps anti-MOG en périphérie. En effet, les Ac anti-MOG sont retrouvés en périphérie chez 22% des enfants présentant une SEP pédiatrique, 4% des patients adultes SEP et 7% des patients CIS (McLaughlin et al., 2009). Les anticorps anti-MOG pourraient être impliqués dans la pathogénéicité de la SEP chez l'enfant. Les études de la spécificité antigénique des Ac dans le LCR restent contradictoires bien que plusieurs études trouvent une corrélation entre l'augmentation du taux d'anticorps dans le LCR et une forme agressive de la maladie (Cepok et al., 2001; Magliozzi et al., 2007). En effet, les anticorps anti-MBP ont été décrits dans le LCR des patients atteints de SEP. Cependant, les bandes oligoclonales du LCR ne reconnaissent pas en majorité des anticorps myéliniques mais plutôt des anticorps dirigés contre des antigènes dérivés de virus comme le HHV-6 ou l'EBV (Virtanen et al., 2013) bien que cela ne soit pas spécifique à la SEP (Sindic et al., 1994) car cette observation concerne aussi d'autres maladies inflammatoires du SNC. Certaines études n'ont pas trouvé d'anticorps anti-protéines dérivées de la myéline dans le LCR des patients atteints de SEP (Archelos et al., 1998; Brokstad et al., 1994).

Les anticorps n'ont pas uniquement un rôle pathogénique, certains auteurs leur confèrent un rôle bénéfique. Avrameas met en avant un rôle des anticorps dits naturels dans l'homéostasie

de l'organisme (Avrameas, 1991). Warrington montre dans le modèle EAE induit par un virus que les anticorps dirigés contre des antigènes des oligodendrocytes pouvaient induire une remyélinisation comme le fait la thérapie de transplantation d'oligodendrocytes (Warrington et al., 2000). Les auto-anticorps myéliniques en particulier anti-MBP ou anti-MOG ont été extraits de tissus cérébral et sont retrouvés dans le LCR et le sang des patients atteints de SEP. Bien que ces résultats soient controversés et que la spécificité de ces anticorps ne soit pas pleinement établie, ils suggèrent l'implication des anticorps dans la destruction des tissus mais pas comme première cause de la SEP.

d) La fonction présentatrice d'antigène

La fonction présentatrice d'antigène du LB a été mise en évidence dans un modèle de souris Tg ayant des LB avec un BCR mais incapables de sécréter des anticorps. En effet, ces souris Tg développent le lupus comme les souris non-Tg, le LB semble donc avoir une fonction importante capable d'induire une maladie médiée par les B sans production d'anticorps (Chan et al., 1999). Dans l'EAE, il a été montré que la présentation antigénique par les cellules dendritiques est suffisante pour induire une EAE. Le rôle de CPA des LB n'est pas donc exclusif dans l'EAE (Greter et al., 2005). Pöllinger a montré dans un modèle de souris Tg TCR spécifique de la MOG₍₉₂₋₁₀₆₎ que la présence de MOG et de LB étaient indispensables pour le développement d'une EAE de manière spontanée avec des phases de poussées et de rémissions comme le SEP de forme rémittente. Une coopération entre le T anti-MOG et le B autoréactifs semble être importante (Pöllinger et al., 2009). Cependant les LB ont la capacité de reconnaître des Ag protéiques par leur BCR (Van der Veen et al. 1992) et de les présenter efficacement par les molécules du CMH II pour l'activation des LT surtout quand l'Ag est en faible quantité (Rivera et al. 2001). En effet, les LB sont des CPA efficaces qui internalisent les Ags et les présentent aux LT à des concentrations 10 000 fois plus faibles que celle requises par les CPA comme les monocytes (Meinl et al., 2006). Les cellules B naïves possédant une faible ou une absence d'activité de co-stimulation (CD40, CD80) sont des CPA inefficaces pour les T naïfs (Ho et al., 1994).

Dans la SEP, Genç et al. montrent une augmentation des LB présentant la molécule de co-stimulation CD80 chez les patients en poussée (Genç et al., 1997) ce qui n'est pas le cas des patients avec une forme primaire progressive qui présentent une diminution du nombre de B exprimant le CD80 (Bar-Or et al., 2001). Le CD80 est une molécule de co-stimulation portée par les CPA qui peut traduire dans le contexte de la SEP l'activation de la fonction présentatrice des B lors d'une poussée. D'autres comme C Harp et al. ont montré *in vitro* que

les LB mémoires de patients ayant une forme rémittente étaient capables de présenter des antigènes myéliniques comme la MBP ou la MOG aux LT CD4⁺. Ces LB mémoires permettent donc une prolifération des LT et une sécrétion d'IFN γ (Harp et al., 2010). Les LB semblent être des CPA efficaces dans la SEP.

e) La production de cytokines

Les LB activés ont la capacité de produire une large gamme de cytokines anti ou pro-inflammatoire dans un contexte de conflit immunologique pouvant moduler la maturation et la fonction des autres effecteurs cellulaires de l'immunité (Barr et al., 2012) (Lund and Randall, 2010). Des études après une stimulation par l'IFN γ ou le TLR9 montrent que les patients produisent un taux élevé de cytokines pro-inflammatoire (LT α et TNF α), ces cytokines contribuent à activer les réponses Th1 et Th17 impliquées dans la maladie (Bar-Or et al., 2010). L'IL-6 produite par les LB est une autre cytokine pouvant avoir un rôle pathogénique dans la SEP. L'utilisation des souris IL-6 *-/-* a montré que l'IL-6 pourrait être essentielle pour le développement d'une EAE (Eugster et al., 1998; Mendel et al., 1998). Les LB sécrétant de l'IL-6 après activation polyclonale activent efficacement les LT *in vitro* (Lampropoulou et al., 2008). De plus, les LB de patients avec une SEP produisent plus d'IL-6 que ceux des témoins sains (Barr et al., 2012). Le TGF β est une cytokine sécrétée par les LB. Des souris Tg exprimant le TGF β 1 dans le SNC développent plus rapidement et de manière sévère une EAE par rapport aux souris non-Tg (Wyss-Coray et al., 1997). Le TGF β 1 oriente la différenciation des LT en Th17 (Veldhoen et al., 2006) qui sont des cellules impliquées dans les inflammations du CNS notamment dans l'EAE (Langrish et al., 2005).

Selon les stimulations *in vitro*, les LB de patients avec une SEP présentent un profil cytokinique particulier. Duddy dans une étude comparative entre la stimulation BCR-CD40 et celle par le CD40 montre que les LB de patients atteints de SEP produisent des taux identiques de cytokines pro-inflammatoires comme les témoins sains après les deux stimulations mais une déficience en production d'IL10 (Duddy et al., 2007). Ils montrent aussi une différence de profil cytokinique en fonction du phénotype des B (Mémoires ou naïves). Les LB mémoires sécrètent en général des cytokines pro-inflammatoires comme le TNF α et l'IL-6 tandis que les LB naïfs sécrètent de préférence des cytokines anti-inflammatoires comme l'IL-10 (Duddy et al., 2007). Des études dans le modèle EAE ont révélé qu'une sous-population de B produisant de l'IL-10 permettait d'atténuer la maladie chez les souris EAE (Fillatreau et al., 2002). En effet, Fillatreau et al. montrent que les B produisant de l'IL-10 activés de manière T dépendante (CD40) régulent la réponse Th1. Dans

la SEP, Duddy et Hirotani ont montré un défaut de sécrétion de IL-10 (Duddy et al., 2007; Hirotani et al., 2010). Une autre étude de Knippenberg a montré que les patients rémittents avaient une diminution des B regs (LB sécrétant de l'IL-10) circulants comparés aux témoins après stimulation par la voie du TLR9 (Knippenberg et al., 2011). Dans notre équipe, une étude récente ne trouve aucune différence entre les B regs des patients atteints de SEP et ceux des témoins (Michel et al. soumis). Après stimulation *in vitro*, la capacité des B regs à produire de l'IL-10 chez les patients n'est pas altérée. De même, ces B regs présentent un phénotype et une fonction suppressive identique à celles des témoins sains (Michel et al., Soumis).

Les LB semblent avoir un rôle dans la pathogénéicité de la SEP à travers divers mécanismes qui pourraient être : une présentation efficace des antigènes aux cellules effectrices dans les tissus et en périphérie, une costimulation avec des LT y compris les LT autoréactifs, une démyélinisation médiée par les anticorps produits par les plasmocytes et un recrutement des cellules immunitaires sur les sites inflammatoires par la production de cytokines.

OBJECTIFS DE LA THESE

Intérêt de l'étude des LB spécifiques de la MOG dans la SEP

La SEP est une maladie du SNC ayant une composante autoimmune. Plusieurs arguments plaident en faveur de cette composante comme les effets thérapeutiques des traitements immunosuppresseurs et immunomodulateurs, les données histologiques des lésions et le modèle animal. L'EAE, encéphalomyélite autoimmune expérimentale est le modèle animal présentant certaines similitudes avec la SEP (Batoulis et al., 2011). Dans ce modèle, l'immunisation par les T dirigés contre des ags de la myéline permet de déclencher une maladie expérimentale (Ben-Nun et al., 1981) mettant en avant l'importance des LT autoréactifs dans la maladie. L'autoréactivité des LT dans la SEP est bien connue (Elong Ngonu et al., 2012) mais les outils permettant d'étudier l'autoréactivité des LB dans la SEP manquent. L'approche de l'implication des LB autoréactifs par l'étude des anticorps spécifiques d'autoantigènes dans le sang et le SNC a permis de comprendre certains mécanismes (Weber et al., 2011). Cependant, au cours ces dernières années, d'autres fonctions du LB comme la capacité à présenter des antigènes aux LT (Meinl et al., 2006; Pöllinger et al., 2009) ou la sécrétion de cytokines anti/pro-inflammatoires (Duddy et al., 2007, 2004; Fillatreau et al., 2002) ont montré leur importance. De plus l'effet bénéfique du Rituximab (Anti-CD20) chez les patients SEP (réduction des poussées sans altération de la production d'anticorps) montre l'importance des autres fonctions du LB dans la SEP.

Quelle est la place de l'autoréactivité des LB dans la SEP ?

Pour répondre à cette question, nous avons comme challenge d'identifier et de caractériser ces cellules. En périphérie, la fréquence des B autoréactifs est très faible et très peu d'études s'y intéressent. Les résultats que je vais vous présenter sont en deux axes : le premier décrit la méthode que j'ai mise au point permettant d'analyser les LB spécifiques d'un antigène donné en périphérie (**Article I**). Le deuxième axe est l'application de cette méthode dans la SEP pour analyser les LB reconnaissant un antigène dérivé de la myéline souvent étudié dans la SEP, la MOG (**Article II**). L'analyse de cette population consistait à déterminer sa fréquence, son phénotype et sa fonction dans la SEP.

RESULTATS

Article I

***CHARACTERIZATION OF ANTIGEN-SPECIFIC B CELLS
USING NOMINAL ANTIGEN-COATED FLOW-BEADS.***

**CHARACTERIZATION OF ANTIGEN-SPECIFIC B CELLS USING NOMINAL
ANTIGEN-COATED FLOW-BEADS.**

Nicolas Degauque^{1,2,3*}, Annie Elong Ngonon^{1,2,3*}, Ahmed Akl^{1,2,3}, Maud Lepetit^{1,2,3}, Romain Crochette^{1,2,3}, Magali Giral^{1,2,3}, Julie Lepourry^{1,2,3}, Annaïck Pallier^{1,2,3}, Stéphanie Castagnet^{1,2,3}, Emilie Dugast^{1,2,3}, Cécile Guillot-Gueguen², Marylène Jacq-Foucher⁴, Xavier Saulquin^{3,5}, Anne Cesbron⁶, David Laplaud^{1,2,3,4}, Arnaud Nicot^{1,2,3}, Sophie Brouard^{1,2,3+} and Jean-Paul Soulillou^{1,2,3+}

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

²CHU de Nantes, ITUN, Nantes, F-44093, France

³Université de Nantes, Faculté de Médecine, Nantes, F-44035, France.

⁴INSERM, CIC 004, Nantes, F-44093, France

⁵INSERM, UMR892, Nantes, F-44093, France

⁶Etablissement Français du Sang, Laboratoire HLA, Nantes, F-44093, France

*Nicolas Degauque and Annie Elong Ngonon contribute equally to the work and should be considered as co-first authors

+Sophie Brouard and Jean-Paul Soulillou are co-senior authors

Corresponding author

Jean-Paul Soulillou

Pavillon Jean Monnet

Hôtel Dieu - CHU de Nantes

30, Bd Jean Monnet

44093 Nantes cedex 01

France

Phone +33 (0)240087410

Fax +33 (0)240087411

Email jean-paul.soulillou@univ-nantes.fr

Abstract

In order to characterize the reactivity of B cells against nominal antigens, a method based on the coupling of antigens onto the surface of fluorescent core polystyrene beads was developed. We first demonstrate that murine B cells with a human MOG-specific BCR are able to interact with MOG-coated beads and do not recognize beads coated with human albumin or pp65. B cells purified from human healthy volunteer blood or immunized individuals were tested for their ability to interact with various nominal antigens, including viral, vaccine, self and alloantigens, chosen for their usefulness in studying a variety of pathological processes. A substantial amount of B cells binding self-antigen MOG-coated beads can be detected in normal blood. Furthermore, greater frequencies of B cell against anti-Tetanic Toxin or anti-EBNA1 were observed in primed individuals. This method can reveal increased frequencies of anti-HLA committed B cells in patients with circulating anti-HLA antibodies compared to unsensitized patients and normal individuals. Of interest, those specific CD19 cells were preferentially identified within CD27-IgD⁺ (i-e naïve) subset. These observations suggest that a broad range of medical situations could benefit from a tool that allows the detection, the quantification and the characterization of antigen-specific blood B cells.

Introduction

The crucial role of B cells in a number of autoimmune diseases, such as multiple sclerosis[1]and rheumatoid arthritis[2], has been recently highlighted through the study of anti-CD20 in clinic. Having access to specific antigencommitted blood B cells in humans would be an important step towards better understanding B cells' potential role in autoimmunity and responses against infectious agents and allotransplants. B cells are not only plasmocyte progenitors, but also display regulatory functions[3,4], are good presenting cells[5]and can have direct cytotoxic effects[6-8]. Mechanisms shaping the early B cell repertoire rely predominantly on receptor editing and anergy,and not on deletion[9,10]. However, in humans a substantial frequency of mature circulating B cells still show some degree of autoreactivity and or polyreactivity, which survives the first checkpoint of B cell repertoire maturation[11], and persisting autoreactive B cells in the mature repertoire[12]. There is thus a continuous need for effective regulation – mostly from T_{REG}– to avoid any deleterious reaction.

In human, the analysis of autoreactive B cell frequency has been most often indirectly approached using the reactivity of antibodies produced in vitro in B cell culture supernatants in limiting dilution conditions[13],where it seems that tools identifying committed B cells by direct interaction would be more effective. A number of such direct interaction approaches have been developed such as the use of modified tetramers that consist of a R-PE-labeled streptavidin core and four biotinylated proteins[14]. The main limitation of such an approach is the heterogeneous binding of B cells. B cells will not only bind to the target protein but also to the fluorescent molecule (i-e PE) and biotin epitopes within the tetramer. To circumvent this problem,a concomitant use of another tetramer (conjugated to a different fluorochrome) is needed to exclude unspecific binding. In addition, such a method may face technical difficulties in achieving a stereotyped labeling of the reagents, which may vary from batch to batch.

In this report, we used fluorescent Bio-plex COOH beads that contain a fluorescent internal core and can be covalently linked to any protein. A broad variety of antigens can be analyzed simultaneously through varying theratio of two fluorescent molecules within the bead internal core. The strategy was first assessed using B cells purified from 8.18-C5 transgenic mice expressing human anti-MOG BCR[15]. B cells purified from healthy human blood and immunized individuals were then tested for their ability to interact with various nominal

antigens, including viral, vaccine, self and alloantigens, all of which may have some usefulness to the study of various pathological processes. For instance, we show increased frequencies of anti HLA committed B cells in patients with circulating anti HLA antibodies compared to unsensitized patients or normal individuals. We also show that, similarly to T cells [16,17], a substantial amount of B cell binding self-antigen MOG coated beads can be detected in normal individual blood, confirming the permissivity of the first B cell tolerogenic checkpoint in humans. Furthermore we show that there is a high frequency of blood B cells against anti-Tetanic Toxin or anti-EBNA1 in primed individuals. Finally, B cells could be depleted from MOG specific B cells and this later fraction could be enriched by more than 40 fold. These observations suggest that a broad range of medical situations could be benefit from a tool that allows the detection, the quantification and the characterization of blood antigen-specific B cells.

Material and Methods

Subjects and Ethics statement

The University Hospital Ethical Committee and the Committee for the Protection of Patients from Biological Risks approved the study. All kidney transplant patients (n=31) and healthy volunteers (n=38) included for study gave written informed consent (**Table 1A and B**). Two sets of kidney transplant recipients were recruited based on the use of single HLA-A*0201 coated beads (**Table 1A**) and single HLA class I antigen coated beads (**Table 1B**). (**Table 1A**). Kidney transplant recipients with specific anti-HLA-A*0201 antibodies (Luminex) and, biopsy-proven or not, antibody mediated rejection[18] (ABMR; n=10). Eight non-sensitized kidney transplant recipients with stable graft function under standard immunosuppression (serum creatinine < 150µmol/L and proteinuria < 1g/24h and with less than 20% change in the values between the two previous 6-month follow-up visits).(**Table 1B**). Thirteen transplant patients under standard immunosuppression with kidney graft dysfunction (serum creatinine > 150µmol/L) during the study follow-up periods, who had developed anti-HLA class I antibodies.

Blood samples and B cell isolation

Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were separated on a Ficoll gradient layer and either frozen in DMSO-10% autologous serum or used to purify CD19⁺ B cells using the human B Cell Isolation Kit (Miltenyi Biotech) according to the manufacturer's instructions.

Coupling of proteins to fluorescent beads

20 µg of recombinant human MOG₁₋₁₂₅ (extracellular domain of human MOG along with a 6x His tag expressed in E.coli.;Eurogentec), human albumin (LFB), CMV pp65 peptide (SVLGPISGHVLKAVF ; Eurogentec), EBNA-1 (1-90 and 408-498 amino acids; Prospec) and non-toxic TT C-fragment from clostridium tetani (Sigma) proteins were coupled to fluorescent Bio-plex COOH beads (Bio-Rad) or magnetic fluorescent Bio-plex COOH beads (Bio-Rad) according to the Bio-Plex Amine Coupling Kit (Bio-Rad) instructions. The efficiency of the coupling reaction was assessed systematically by flow cytometry.

Quantification of Ag-specific B cells in mice

Dissociated splenocytes from transgenic mice[19] (generous gift from Dr.G.Krishnamoorthy and H.Wekerle, Max Planck Institute of Neurobiology) were frozen in DMSO-10%

autologous serum. The transgenic mice, generated by Litzenburger et al., express the VDJ region of the MOG-specific H chain from the hybridoma 8.18-C5[15]. To quantify antigen specific B cells, splenocytes were stained with CD19-PE (1D3), incubated with beads (60' at 4°C in the dark) and events were acquired on a flow cytometer LSR II (BD Biosciences). DAPI was systematically used as viability marker.

To evaluate the specificity of transgenic B cells, spleen cells stained with anti-CD19 mAb were pre-incubated for 30' with 20 µg of free proteins (MOG₁₋₁₂₅, albumin or pp65), washed before adding beads coupled with MOG₁₋₁₂₅ as previously described. In order to establish the affinity of beads-B cells interactions, increasing concentrations of MOG₁₋₁₂₅ were used to prevent the binding between B cells and MOG₁₋₁₂₅-coated beads.

Identification of nominal antigen-specific B cells.

Frozen PBMC or purified B cells were used to analyze the B cell reactivity toward single antigen HLA class I coated beads (One Lambda) or custom nominal antigen coated beads. The reactivity toward 97 HLA class I antigens (31 HLA-A, 50 HLA-B and 16 HLA-Cw alleles) was tested simultaneously using beads with different ratio of 2 fluorochromes.. 5×10^6 PBMCs or at least 5×10^4 purified B cells were surface stained with antibodies specific for CD19 (HIB19), CD27 (M-T271) and IgD (IA6-2). DAPI was used to exclude dead cells from the analysis. The cells were analyzed with a LSRII flow cytometer. After surface staining, the cells were resuspended in 100uL of PBS 0.5% bovine serum albumin (BSA), and 2 mM EDTA. Nominal antigen coated beads were added and incubated at room temperature for 20' in the dark. 300 uL of PBS/BSA/EDTA was added before the acquisition. All the antibodies were from BD Biosciences. Frequencies of antigen specific B cells below 0.01% were discarded.

Inhibition assay using HLA-A*0201 multimer

CD19 stained purified B cells were incubated with a cocktail of HLA-A*0201 multimer (HLA-A*0201/MP₅₈₋₆₆, HLA-A*0201/HCw1, HLA-A*0201/pp65; synthesized as previously described[20]) and then with 2.5uL of single HLA-class I antigens (at room temperature for 20 min in the dark). 300 uL of PBS/BSA/EDTA was added before the acquisition.

Depletion of B cell specific for single-HLA class I antigen-coated beads.

CD19+DAPI- cells that did not recognize any of the HLA class I molecules were isolated using an ARIA FACS-sorter and cultured for 4 days in complete RPMI medium supplemented with the following activation cocktail (anti-F(ab)² 2ug/mL ; CD40L 50ng/mL ; enhancer 5ug/mL ; ODN2006 2.5 ug/mL ; IL-2 50 U/mL). After 4 days of culture, the cells were recovered, incubated with HLA-class I coated beads for 20 min at room temperature before cell acquisition.

Statistical methods

Comparison was performed using a Mann-Whitney test or a Kruskal-Wallis test followed by a Dunn's post-hoc test, using Graphpad Prism 5. P-values below 0.05 were considered statistically significant.

Results

Identification of CD19 cells reactive to antigen-coated beads.

In order to characterize the reactivity of B cells against nominal antigens, a method based on the coupling of antigens onto the surface of fluorescent core polystyrene beads was developed. Such beads are routinely used to identify anti-HLA antibodies in the serum of kidney transplant recipients[21,22] and, more recently, to some anti-self-antigen antibodies (MPO, ANCA, PR3)[23]. The principle of this method applied to the detection of B cells committed to a given antigen is shown in figure 1 as well as an example (Figure 1C). The reactivity of B cells against a single (Figure 1A) or multiple antigens (beads of different fluorescence coated with a nominal antigen; Figure 1B) can be assessed. After co-incubation of the cells with single antigen-coated beads, cells that bound to the beads are first identified based on their forward and side scatter. Bead-B cell rosettes (BBR) exhibit both the features of antigen-coated beads (very low FSC and high SSC) and of B cells (intermediate FSC and low SSC). After the exclusion of DAPI+ cells, B cells that recognized single antigen-coated beads are identified in the upper right gate. The frequency of B cells interacting with single antigen coated beads can then be obtained after the exclusion of beads that do not interact with B cells (Figure 1A). When multiple reactivity is analyzed at the same time, as in for HLA alleles (Figure 1B), the frequency of B cells specific to beads coated with a given antigen is evaluated after the successive gating of: 1) single antigen-coated beads – CD19+ cells rosettes, 2) the target antigen specificity (using the unique grade of 2 fluorochromes), and, 3) B cells bound to the specific antigen-coated beads. Knowing the number of B cells within the sample, the frequency of B cells specific to a given HLA Class I antigen-coated bead can be estimated. In the following sections, we show that this test allows the enumeration of the frequency of B cells committed against a variety of antigens, ranging from autologous, alloantigens, viral to vaccination determinants.

Bead-based method allows the measurement of antigen-specific B cells frequencies

Splenocytes from 8.18-C5 mice[15] expressing a transgenic human anti-MOG BCR were used to validate the principle of the method. When transgenic B cells were co-incubated with MOG-coated beads, 59.07 ± 2.85 % of B cells bound to the beads (Figure 2A), whereas binding to human albumin- and pp65-coated beads was low (2.58 ± 1.83 % and 1.39 ± 0.78 % respectively). The addition of the soluble MOG₁₋₁₂₅ before the incubation with MOG₁₋₁₂₅-coated beads prevented the interaction with MOG coated beads whereas the frequency of

MMOG₁₋₁₂₅OG specific B cells was unchanged in the presence of soluble human albumin or pp65 (Figure 2A). To better assess the degree of affinity of the BCR toward MOG, B cells were then preincubated with increasing concentrations of soluble MOG₁₋₁₂₅ (0.5ug to 20ug) before MOG₁₋₁₂₅-coated bead labeling. Figure 2B shows adose dependent decrease of MOG specific B cells when increasing amounts of soluble MOG₁₋₁₂₅ is added (inhibition of 50% of binding with preincubation of 2.6 µg of soluble MOG₁₋₁₂₅). Taken together, the results show that an antigen specific interaction between B cells and beads coated with a nominal antigen can be detected and quantified.

CD19+ B cells from healthy individuals exhibit a broad frequency range for reaction against self-antigens, vaccine or viral proteins.

The reactivity of CD19+ cells purified from normal individuals was then assessed against different antigens, including beads coated with a self-antigen (MOG₁₋₁₂₅), a virus antigen (EBNA1), an antigen used for vaccination (Tetanus Toxin, TT) and HLA Class I molecules. Albumin was used as a control antigen. A gradient of BBR frequency was observed ranging from low frequency when HLA Class I molecules (in unprimed individuals) and albumin were used to a high frequency when TT or EBNA1 (or HLA primed individuals – see next sections) were used. Indeed, the frequency of B cells from unprimed male subjects interacting with the panel of HLA class I molecules was similar to the frequency of B cells interacting with Albumin (mean±sem; 0.73±0.17 vs. 0.61±0.09 % respectively, ns; Figure 3). Of note, the frequency of B cells interacting with non-coated beads was as low as 0.014±0.005 %. As discussed below, the BBR frequency for proteins against which normal individuals were not immunized is consistent with the frequency of circulating B cells producing self/poly reactive antibodies and thus escaping the central checkpoint during maturation [11,24]. The frequency against self-antigen MOG₁₋₁₂₅ was 2.5 times higher than Albumin (mean±sem; 1.53±0.16 vs. 0.61±0.09% respectively; p<0.001; Figure 3), comparable to the substantial frequency of T cells committed against MOG₁₋₁₂₅ in circulating T cells of normal individuals [16,17,25]. However, reactivity against TT and EBNA1 coated beads was 9.8 and 10.5 times higher than the control antigen (mean±sem; 6.02±0.69 vs. 6.44±0.88 vs. 0.61±0.09 %, respectively. p<0.001; Figure 3). Finally, the ability of B and T cells purified from 3 male individuals to interact with Albumin-coated beads was similar (mean±sem; 0.10±0.03 vs. 0.16±0.03%, respectively; data not shown): B cells, but not T cells, were able to interact with self-antigen MOG₁₋₁₂₅ (mean±sem; 0.63±0.15 vs. 0.04±0.01%, respectively).

CD19⁺ B cells reacting against nominal antigens and unbound CD19⁺ fraction can be efficiently separated.

We next test whether CD19⁺ cells that interact with antigen-coated beads and those that do not can be isolated. Using a FACS-sorter or antigen-coated on magnetic beads, we show that CD19⁺ cells can be efficiently depleted of CD19⁺ cells that interact with MOG₁₋₁₂₅-coated beads or HLA class I-coated beads (Figure 4). After depletion, the negative fraction did not contain any CD19⁺ cells able to interact with antigen-coated beads. In contrast, the positive fraction was enriched in CD19⁺ that interact with either MOG₁₋₁₂₅- or HLA class I-coated beads (Figure 4). FACS-sorter based strategy was efficient for enrichment when the BBR frequency was above 1% (frequency of HLA class I BBR before and after purification: 2.71% and 32.6% respectively; Figure 4A). For lower frequency, an alternative strategy based on the use of antigen coated on magnetic beads was more efficient (frequency of MOG₁₋₁₂₅BBR before and after purification: 0.69% and 32.5% respectively; Figure 4B).

Immunized kidney allotransplant recipients exhibit an increased frequency of CD19⁺ B cells against HLA class I single antigens coated beads.

To show evidence of the potential usefulness of the method, we tested the B cell frequency in a context of over immunization against HLA antigens. Figure 5A shows that kidney recipients sensitized against HLA-A*0201 (n=10; as shown by circulating anti-HLA-A*0201 antibodies interacting with the same beads) exhibited an increased frequency of HLA-A*0201-specific B cells compared to non-sensitized recipients (n=8; p=0.011) and to healthy volunteers (n=14; p=0.045).

Through varying theratios of two fluorochromes within the bead core, it was then possible to assess up to 97 variables at the same time as detection of anti HLA allele products. Thus, we analyze the reactivity of blood B cells isolated from immunized recipients (n=13) and from healthy volunteers (n=16) against single HLA class I allele-coated beads. The single HLA class I allele coated beads were added in excess as exemplified by the detection of large amount of beads that had not interacted with B cells. The frequency of B cell recognizing beads coated with a single HLA class I allele was significantly higher in immunized recipients compared to healthy volunteers (mean±sem; 1.29±0.28 vs. 0.60±0.16 respectively, p<0.01; Figure 5B). Non-specific interaction was excluded as uncoated beads (NC) and non-HLA IgG coated beads (PC) were not recognized by healthy volunteers or immunized recipients. In addition, whereas the ability of B cells to recognize HLA class I antigen was restricted to a

small fraction of B cells (<2% of total B cells), a very broad panel of HLA class I alleles were recognized (insert in Figure 5B), with a varying range of B cells interacting with each allele showing poly-specificity. Finally, the interaction between CD19 cells and HLA class I-coated beads was not influenced by the in vitro activation of the B cells. When purified CD19+ cells were activated in vitro for 4 days using an activation cocktail (anti-F(ab)'₂, CD40L+Enhancer, ODN2006 and IL-2) the frequency of BBR remained unchanged (data not shown).

Of note, whereas a high frequency of HLA-A*0201 CD19+ cells was observed when single antigen HLA-A*0201 coated beads were used, similar observation was not done when the panel of 97 different HLA class I coated beads was used in multiplex assay (data not shown). This apparent discrepancy is likely related to the presence within the test tube of a large number of different HLA class I molecules decreasing the number of specific events recorded for each antigen. To better approach the nature of allelic specificity, CD19+ cells purified from HV or immunized patients were pre-incubated with a cocktail of HLA-A*0201 multimers (HLA-A*0201/MP₅₈₋₆₆, HLA-A*0201/HCw1, HLA-A*0201/pp65) before the incubation with HLA class I coated beads. Despite reactivity against HLA-A*0201 coated beads being strongly reduced after the pre-incubation with HLA-A*0201 multimers (Figure 6.A), the frequency of B cells making rosettes against non-HLA-A*0201 molecules was similarly affected by the pre-incubation with HLA-A*0201 multimers (Figure 6.A), confirming a significant level of polyreactivity in the circulating B cells when antigens with minor differences are tested.

HLA class I specific CD19+ cells from patients immunized against HLA antigens are not restricted to the memory compartment.

The phenotype of the B cells that recognized HLA class I antigens was analyzed by flow cytometry based on the expression of CD38 and IgD[26] and according to the expression of CD24 and CD38[27]. These classifications allow the identification of the successive cell development stages from naïve B cells to differentiated memory B cells. According to the co-analysis of CD38 and IgD or CD24 and CD38, the phenotype of B cells interacting with HLA class I antigens and of those not was similar (data not shown). The analysis of CD27 and IgD allows the discrimination of naïve mature (CD27⁻IgD⁺), class-switched memory (CD27⁺IgD⁻) and non-switched memory (CD27⁺IgD⁺) B cells. As for total B cells, the naïve mature phenotype (i.e CD27⁻IgD⁺) was the most frequent phenotype for B cells interacting

with HLA class I antigens (mean±sem; 54.5±6.3 vs. 61.8±7.4; Figure 6.B). B cells interacting with HLA class I antigens exhibited a higher proportion of non-switched CD27⁺IgD⁺ memory B cells (mean±sem; 25.5±5.4 vs. 12.6±4.5 respectively; p=0.0278; Figure 6.B) and a lower proportion of class-switched memory (CD27⁺IgD⁻) B cells than the B cells that do not interact with HLA Class I antigen (mean±sem; 9.12±4.07 vs. 18.16±2.12 respectively; p=0.0754; Figure 6.B). The ratio of non-switched memory to class-switched memory B cells was ten times higher in HLA class I specific BBR compared to CD19 cells (mean±sem; 7.9±4.6 vs. 0.7±0.2 respectively; p=0.03; Figure 6.B).

Discussion

In this paper, we describe a new strategy for measuring the frequency of antigen-reactive B cells. Taking advantage of beads that can be covalently linked to antigens and detected thanks to their fluorescent internal core, the reactivity of blood B cells against various antigens (alloantigens, self, viral and vaccine antigens) has been assessed in a transgenic mouse model, in healthy volunteers and in allo-immunized patients. Whereas the frequency of B cells against a pool of 97 HLA Class I molecules was similar to the levels obtained with albumin-coated beads, a substantial frequency of B cells interacting with self protein (MOG₁₋₁₂₅) and high frequency for viral protein (EBNA1) or a vaccinated protein (TT) in healthy individuals could be observed. When this method was applied in patients with known immunizing histories (i.e; kidney allograft recipients with circulating antibodies against HLA antigens), a significant increase in the frequency of B cells specific to HLA class I molecules was observed. Of interest, the BBR phenotype was not biased toward a memory-switch phenotype, suggesting that different B cell populations contribute to this profile.

Great attention has been paid to the validation of this strategy. Using 8.18-C5 mice[15], we show that B cells specifically interact with MOG₁₋₁₂₅coated beads but not with beads coated with other antigens (pp65). Pre-incubation of B cells with soluble MOG₁₋₁₂₅, but not with irrelevant CMV pp65 antigen, prevents the interaction between B cells and MOG₁₋₁₂₅-coated beads. Of note, a limited amount of beads can be used as an excess of beads was always evidenced by the beads that did not interact with B cells on the dot plot.

T and B-cell ELISPOT have also been used to measure committed B cell frequency against a given antigen. However, the ELISPOT assay does not measure the frequency of cells that actually interact with the antigen (which can for instance elicit an immune synapse for T cells or directly bind to antigen for B cells) but measures biological events such as cytokine release[28] or production of immunoglobulin after differentiation *in vitro*[29,30], events that result from the interaction of the cells with the antigen. In this context, the estimated frequency is restricted to the cells that are able to be selectively stimulated by the antigen depending on read-out and thus may lead to an underestimation of the actual frequency of committed cells. In contrast, the BBR approach identifies all B cells actually interacting with a putative antigen through the BCR. Moreover, the BBR technique also allows the phenotyping of antigen specific B cells. Finally the flexibility of the system (the fluorescent beads can be coated with virtually any peptide or protein) and the unavailability of fluorescent

molecules to the B cells (the fluorochromes are encapsulated within the internal core of the beads) are key advantages over the use of tetramer.

We studied the recipients of a mismatched kidney allograft with circulating anti-HLA antibodies to prove that the method can identify an increase in circulating committed B cells following immunization. We show that kidney recipients who developed a humoral response against HLA antigens have also a significantly higher frequency of B cell forming rosettes with HLA-A*0201 (in a single HLA coated bead example) or HLA antigens (in a multiplexed bead example) than non-immunized recipients or normal individuals. Whether this expanded circulating alloreactive B cell pool plays a role in acute or chronic rejection of an allograft would be an important area for further study. These results suggest that what is observed in the periphery (blood) could reflect the presence of a similar population in the graft, conforming to the reported association of intra-graft B cells and rejection severity [31-33]. Studying the frequency of HLA committed B cells from the blood before and after transplantation and possibly from the graft would be of paramount importance in better understanding their role in rejection but also in tolerance mechanisms after transplantation. Furthermore, we show that usage of magnetic beads yields very efficient enrichment of specific BBR, which will allow more focused studies on their characteristics.

Within germinal centers, B cells undergo rounds of division and affinity maturation and high-affinity cells further differentiate into memory B cells or long-lived plasma cells. The preferential phenotype of BBR within unswitched B cells, and especially within naïve/mature B cells, suggests that the circulating antigen specific B cells do not undergo a germinal center formation but rather encompass the naïve B cell compartment. However, it is likely that the BBR population is a mixture of committed memory B cells and of naïve B cells with crossreactive/polyreactive BCR [24] as suggested, for instance, by the high frequency of blood B cells binding TT-coated beads – a situation where no antigen may remain and where $\approx 6\%$ of B cells are committed against TT [34]. The monitoring of the levels of B cells with a BCR interacting with different viral proteins or with a protein used for vaccination may be also be worth considering.

Altogether, this study shows that precise identification of B cells committed against an individual antigen is possible in humans and that there is substantially high frequency of circulating B cells committed against more than one tested protein, confirming the low

efficiency of the first checkpoint in B cell development. We suggest that this approach may allow further understanding of a number of pathological processes.

Acknowledgments

We thank C.Mackenzie for editing the paper, K.Bernardeau for kindly providing pp65 antigen and G.Krishnamoorthy and H.Wekerle for kindly providing the transgenic mice. The authors wish to thank Jar How Lee, Olivier Thauat and Eric Meffre for fruitful discussion.

References

1. Hawker K, O'Connor P, Freedman MS, Calabresi PA, Antel J, et al. (2009) Rituximab in patients with primary progressive multiple sclerosis: Results of a randomized double-blind placebo-controlled multicenter trial. *Ann Neurol* 66: 460–471. doi:10.1002/ana.21867.
2. Brulhart L, Ciurea A, Finckh A, Notter A, Waldburger JM, et al. (2006) Efficacy of B cell depletion in patients with rheumatoid arthritis refractory to anti-tumor necrosis factor agents: an open-label observational study. *Annals of the Rheumatic Diseases* 65: 1255–1257. doi:10.1136/ard.2005.051169.
3. Iwata Y, Matsushita T, Horikawa M, DiLillo DJ, Yanaba K, et al. (2011) Characterization of a rare IL-10-competent B-cell subset in human that parallels mouse regulatory B10 cells. *Blood* 117: 530–541. doi:10.1182/blood-2010-07-294249.
4. Yanaba K, Bouaziz JD, Matsushita T, Tsubata T, Tedder TF (2009) The Development and Function of Regulatory B Cells Expressing IL-10 (B10 Cells) Requires Antigen Receptor Diversity and TLR Signals. *The Journal of Immunology* 182: 7459–7472. doi:10.4049/jimmunol.0900270.
5. Frommer F, Heinen T, JAJ, Wunderlich FT, Yogevev N, Buch T, et al. (2008) Tolerance without clonal expansion: self-antigen-expressing B cells program self-reactive T cells for future deletion. *The Journal of Immunology* 181: 5748–5759.
6. Olkhanud PB, Damdinsuren B, Bodogai M, Gress RE, Sen R, et al. (2011) Tumor-Evoked Regulatory B Cells Promote Breast Cancer Metastasis by Converting Resting CD4+ T Cells to T-Regulatory Cells. *Cancer Research* 71: 3505–3515. doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-4316.
7. Hagn M, Schwesinger E, Ebel V, Sontheimer K, Maier J, et al. (2009) Human B Cells Secrete Granzyme B When Recognizing Viral Antigens in the Context of the Acute Phase Cytokine IL-21. *The Journal of Immunology* 183: 1838–1845. doi:10.4049/jimmunol.0901066.
8. Hagn M, Ebel V, Sontheimer K, Schwesinger E, Lunov O, et al. (2010) CD5+ B cells from individuals with systemic lupus erythematosus express granzyme B. *Eur J Immunol* 40: 2060–2069. doi:10.1002/eji.200940113.
9. Lang J, Arnold B, Hammerling G, Harris AW, Korsmeyer S, et al. (1997) Enforced Bcl-2 expression inhibits antigen-mediated clonal elimination of peripheral B cells in an antigen dose-dependent manner and promotes receptor editing in autoreactive, immature B cells. *J Exp Med* 186: 1513–1522.
10. Halverson R, Torres RM, Pelanda R (2004) Receptor editing is the main mechanism of B cell tolerance toward membrane antigens. *Nat Immunol* 5: 645–650.

doi:10.1038/ni1076.

11. Wardemann H (2003) Predominant Autoantibody Production by Early Human B Cell Precursors. *Science* 301: 1374–1377. doi:10.1126/science.1086907.
12. Zikherman J, Parameswaran R, Weiss A (2013) Endogenous antigen tunes the responsiveness of naive B cells but not T cells. *Nature* 489: 160–164. doi:10.1038/nature11311.
13. Rudolph U, Hohlbaum A, Lang B, Peter HH, Melchers I (1993) The B cell repertoire of patients with rheumatoid arthritis. Frequencies and specificities of peripheral blood B cells reacting with human IgG, human collagens, a mycobacterial heat shock protein and other antigens. *Clinical & Experimental Immunology* 92: 404–411.
14. Taylor JJ, Martinez RJ, Titcombe PJ, Barsness LO, Thomas SR, et al. (2012) Deletion and anergy of polyclonal B cells specific for ubiquitous membrane-bound self-antigen. *Journal of Experimental Medicine* 209: 2065–2077. doi:10.1084/jem.20112272.
15. Litzemberger T, Fässler R, Bauer J, Lassmann H, Linington C, et al. (1998) B lymphocytes producing demyelinating autoantibodies: development and function in gene-targeted transgenic mice. *J Exp Med* 188: 169–180.
16. Berthelot L, Laplaud DA, Pettré S, Ballet C, Michel L, et al. (2008) Blood CD8⁺T cell responses against myelin determinants in multiple sclerosis and healthy individuals. *Eur J Immunol* 38: 1889–1899. doi:10.1002/eji.200838023.
17. Elong Ngonu A, Pettré S, Salou M, Bahbouhi B, Soullou J-P, et al. (2012) Frequency of circulating autoreactive T cells committed to myelin determinants in relapsing–remitting multiple sclerosis patients. *Clinical Immunology* 144: 117–126. doi:10.1016/j.clim.2012.05.009.
18. Sis B, Mengel M, Haas M, Colvin RB, Halloran PF, et al. (2010) Banff '09 Meeting Report: Antibody Mediated Graft Deterioration and Implementation of Banff Working Groups. *Am J Transplant* 10: 464–471. doi:10.1111/j.1600-6143.2009.02987.x.
19. Pollinger B, Krishnamoorthy G, Berer K, Lassmann H, Bosl MR, et al. (2009) Spontaneous relapsing–remitting EAE in the SJL/J mouse: MOG-reactive transgenic T cells recruit endogenous MOG-specific B cells. *Journal of Experimental Medicine* 206: 1303–1316. doi:10.1006/meth.2001.1261.
20. Bodinier M, Peyrat MA, Tournay C, Davodeau F, Romagne F, et al. (2000) Efficient detection and immunomagnetic sorting of specific T cells using multimers of MHC class I and peptide with reduced CD8 binding. *Nat Med* 6: 707–710. doi:10.1038/76292.
21. Pei R, Lee J-H, Shih N-J, Chen M, Terasaki PI (2003) Single human leukocyte antigen flow cytometry beads for accurate identification of

- humanleukocyteantigenantibodyspecificities. *Transplantation* 75: 43–49. doi:10.1097/01.TP.0000040431.80510.98.
22. Terasaki PI, Ozawa M, Castro R (2007) Four-yearfollow-up of a prospective trial of HLA and MICA antibodies on kidneygraftsurvival. *Am J Transplant* 7: 408–415. doi:10.1111/j.1600-6143.2006.01644.x.
 23. Damoiseaux J, VAESSEN M, KNAPEN Y, CSERNOK E, STEGEMAN CA, et al. (2007) Evaluation of the FIDIS Vasculitis Multiplex Immunoassay for Diagnosis and Follow-up of ANCA-AssociatedVasculitis and Goodpasture'sDisease. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1109: 454–463. doi:10.1196/annals.1398.051.
 24. Meffre E, Casellas R, Nussenzweig MC (2000) Antibodyregulation of B celldevelopment. *Nat Immunol* 1: 379–385. doi:10.1038/80816.
 25. Bahbouhi B, Berthelot L, Pettre S, Michel L, Wiertlewski S, et al. (2009) Peripheralblood CD4+ T lymphocytes from multiple sclerosis patients are characterized by higher PSGL-1 expression and transmigration capacityacross a humanblood-brainbarrier-derivedendothelialcell line. *Journal of LeukocyteBiology* 86: 1049–1063. doi:10.1189/jlb.1008666.
 26. Pascual V, Liu YJ, Magalski A, de Bouteiller O, Banchereau J, et al. (1994) Analysis of somatic mutation in five B cellsubsets of humantonsil. *J Exp Med* 180: 329–339.
 27. Carsetti R, Rosado MM, Wardmann H (2004) Peripheraldevelopment of B cells in mouse and man. *ImmunolRev* 197: 179–191.
 28. Klinman D (2008) ELISPOT assay to detect cytokine-secreting murine and humancells. *CurrProtocImmunolChapter* 6: Unit6.19. doi:10.1002/0471142735.im0619s83.
 29. Bromage E, Stephens R, Hassoun L (2009) The third dimension of ELISPOTs: Quantifyingantibodysecretionfromindividual plasma cells. *Journal of ImmunologicalMethods* 346: 75–79. doi:10.1016/j.jim.2009.05.005.
 30. Lycke NY, Coico R (2001) Measurement of immunoglobulinsynthesisusing the ELISPOT assay. *CurrProtocImmunolChapter* 7: Unit7.14. doi:10.1002/0471142735.im0714s17.
 31. Zarkhin V, Kambham N, Li L, Kwok S, Hsieh S-C, et al. (2008) Characterization of intra-graft B cellsduringrenalallograft rejection. *Kidney International* 74: 664–673. doi:10.1038/ki.2008.249.
 32. Hippen BE, DeMattos A, Cook WJ, Kew CE, Gaston RS (2005) Association of CD20+ infiltrateswithpoorerclinicaloutcomes in acute cellular rejection of renalallografts. *Am J Transplant* 5: 2248–2252. doi:10.1111/j.1600-6143.2005.01009.x.

33. Hwang HS, Song JH, Hyoung BJ, Lee SY, Jeon YJ, et al. (2010) Clinical impacts of CD38+ B cells on acute cellular rejection with CD20+ B cells in renal allograft. *Transplantation* 89: 1489–1495. doi:10.1097/TP.0b013e3181dd35b8.
34. Amanna IJ, Slifka MK (2010) Mechanisms that determine plasma cell lifespan and the duration of humoral immunity. *Immunol Rev* 236: 125–138. doi:10.1111/j.1600-065X.2010.00912.x.

Figure legends

Figure 1 | Principle of the method of identification of antigen-specific B cells. After co-incubation, lymphocytes, antigen covered beads and the beads' B cell rosettes are gated based on their forward scatter and side scatter. After exclusion of the DAPI- cells, B cells and beads-B cell rosettes are identified based on CD19 expression and the beads' internal fluorochrome. Specificity of B cell recognition is determined by gating on beads and beads' B cell rosettes (**A**) or after the identification of the nominal antigen through the use of the unique ratio of the two internal fluorochromes (**B**). In the latter, for each nominal antigen, a gate that encompassed beads and B cell rosettes is created followed by the identification of the B cells. Frequency of B cells bound to HLA class I of interest is finally evaluated. Bead-based method allows the detection of antigen-specific B cells. (**C**). An example of the identification of beads, Bead-cell rosette and lymphocyte is shown. After exclusion of dead cells, the use of the marker CD19 allows the identification of B lymphocyte and a mix of beads and BBR. Thanks to the ratio of two fluorochromes, antigen coated on the beads can be then identified. Beads are excluded using the expression of CD19. A Boolean gate is used to assess the frequency of B cells specific of a given antigen within the whole B cell population.

Figure 2 | Bead-based method allows the detection of antigen-specific B cells. (**A**) B cells purified from Tg mice were incubated with human albumin, MOG₁₋₁₂₅ or pp65 coated beads and the frequency of antigen specific B cells was quantified. The B cells were preincubated with soluble human Albumin, MOG₁₋₁₂₅ or pp65 before incubation with MOG₁₋₁₂₅ coated beads. (**B**). B cells purified from Tg mice were preincubated with increasing doses of soluble MOG₁₋₁₂₅ before incubation with MOG₁₋₁₂₅ coated beads. The experiments were repeated 3 times and similar results were obtained.

Figure 3 | B cells from healthy volunteers exhibit a broad range of reactivity. Purified B cells from healthy volunteers were tested for their reactivity to albumin (n=38), Tetanus Toxin (n=14), EBNA1 (n=15), MOG₁₋₁₂₅ (n=38) and a panel of 97 HLA class I molecules (n=19). ***p<0.001 (Kruskall-Wallis follow by a Dunn's post hoc test using albumin settings as reference group)

Figure 4 | Separation of B cells interacting with nominal antigen and unbound B cells. Purified B cells were incubated with single HLA class I coated beads (**A**) or MOG₁₋₁₂₅ coated beads (**B**) before being subjected to cell separation using an ARIA FACS-sorter (**A**) or magnet based purification (**B**). Frequency of B cells interacting with nominal antigens is

shown before purification and in the positive and in the negative fraction. One representative out of three experiments with cells from different donors is shown.

Figure 5 | Enhance frequency of anti-HLA B cell in immunized patients.**A.** Using single HLA-A*0201 coated beads, the frequency of B cells specific to HLA-A*0201 allele was assessed in the blood of sensitized transplant recipients with histologically proven antibody mediated rejection (ABMR; n=10), non-sensitized stable transplant recipients (n=9) and healthy volunteers (n=14). Sensitized patients exhibit a significant increase in the frequency of HLA-A*0201 specific B cells compared to non-sensitized patients and healthy volunteers. **B.** B cells bound to single HLA class I coated beads (HLA-beads), to negative control (NC) and positive control (PC) were analyzed in HV (n=16) and Immunized kidney recipients (n=13). NC and PC beads were included by the manufacture in the single HLA class I kit. According to the manufacture, NC beads are beads saturated with ovalbumin and PC beads are coated with human IgG1. A broad range of single HLA class I were recognized as shown in the insert, a pattern observed for B cells from all tested patients.

Figure 6 | The interaction between CD19+ cells and HLA class I coated beads is not restricted by the HLA class I allele only and BBR are not restricted to the memory compartment.**A.** CD19+ cells were pre-incubated with a cocktail of HLA-A*0201 multimer (HLA-A*0201/MP₅₈₋₆₆, HLA-A*0201/HCw1, HLA-A*0201/pp65) followed by the incubation with HLA Class I coated beads. Frequency of CD19+ cells specific of HLA-A*0201 coated beads and of HLA class I coated beads were analyzed before and after coincubation with the cocktail of HLA-A*0201 multimer for healthy volunteers (n=6) and immunized patients (n=3). **B.** B cells were stained with anti-CD19, anti-CD27 and anti-IgD antibodies prior to incubation with single HLA coated beads. Phenotype of B cells and BBR were analyzed based on the expression of CD27 and IgD. 4 populations were identified (CD27-IgD+, naïve B cells; CD27+IgD+, non-switched memory B cells; CD27+IgD-, switched memory B cells; CD27-IgD-). Representative phenotype of B cells and single HLA class I coated beads is shown as well as a summary of 5 immunized patients.

Tables

TABLE1.A

Demographic data	Non-sensitized recipients (n=8)	Sensitized recipients (n=10)
Recipient Age (years)	47 (30-70)	42 (19-64)
Recipient Gender (M/F)	5/4 (55%)	3/7 (30%)
Donor Age (years)	38 (16-73)	47 (19-63)
Donor Gender (M/F)	7/1 (87%)	5/4 (55%)
Clinical data		
Time post-transplantation (years)	4.55 (0.64-14.38)	6.52 (0.73-17.59)
HLA mismatch (HLA-A, -B, -DR) >4	6	3
HLA Class I Ab (MFI >1500)	0/8	10/10
Class I DSA (MFI >1500)	0/8	1/10
Creatinemia (umol/L)	125 (87-156)	110 (62-182)
Stage of chronic kidney disease		
Stage 1-2	8	10
Stage 3-5		
Induction Therapy		
Monoclonal Ab / Polyclonal Ab / None	5 / 2 / 1	0 / 9 / 1
Maintenance Therapy		
FK / CSA / mTOR Inhibitors / None	6 / 2 / 0 / 0	6 / 4 / 0 / 0
Corticotherapy	6	9

TABLE1.B

Demographic data

Recipient Age (years)	52 (21-73)
Recipient Gender (M/F)	5/8 (38%)
Donor Age (years)	58 (27-72)
Donor Gender (M/F)	5/6 (45%)
Clinical data	
Time post-transplantation (years)	1.99 (0.00-19.78)
HLA mismatch (HLA-A, -B, -DR) >4	10
HLA Class I Ab (MFI >1500)	13/13
Class I DSA (MFI >1500)	5/13
Creatinemia (umol/L)	240 (62 ;947)
Stage of chronic kidney disease	
Stage 1-2	2
Stage 3-5	10
Induction Therapy	
Monoclonal Ab / Polyclonal Ab / None	7 / 5 / 0
Maintenance Therapy	
FK / CSA / mTOR Inhibitors / None	9 / 1 / 3 / 0
Corticotherapy	10

Values are median (min-max) for continuous variables or number of patients (%) for categorical variables. * one missing data and ¶ more than one missing data. Anti-class I Ab analysis, using Luminex HD, was performed for all but 1 patient.

Table 1 | A. Summary of demographic and clinical characteristics of patients analyzed using single HLA-A*0201 antigen coated beads (A) or using single HLA class I antigen coated beads (B).

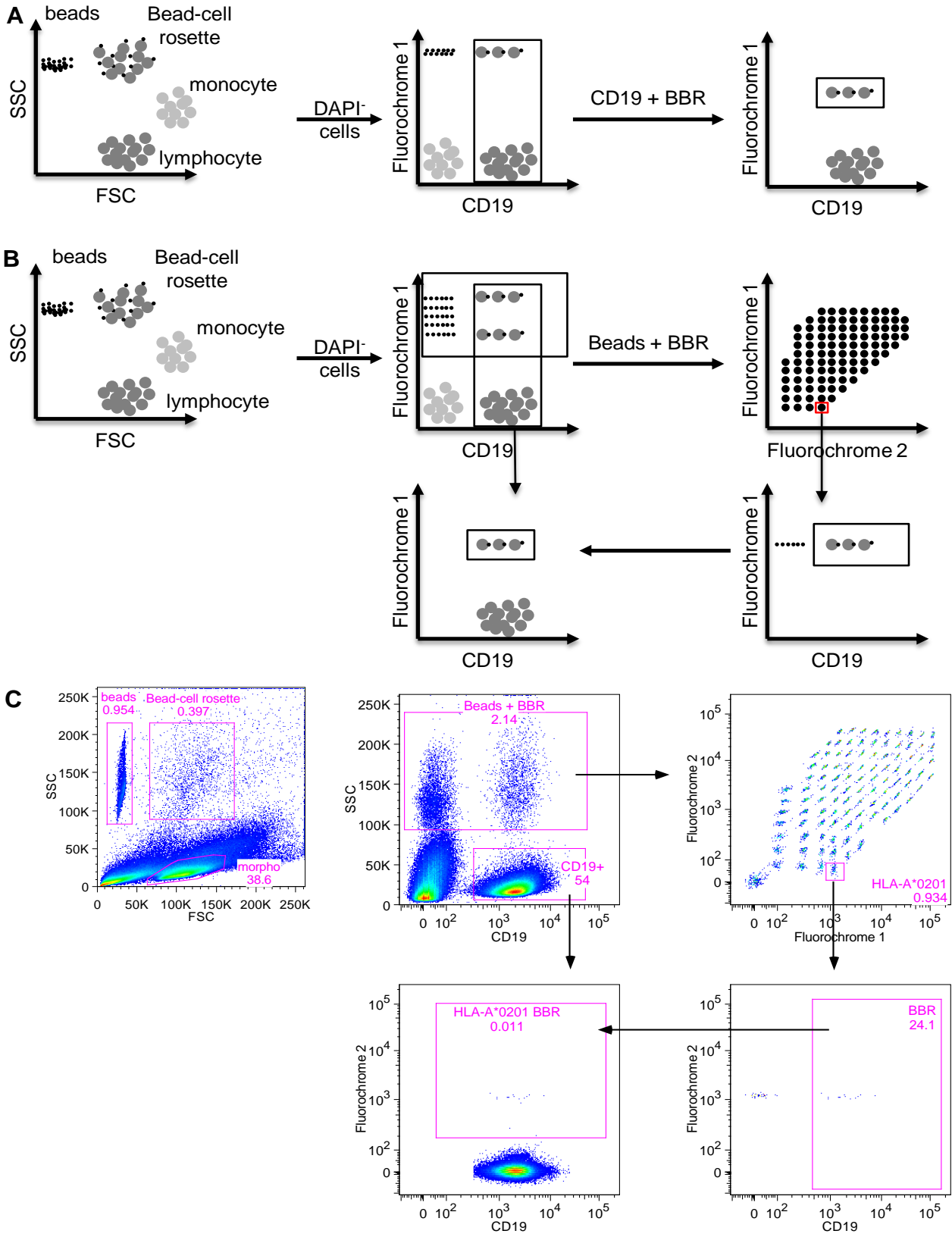


Figure 1

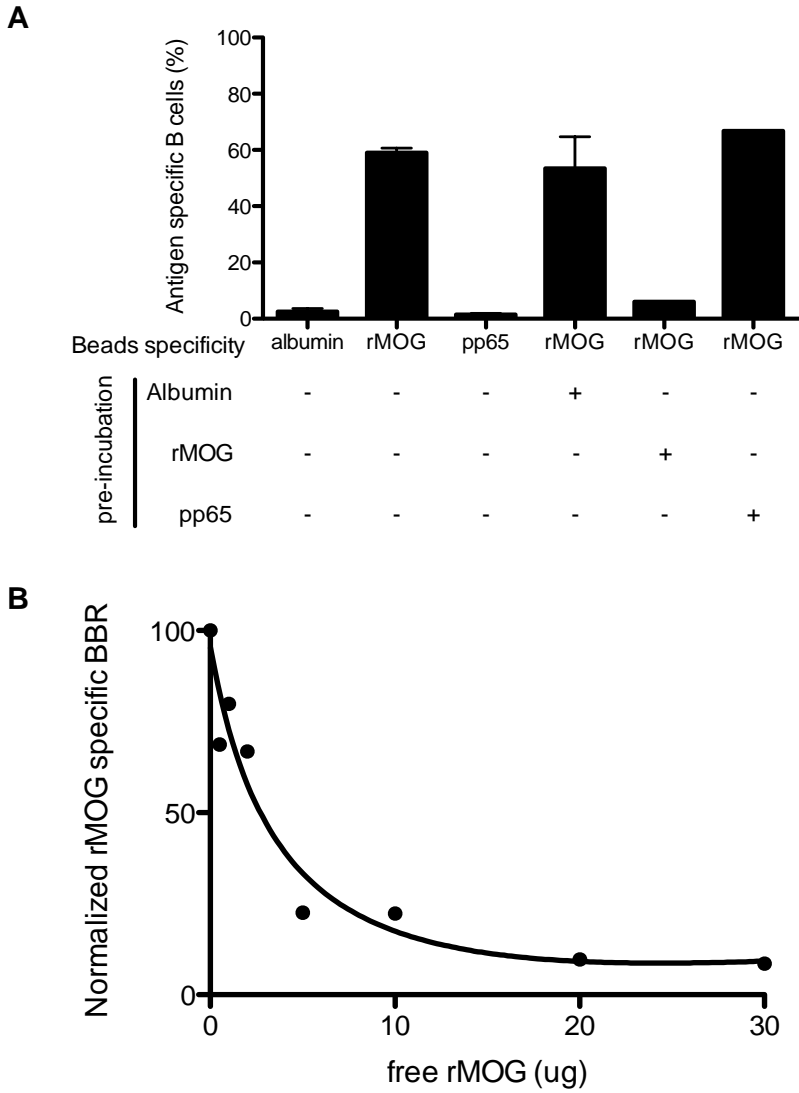


Figure 2

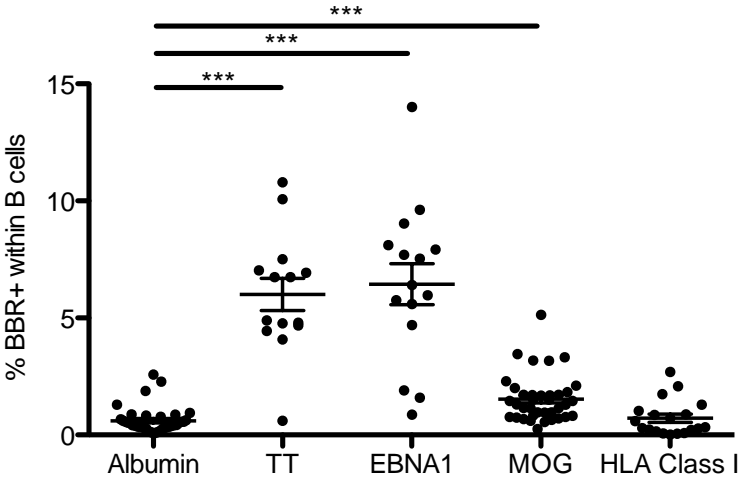


Figure 3

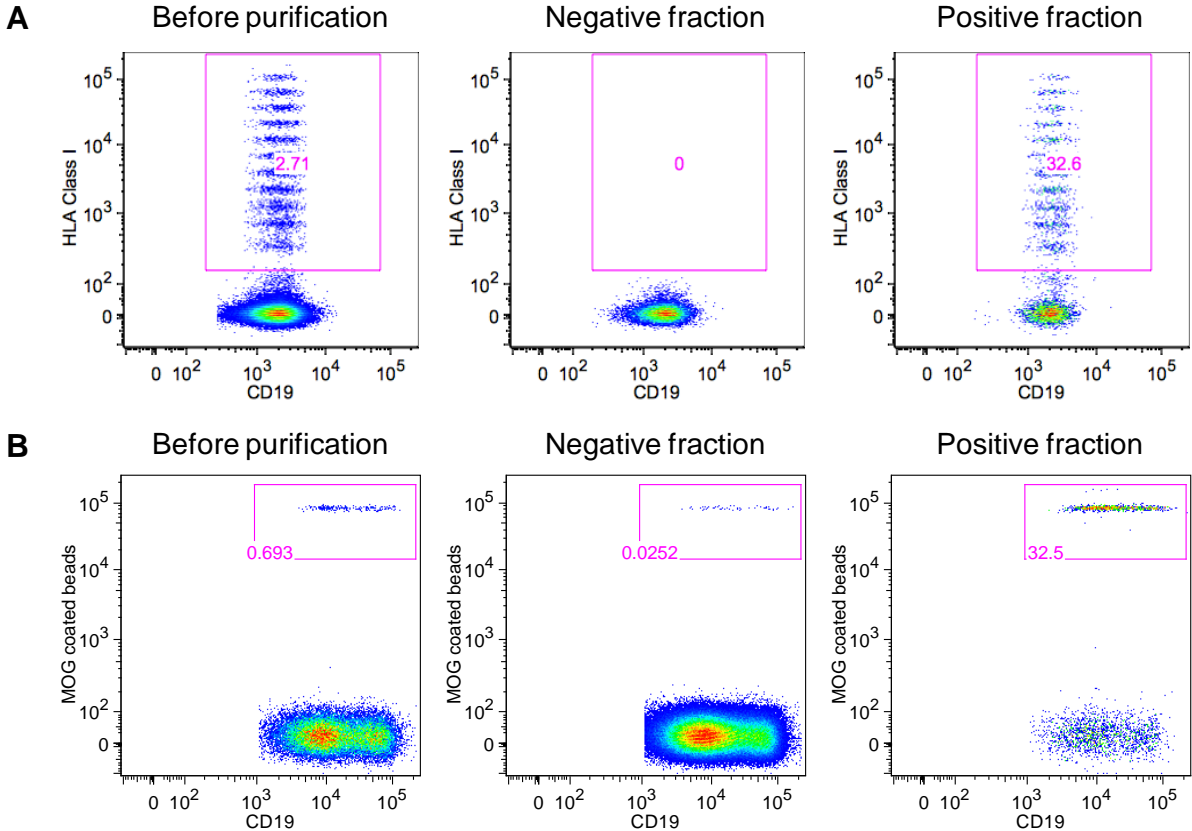


Figure 4

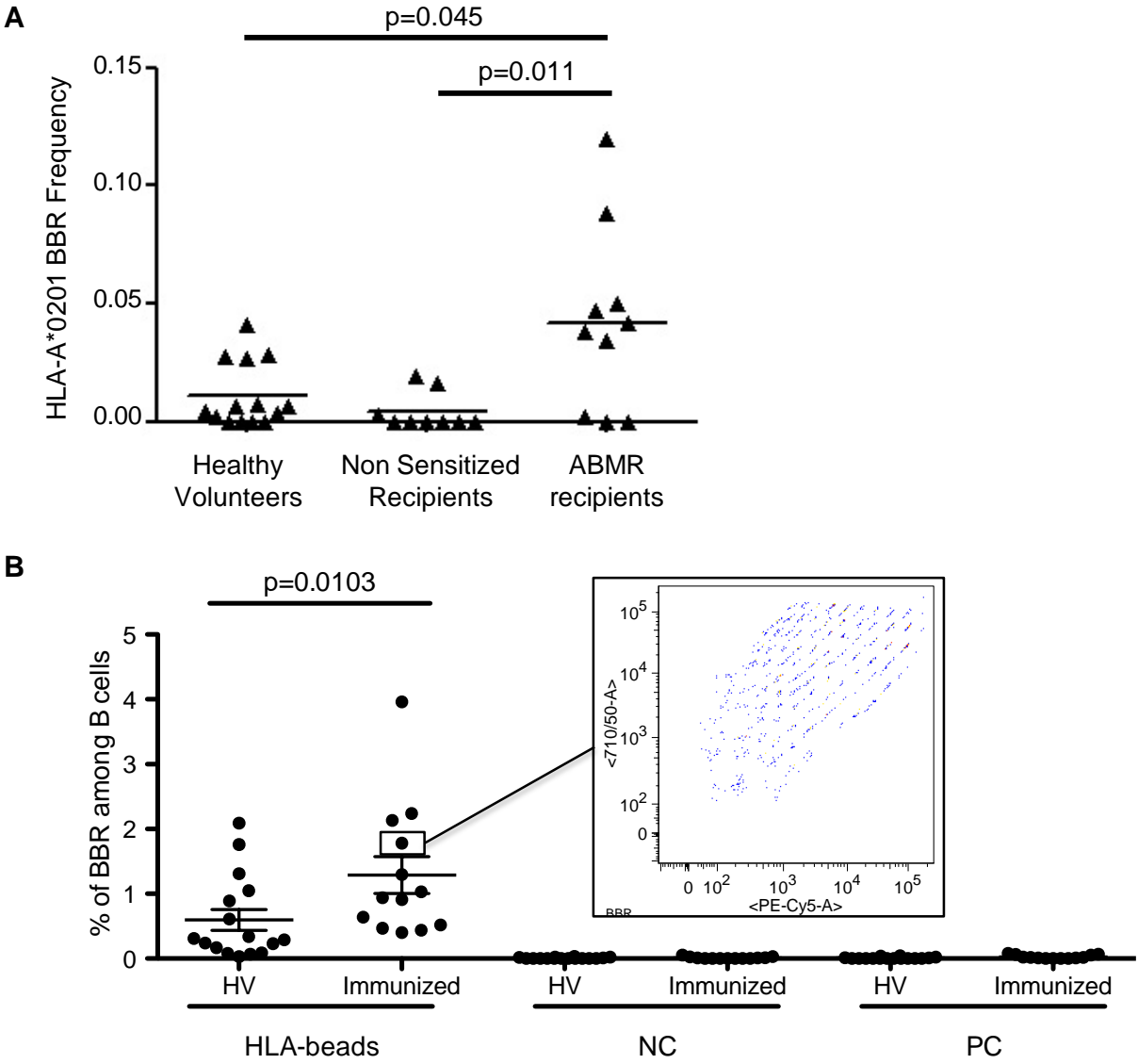


Figure 5

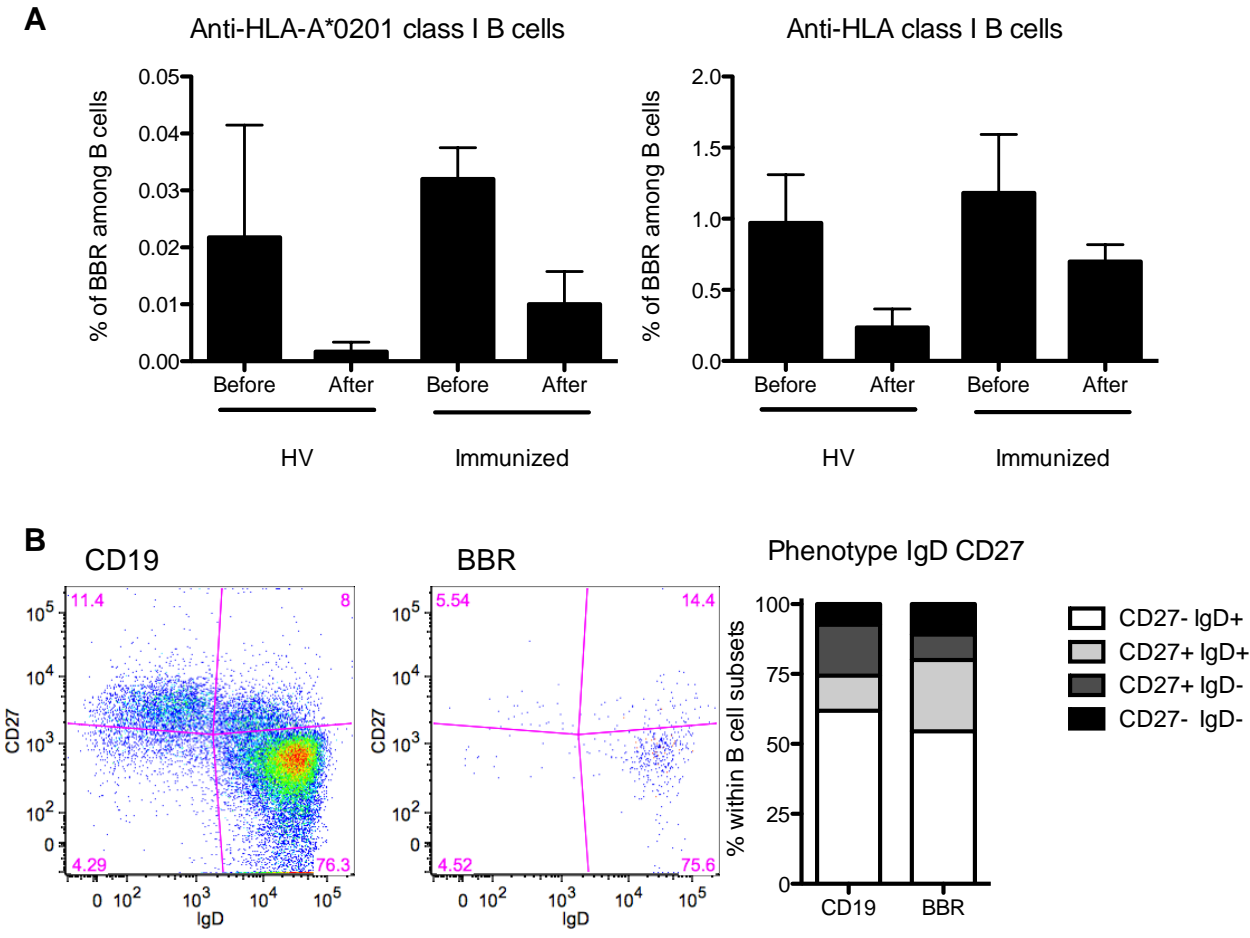


Figure 6

Article II

***PATIENTS WITH RR MULTIPLE SCLEROSIS HAVE A
DECREASED FREQUENCY OF CIRCULATING ANTI MOG
B LYMPHOCYTES***

Patients with RR Multiple Sclerosis have a decreased frequency of circulating anti MOG B lymphocytes

Annie ELONG NGONO^{1,2*}, Maud LEPETIT^{1,3*}, Alexandra GARCIA¹, Flora GUILLOT^{1,2}
Marion SALOU^{1,2}, Fabienne LEFRERE⁴, Pierre-Olivier COURAUD⁵, Nicolas
DEGAUQUE^{1,2}, Arnaud NICOT^{1,2}, Sophie BROUARD^{1,2,+}, David-Axel LAPLAUD^{1,2,3,+},
Jean-Paul SOULILLOU^{1,2,+}

1 INSERM, UMR1064, Nantes, F-44093, France

2 Université de Nantes, faculté de Médecine, Nantes, F-44035, France

3 Service de neurologie, CHU de Nantes, F-44093, France

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

5 INSERM, U1016, Institut Cochin, Paris, France

*Both authors have contributed similarly to this paper

⁺This authors have contributed equally as co-senior authors

Corresponding author :

Prof Jean-Paul SOULILLOU

Pavillon Jean Monnet

INSERM 1064

30 Boulevard Jean Monnet

44093 Nantes cedex 01

Phone +33(0)240087410

Fax +33(0)240087411

Jean-paul.soulillou@univ-nantes.fr

Abstract

Multiple Sclerosis is a chronic inflammatory demyelinating disease of the Central Nervous System (CNS) where B lymphocytes may play a key role as suggested by the beneficial effect of anti-CD20. In this paper, we measured the frequency of circulating and intrathecal B cells forming rosettes (BBR) in MS with polystyrene beads carrying covalently bound rMOG. MOG-specific B cells were studied in 38 age matched RRMS patients and 50 Healthy Individuals (HI). Anti-MOG B cells were also studied for their surface phenotype (CD19, CD27, CD38 and IgD), apoptosis and proliferation markers as well as for their capacity to transmigrate across layers of brain-derived transformed endothelial cells.

We show that a substantial fraction of blood B cells binds to MOG coated beads, both in HI and MS patients, fitting with the permissive, BCR-dependent, first check point of B cell repertoire maturation process. However, we observed a highly significant lower frequency of circulating MOG-specific B cells in patients as compared to HI. Frequencies of BBR engaging albumin or tetanus toxin coated beads were not affected. Naïve, memory and class switched B cells were normally distributed in anti MOG-BBR of both cohorts. Despite intrathecal BBR frequencies were higher than circulating ones, no difference was observed with samples from non-MS CNS pathologies. Several possibilities were tested to explain the decreased frequency of MOG-BBR in MS. However, no significant differences were noted in apoptosis or growth associated markers despite a trend for lower proliferative propensity in MS. Despite we showed an efficient B cells transmigration across brain derived endothelial cells, no difference in the rate of transmigration occurred between MS and normal individuals for total and anti MOG B cells. Taken together, we show for the first time an abnormal distribution of anti MOG B cell in MS without clear identified mechanisms. High frequency of circulating anti MOG in normal individuals does not comfort a direct role of MOG committed B cells in the disease.

Introduction

Multiple Sclerosis is a chronic inflammatory demyelinating disease of the Central Nervous System (CNS), causing severe progressive disability and characterized by leukocyte infiltration and white matter demyelination (Lucchinetti et al., 2000). Despite MS etiology remains elusive, overt disease is considered to have a major autoimmune component and both T cells (Steinman, 2007) and antibody (Ab) (Genain et al., 1999) responses to myelin and myelin-associated proteins are present during the course of disease. Myelin-antigen-specific T lymphocytes have also attracted most of the attention due to their potential to induce Experimental Allergic Encephalomyelitis (EAE), an animal model of the immune component of the human disease, by adoptive transfer (Ben-Nun et al., 1981b), their predominant presence in inflammatory lesions (Compston and Coles, 2008) and their possible increased frequency in MS patients blood (Bahbouhi et al., 2010). However, myeline reactive T cells can be also found in Healthy Individuals (HI) (Bahbouhi et al., 2010; Berthelot et al., 2008) and see (Elong Ngonon et al., 2012) for review. A possible role of B cells in MS has been more recently highlighted by the effect of anti CD20 monoclonal antibodies which both deplete (Hauser et al., 2008) and modify B cell functions (Kamburova et al., 2013). B cells present several functions susceptible to play a role in auto immune processes, including antigen presentation (particularly for autologous determinants (Bettelli et al., 2006; Krishnamoorthy et al., 2006; Pöllinger et al., 2009), differentiation into plasma cells producing antibodies (Bernasconi et al., 2002), cytokine production and T cell help (Duddy et al., 2007, 2004; Fillatreau et al., 2002). In MS, Harp *et al* showed that B cells committed to myelin proteins are efficient APC (Harp et al., 2010). However, B cells can also exhibit regulatory function as evidenced in model of autoimmune diseases (Mauri and Bosma, 2012) as well as transplantation setting experimentally or in clinic (Pallier et al., 2010), a function which may be also affected in MS (Knippenberg et al. 2011) but which remains controversial (Iwata et al., 2011). Most of the studies on a possible role of B cells in MS has been yet indirectly approached through the analysis of antibodies against myelin (see for review (Reindl et al., 2013) or other brain determinants such as channels (Srivastava et al., 2012) and their possible implication in the disease (see for review (Weber et al. 2011). However, the fact that Rituximab therapy reduces lesions and relapses in MS patients (Hauser et al., 2008) before a significant decrease of circulating titers of autoantibodies occurs, does not suggest that antibodies per se are major effectors in MS. Rather, these observations suggest that B cells may mostly be involved through auto antigens or viral antigens presentation at the periphery

or in the brain (Fraser et al., 1979; Harp et al., 2010; Soulillou, 2013) and possibly by T cell dependant functions. As in other autoimmune diseases, a defect of immune regulatory T cells (Haas et al., 2005; Viglietta et al., 2004) which may also affect B cells function (Kinnunen et al., 2013) has been suggested, however a defect in circulating Tregs has not been confirmed by all studies (Michel et al., 2008).

B cell tolerance to autologous determinants is a complex process which depends on two major check points: the first is taking place in the bone marrow and involves BCR affinity for autoantigens and of the subsequent signaling, triggering a reediting process of the BCR repertoire or cell apoptosis (Wardemann et al., 2003). Autoreactive B cells are nevertheless release in the periphery (Meffre and Wardemann, 2008a) where T cell-dependant second checkpoint operates. However, a substantial proportion of circulating B cells still remains poly- of cross-reactive despite these processes. The study of antigen-specific autoreactive B cells in human has been challenging due to low frequency in periphery (Franz et al., 2011; Leyendeckers et al., 1999; Slifka and Ahmed, 1996). Only few studies (Harp et al., 2010; Kinnunen et al., 2013) have attempted to measure frequencies and function of antigen-specific B cells in MS. In this paper, we used a new approach (Degauque and Elong Ngonu et al., submitted) based on the quantitative assessment of a direct BCR dependant interaction of a B cell with a fluorescent bead, covalently bound to the human MOG, to measure the frequency and characterize these autoantigen-specific B cells in MS. We show, for the first time, that MS patients have a significantly lower circulating anti MOG B cells frequency than healthy individuals and try to decipher some of the mechanisms that may operate in this process.

Material and methods

Patient and tested samples (Blood, CSF)

MS patients were recruited at the Nantes academic hospital. All patients included in this study had been diagnosed with MS by revised Mac Donald criteria (Polman et al., 2005). 38 Relapsing-Remitting patients (RRMS) listed in **table 1** were recruited. RR-MS gender matched group was composed to 27 females and 11 males ranging from age of 23 to 60 years old (mean age = 36.74 ± 1.59). All patients were scored on the kurtzke Expanded Disability Status Scale (EDSS) and had been without treatment for at least three (immunomodulatory treatments) or six months (immunosuppressant drugs) before testing. Another group of 8 MS patients with secondary progressive form was included to be comparing with RR-MS groups (female/male=6/2; mean age = 53.25 ± 2.78). 50 healthy individuals (HI) participated at this study, 31 females and 19 males ranging from age of 22 to 61 years old (mean age = 38.24 ± 1.65).

Eight patients with CIS and 8 patients with other neurological disease (OND) or other inflammatory neurological disease (OIND) were also enrolled in the intrathecal study. There were 5 females and 3 males ranging from 20 to 61 years old in CIS groups (female/male=5/3; mean age = 38.38 ± 5.15). The control group consisted of 8 patients with 4 hydrocephalus, 1 N-Methyl-D-Aspartate (NMDA) encephalitis, 1 leukopathy, 1 tetra pyramidal syndrome and idiopathic high pressure hydrocephalus. Control patients were composed to 4 females and 4 males ranging from 15 to 77 years old (female/male=4/4; mean age = 40.13 ± 7.67). Characteristics of CIS patients and controls are summarized in **table 1**. Our studies complies with the university hospital Ethical committee and all patients and controls (patients and HI) signed an informed consent for the study.

Obtention of protein-coupled beads

rMOG (Eurogentec, France), human albumin (LFB, France), non toxic TT C-fragment from clostridium tetani, (Sigma, France) proteins were coupled to fluorescent Bio-plex COOH beads (Bio-Rad, France) as described (Degauque N and Elong Ngono A, submitted). Briefly, the carboxyl groups of fluorescent COOH beads were activated by EDAC (1-ethyl-3-[3 dimethylaminopropyl] carbodiimide hydrochloride) and SNHS (Sulfo N-hydroxysulfosuccinimide), then the Bio-Plex Amine Coupling Kit (Bio-Rad, France) was used to couple proteins on the activated COOH beads. The coupling reaction was systematically checked by flow cytometry using the appropriate antibodies.

Quantification and phenotype of circulating MOG-specific B cells

Mononuclear cells were isolated from fresh blood samples by Ficoll-Hypaque density gradient centrifugation (PAA, France) and immediately frozen in serum-DMSO 10%. Purified B cells were obtained by negative magnetic selection (Miltenyi, France) from cryopreserved PBMC. Briefly, 3×10^5 B cells were stained with CD19-PE (BD, France), CD27-QDot 605 (Invitrogen, France), IgD-FITC (BD, France), CD5-FITC (BD, France) and CD38-PECy5 (Beckman, France) at 4°C for 30 minutes. Cells were washed twice with 150 μ l of PBS/2%FCS/2mM EDTA and incubated in 50 μ l of PBS/2%FCS/2 mM EDTA with protein-coated beads for 1 hour at 4°C. Cells were washed and DAPI was added to select only live cells just before FACS assay. The frequency of antigen-specific B cells was evaluated by Flow cytometry LSR II (BD, France) and performed with flowJo software version 7.6.12.

Apoptosis assay

To evaluate the apoptosis in the BBR fraction, we used the annexin V-FITC apoptosis detection Kit (BD, France). Briefly, 3.10^5 B cells purified by negative selection were stained with CD19-PE and incubated with proteins-coupled Beads for 1 hour. Cells were washed and resuspended in 100 μ l to a 5 ml culture tube. Annexin V-FITC was added and incubated with cells during 15 minutes at Room Temperature (RT). Then, 400 μ l of binding buffer and Dapi were added before analyzing by flow cytometry within 1 hr. Live B cells (Annexin V⁻ Dapi⁻), early apoptotic B cells (Annexin V⁺ Dapi⁻) and late apoptotic B cells (annexin V⁻ Dapi⁺) were selected.

Quantification of intrathecal MOG-specific B cells

Approximately, 10 ml of CSF was obtained after lumbar puncture and immediately added in 40 ml of RPMI supplemented medium (10% FCS). Briefly, CSF samples were then centrifuged at 1500 rpm for 7 minutes to collect cells. Cells were resuspended in 200 μ l of PBS/2%FCS/2mM EDTA and stained with CD19-PE antibody for 30 minutes at 4°C. CSF cells were washed and incubated either with albumin or MOG-coupled beads as indicated above.

B cell transmigration assay through endothelial cell line

The human Blood-Brain-Barrier (BBB) endothelial cell line, HCMEC/D3 was kindly provided by Pr. Pierre-Olivier Couraud (Cochin Institute, Paris France). HCMEC/D3 is an endothelial cells immortalized cell line derived from a primary cell culture coexpressing

hTERT and the SV40 large T antigen via a highly lentiviral vector system. (weksler et al. 2005). HCMEC/D3 ($4.3 \cdot 10^6$ cells per flask) was grown to 100% confluency in Nuncflasks 175 and the properties of BBB stayed between the 25 and 35 passage. Transmigration assays were performed using the transwell system (8.0 μ m pore filters; BD falcon, France) as we previously described (Bahbouhi et al., 2009). Briefly, cell concentration was tested and concentration which allowed more than 5% albumin diffusion in the lower chamber after 6 hours were discarded. Two days before the migration assay, $1 \cdot 10^6$ HCMEC/D3 cells were cultured on the apical side of filter insert, pre-coated with 150 μ g/ml cultrex Rat collagen (R&D system, France). All cells were grown in endothelial basal medium-2 (EBM-2, Lonza) supplemented with 5% Human serum (PAA, France), 5 μ g/ml ascorbic acid (Sigma, France), 1% chemically defined lipid concentrate (Invitrogen, France), 10 mM HEPES buffer (PAA) and 1% Penicillin-streptomycin (Invitrogen, France). $5 \cdot 10^5$ B cells obtained by negative selection were suspended in supplemented RPMI and in EBM-2 (V/V) and were added in top of BBB layer washed by Dulbecco's phosphate Buffered Saline (DPBS) (Sigma, France). After 18H at 37°C with 5% CO₂, the contents of the bottom chamber were collected with EDTA to detach any adherent cells and B cells were counted to the microscope. The transmigrated cells were washed, stained with CD19-PE and incubated with albumin or MOG coupled Beads as indicated before. The frequency of BBR cells was determined by flow cytometry.

Statistical analysis

All data are expressed as mean \pm SEM. Mann Whitney tests were used to compare two different groups and Wilcoxon test to compare two variables in the same group. T test was used to compare two groups with more than 30 individuals. All statistical analyses were performed with GraphPad Prism.

Results

Quantification of MOG-specific B cell frequencies in MS patients

MOG is a myelin antigen of expression restricted to the CNS which induces experimental autoimmune encephalomyelitis (Lington et al., 1993) and is suspected to play a role in MS for review (Lee and Linker, 2012). Despite several studies have analyzed the frequencies of circulating T cell against MOG in MS (Van der Aa et al., 2003; Sun et al., 1991), B cells recognizing MOG are poorly known. In this study, we used MOG-coated polystyrene beads to identify *in vitro* CD19⁺ cells able to make rosettes (*referred as BBR for Bead/B Cell Rosettes*). This method, described in detail elsewhere (Degauque and Elong ngono, submitted), has been first validated for quantifying anti MOG B cells from mice transgenic for an IgH anti MOG BCR (Litzenburger et al., 1998). Specificity of rosette formation was confirmed by the competitive inhibition (average inhibition ~ 90%) of anti-MOG rosette by the soluble rMOG, whereas irrelevant antigens were unefficient (albumine or pp65). In human setting, B cells forming rosettes with rMOG coated beads are also detectable. Tetanus Toxin (TT) coated beads were used as the positive controls, since vaccination against this antigen which generates persistent response (Amanna et al., 2007). Several negative controls were used: uncoated beads which did not form rosettes with CD19⁺ B cells, and albumin coated beads and T cells did not form rosettes with any of the proteins coated beads used.

Using this approach, we observed a substantial frequency of circulating B cells rosetting with rMOG coated beads in the cohort of MS patients (n=38) (**Figure 1**). However, unexpectedly, this frequency was statistically lower than the frequency observed in the cohort of 50 healthy individuals (HI) tested in parallel (0.86 ± 0.12 and 1.33 ± 0.14 % respectively, $p=0.0188$, **Figure 1**). Thus, even if a substantial frequency of anti MOG-BBR was observed in apparently normal individuals, mimicking the profile obtained in studies of frequency of T cells reacting with MOG (Berthelot et al., 2008; Elong Ngono et al., 2012), MS patients are characterized by a lower frequency of circulating anti MOG-reactive B cells than normal counterparts. In contrast, the frequency of B cells which recognized albumin coated beads was the same in MS ($0.40 \pm 0.09\%$) and HI (0.42 ± 0.07 %) (**Figure 1**). A high and similar frequency of B cells recognized TT coated beads was also obtained in MS patients and HI, 6.64 ± 0.74 and 5.84 ± 0.66 %, $p=0.37$, but in contrast to the anti MOG frequency, the difference was not significant (**Figure 1**).

The frequency of MOG-BBR cells in MS was then classified according to disease activity (relapses or remissions) and to MS clinical forms. We did not observe significant difference between anti MOG-BBR frequency of patients in relapses ($n=9$, $0.72 \pm 0.15\%$) and patients in clinical remission ($n=29$, $0.92 \pm 0.16\%$) (**Figure 2**). Both groups had a lower frequency of MOG-BBR compared to HI ($p=0.01$ and $p=0.02$, respectively). We also studied a small group ($n=8$) of patients with secondary progressive form of MS (SPMS) and showed a similar anti MOG-BBR frequency as in HI (1.61 ± 0.21 and $1.33 \pm 0.14\%$ respectively, $p>0.05$). The difference between the values of anti MOG-BBR of the SPMS and RRMS groups was statistically significant ($p<0.05$).

To try to understand possible mechanisms of reduced circulating anti MOG-BBR in MS, several experiments were conducted, ranging from phenotypic characterization, apoptotic or proliferative trends and capacity of rosetting B cells to migrate *in vitro* through brain-derived endothelial cells. In addition, anti MOG-BBR were tested in blood and spinal fluid of small groups of patients with or without MS.

Phenotype of MOG-BBR cells

Naïve, memory and surface IgD switched phenotype: CD27 is a marker of human memory B cells (Klein and al 1998) able to mount an adaptative immune response against pathogens and to differentiate into antigen-specific antibody secreting cells (Agematsu et al., 2000). The lack of IgD on CD27⁺ B cell surface indicates memory-switched B cells (Jelinek et al., 1986). The frequency of memory (CD27⁺) and naïve (CD27⁻) B cells recognizing MOG-coated beads was thus assessed. We observed $32.6 \pm 3.16\%$ of CD27⁺ MOG-BBR and $64.86 \pm 2.88\%$ of CD27⁻ MOG-BBR in MS patients versus $37.31 \pm 3.84\%$ of CD27⁺ MOG-BBR and $59.77 \pm 4.02\%$ of CD27⁻ MOG-BBR in HI (**Figure 3a**). There was no statistical difference in phenotype distribution within MOG-BBR between MS and HI, although naïve MOG-BBR were more represented than memory phenotype in both groups ($p=0.01$). The frequency of switched and unswitched memory MOG-BBR (CD27⁺IgD⁻ and CD27⁺IgD⁺) also did not differ between MS and HI (switched-memory MOG-BBR: 4.25 ± 1.11 and $6.11 \pm 1.43\%$ respectively, $p=0.40$ and unswitched memory MOG-BBR : 28.13 ± 2.78 and $32.96 \pm 4.41\%$ respectively, $p=0.52$) (**Figure 3b**).

CD5 positive B cells and activated-naïve B cell phenotype: CD5 is expressed by a subset of B cells associated to innate recognition (Casali et al., 1987) and autoimmune pathology (Dauphinée et al., 1988). There was $12.52 \pm 2.9\%$ of CD5⁺MOG-BBR in MS compare to

13.16 ± 3.09 % of CD5⁺ MOG-BBR in HI. There was no statistical difference between MS and HI (p=0.97) (**Figure 4a**). CD38 expression, a marker of transitional and activation development stage of B cells, expressed on germinal center, antibody-secreting cells and on activated-naïve B cells (Morabito et al., 2006) for review), was also analysed. The strategy of gating used allowed to obtain four subsets: CD27⁻CD38⁻ representing mature naïve B cells, CD27⁻CD38⁺ corresponding to activated naïve B cells, CD27⁺CD38⁺ corresponding to Germinal Center B cells (GC) and CD27⁺CD38⁻ for memory B cells). The frequency of activated-naïve, mature naïve, GC and memory MOG-BBR are summarized in **Table 2**. Despite there was a statistical difference between frequencies of memory B cells (15.25 ± 3.27 %) and memory MOG-BBR in both MS (6.84 ± 1.46 %, p=0.008) and HI (6.78 ± 1.71 %, p=0.018), we did not observed a significant difference between MS and HI concerning each of these subsets.

KI-67 markers: Ki-67 is a marker for proliferating cells (Gerdes and al.1983) expressed during all active phases of the cell cycle that may detect a lower proliferative property of anti MOG-BBR in MS patients. Only a non significant trend (p=0.07) was found between the two cohorts: 2.16 ± 0.46 % MOG-BBR positive for KI-67 in MS patients (n=10) and 5.37 ± 1.33 % in HI (n=10) (**Figure 4b**) suggesting a possible lower proliferative potential of these cells in MS compared to healthy individuals.

No significant difference in apoptosis of anti MOG-BBR cells from MS and healthy individuals

Among several possibilities to explain the decreased frequency of MOG-BBR in MS patients compared to HI, apoptosis was considered. A combination of Annexin V (recognizing phosphatidylserine-PS- on the cell surface) and Dapi to detect early (Annexin V⁺, dapi⁻) and late (Annexin V⁺, dapi⁺) apoptotic cells was used (**Figure 5a**). Ten patients with RR-MS and 10 HI were tested. Early and late apoptosis markers of MOG-BBR were not different in MS and healthy individuals (early apoptosis: 6.56 ± 1.38 and 7.29 ± 1.61%, p=0.88; for late apoptosis: 16.20 ± 2.75 and 17.14 ± 3.53%, respectively, **Figure 5b**).

Intrathecal MOG-specific B cells

As a decrease of circulating anti MOG-BBR in patients with MS could be due to a preferential migration of MOG-reactive B cells of MS patients in the CNS. We thus checked if MOG-reactive B cells accumulated in the spinal fluid of 8 patients with clinically isolated syndrome (CIS) and in 8 patients with others neurological disorders, inflammatory and not, as

controls. There was an average of 525.5 ± 105.8 B cells (CD19⁺Dapi⁻) in CSF samples. We found an identical frequency of MOG-specific B cells in CIS (10.28 ± 4.48 %) and control individuals (8.62 ± 3.98 %) (**Figure 6a**). The CSF frequency of MOG-BBR was increased in the both groups compared to albumin-BBR frequency in CIS (2.47 ± 0.99 %, $p=0.007$) and controls (1.71 ± 0.80 %, $p=0.03$). However, there was no statistical difference between CIS patients and controls ($p=0.6$). Intrathecal anti MOG frequency (12.18 ± 5.81 and 9.24 ± 4.65 %) were constantly significantly higher than those of circulating anti MOG-BBR (1.28 ± 0.11 and 0.57 ± 0.10 %) in CIS patients and in control group respectively ($p<0.05$) (**Figure 6b**). Intrathecal anti albumin-BBR were also higher than blood ones (data not show).

Anti MOG-BBR transfer through brain derived endothelial cells

Human B cells migrate across the Blood-Brain-Barrier (BBB) as efficiently as T cells (Alter et al., 2003). We first tested whether total B cells from MS patients transmigrated more efficiently than HI B cells across the endothelial cell layer *in vitro*. In MS, 8750 ± 1505 B cells transmigrated overnight compared to 11111 ± 1852 cells in HI out from 5.10^5 CD19⁺ cells initially placed in the double chamber device (about 2% of B cells). There was not statistically difference ($p=0.49$, **Figure 7a**). We then checked whether MOG-BBR accumulated more efficiently in MS patients compared to HI by assessing the capacity of B cells to make MOG-BBR after transmigration assay. We observed no statistically difference of transmigration rate of MOG-reactive B cells (24.85 ± 6.32 % in MS and 25.11 ± 6.50 % in HI) (**Figure 7b**).

Discussion

The potential role of B cells in MS disease has been less documented than that of T cells. In this paper, we have explored the frequency of MOG specific B cells in the blood, as well as in the spinal fluid of patients with multiple sclerosis (MS), using a new method based of the measurement of a direct interaction between a B lymphocyte and a fluorescent polystyrene bead to which human MOG is covalently bound. The method and its potential interest in several contexts involving B cells, such as response to a vaccination, organ transplants or autologous antigens, have been detailed elsewhere (Degauque N and Elong Ngonon A, submitted).

A first finding was that the frequency of B cells engaging complex with MOG-coated beads was unexpectedly high, both in the patients and in healthy individuals (HI). This observation is reminiscent of the well documented description of high frequency of MOG-specific T cells in HI (Van der Aa et al., 2003; Bahbouhi et al., 2010; Berthelot et al., 2008; Sun et al., 1991) and see (Elong Ngonon et al., 2012) for review. However, B cell specific maturation processes are likely involved in these high anti-MOG B cell frequencies. BCR cross-reactivity and/or polyreactivity studies of blood B cells (Koelsch et al., 2007; Tiller et al., 2007; Tsuiji et al., 2006; Wardemann et al., 2003) have indeed been ambiguously shown a substantial percentage of circulating B cells (20% of immature B cells remain autoreactive, with 4% of them being polyreactive cells) which have escaped the first BCR-dependant bone marrow selection check point triggering apoptosis or reediting for autoreactive BCR (Wardemann et al., 2003), and for review Meffre and Wardemann 2008). In these seminal studies, the end point was the production of Ig against a panel of antigens in limiting condition. A study of the direct binding of the B cell to its antigen may be a more sensitive tool for frequency calculation. In addition, our method utilized Luminex beads which, when utilized for testing specific antibodies, such as antibodies directed against anti-HLA Ag for instance, have shown a gain of sensitivity of an order of magnitude compared to classical methods (Ferrari-Lacraz et al., 2012; Gibney et al., 2006) whether an assay using the same read out (FACS) and material (Luminex) also displays a gain in sensitivity is conceivable. However, the inhibition of MOG coated beads recognition by addition of soluble MOG to the test showed the specificity of our method. Moreover, the frequency of B cells interacting with non-coated beads was as low as 0.0014 ± 0.005 .

Although high in both MS patients and normal individuals, we observed a significantly decreased anti-MOG B cell frequency in the blood of MS versus age/gender matched control individuals, a finding which was surprising and in some respect counter intuitive. Importantly, the samples from HI and MS were routinely processed back to back in the tests. Furthermore, no difference was shown in the frequencies for tetanus toxin or for albumin coated beads between patients with MS and normal individuals. Finally, the anti-MOG B cells frequency was not decreased in a small group of MS patients with secondary progressive form (SPMS) and values observed in RRMS were statistically different from that of patients with SPMS. We did not find evidence for a specific phenotype bias of the anti-MOG B cells, with normal distribution (both for MS and HI) of naïve, memory cell phenotypes.

Recently, a subset of potentially autoreactive B cells -B1 cells (as defined as $CD3^-CD20^+CD27^+CD43^+$ in the study (Griffin and Rothstein, 2012), was found significantly decreased in the blood of MS patients versus normal counterparts (Tørring et al., 2013). However, no test for MOG-specificity of the studied B1 cells was performed in this study. Whether this abnormal level of B1 cells can contribute to our observation is not likely. Indeed, the magnitude of the decrease of B1 cells (29% of the B cells in the referred study) was too small (1.2% in MS patients vs 1.7% in normal individuals) to account significantly for our observation (RRMS had a 36% decrease of anti MOG BBR). Furthermore, if our phenotype study did not specifically target B1 cells, the B cell selection kit that we used did not select $CD43^+$ cells to which most of the B1 cells belong. To the best of our knowledge, only one study is available on anti-MOG frequency, using an other method -biotinylated MOG- in a small cohort (n=9) of patients with RRMS (Harp et al., 2010). This interesting study showed that circulating memory anti-MOG B cells of MS patients could provide a stronger help to $CD4^+$ T cells than that of normal individual cells. However, no significant difference of frequency of anti-MOG B cells was noted: the reason for this discrepancy with our study is not clear, although our cohort was 4 fold bigger (38 MS compared to 50 HI). Recently, another study reported that autoreactive B cells in MS were more prone to produce polyreactive antibodies to an extract of white matter (Kinnunen et al., 2013) than in normal counterparts. However, no frequency of MOG-specific B cells or B cells specific for myelin derived proteins was also analyzed.

Attempt to identify reasons for a significant decrease of anti MOG circulating B cells has been so far unsuccessful. Particularly, we could not find evidence of an increase in early or late apoptosis of anti-MOG B cells. Similarly, the growth potential of MOG specific B cells,

as assessed by expression of the KI-67 marker, did not significantly differ although there was a trend for lower expression in MS patients ($p=0.07$). The possibility that a “missing” MOG specific circulating B cells could home in the CNS was indirectly assessed in the CFS of a small group of MS patients, compared to patients with non-MS pathologies, as well as to the anti MOG-BBR frequency in the blood of the same patients. A such possibility was indeed suggested by a documented increase of anti-MOG IgG in MS patients spinal fluid compared to controls with non-inflammatory neurological diseases (Markovic et al., 2003) as well as by evidence of shared BCR clonotypes between blood and CSF (von Büdingen et al., 2012). However, despite an elevated frequency was noted in CSF versus blood, no significant difference between patients with or without MS was observed. Finally, a study of transmigration of B cells through brain-derived endothelial cell layers in double chamber device showed efficient transmigration of B cells (2 %) similar to the transmigration rate we previously reported for $CD4^+$ T cells in MS (Bahbouhi et al., 2009) using the same endothelial cell line and methods (2%) and in agreement with another report (Alter et al., 2003), however we did not observe an increased transmigration of anti MOG-BBR in RRMS versus counterparts .

Thus, if our study brings a first evidence of abnormal pool of anti MOG in 38 RRMS patients compared to 50 HI ($p=0.0188$), we were not able to identify precisely the mechanism(s) for this difference. Our study may have been unable to detect in an *in vitro* test discrete changes in surface molecule regulating B cells interaction involved in B cell homing or in the other parameters study, taking place during all the disease length *in vivo*. It is also possible that the mechanisms that may govern this decrease MOG specific frequency are no more active at the time of the study. Clearly, more works are required for understanding the nature of a possible missing B cells population in MS or for characteristics of anti MOG B cells (no exhaustive phenotype could be tested, particularly due to the small amount of BBR). Transcriptional studies may help to definite more discrete differences between patients and control cells. Finally, whether MOG specific B cells are actually involved in the disease pathology is not directly comforted by our observation. B cells and anti MOG B cells - role in the disease remains elusive considering that a high percentage of these specific B cells is also observed in normal individual blood. In this respect, the positive effect of anti-CD20 on the disease outcome might be misleading regarding the actual role of B cells in the disease. Indeed beside the destruction of a fraction of potentially pathogenic B cells, such reagents may also affect

the properties of bystander B cells and induce these cells to produce immunoregulatory cytokines or functions (Kamburova et al., 2012, 2013) as recently suggested.

Acknowledgments

We thank Fabienne Glacial for kindly providing brain derived endothelial cells (Cochin Institute), Emilie Dugast for technical help and G.Krishnamoorthy and H.Wekerle for kindly providing the transgenic mice.

Grant Supports

Annie ELONG NGONO was supported by a grant from the Région Pays de Loire: “TRAK in MS” program

References

- Agematsu, K, S Hokibara, H Nagumo, and A Komiyama. 2000. "CD27: a Memory B-cell Marker." *Immunology Today* 21 (5) (May): 204–206.
- Alter, Andrea, Martin Duddy, Sherry Hebert, Katarzyna Biernacki, Alexandre Prat, Jack P Antel, Voon Wee Yong, et al. 2003. "Determinants of Human B Cell Migration Across Brain Endothelial Cells." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 170 (9) (May 1): 4497–4505.
- Amanna, Ian J, Nichole E Carlson, and Mark K Slifka. 2007. "Duration of Humoral Immunity to Common Viral and Vaccine Antigens." *The New England Journal of Medicine* 357 (19) (November 8): 1903–1915. doi:10.1056/NEJMoa066092.
- Bahbouhi, Bouchaib, Laureline Berthelot, Ségolène Pettré, Laure Michel, Sandrine Wiertlewski, Babette Weksler, Ignacio-Andres Romero, et al. 2009. "Peripheral Blood CD4+ T Lymphocytes from Multiple Sclerosis Patients Are Characterized by Higher PSGL-1 Expression and Transmigration Capacity Across a Human Blood-brain Barrier-derived Endothelial Cell Line." *Journal of Leukocyte Biology* 86 (5) (November): 1049–1063. doi:10.1189/jlb.1008666.
- Bahbouhi, Bouchaib, Ségolène Pettré, Laureline Berthelot, Alexandra Garcia, Annie Elong Ngono, Nicolas Degauque, Laure Michel, et al. 2010. "T Cell Recognition of Self-antigen Presenting Cells by Protein Transfer Assay Reveals a High Frequency of Anti-myelin T Cells in Multiple Sclerosis." *Brain: a Journal of Neurology* 133 (Pt 6) (June): 1622–1636. doi:10.1093/brain/awq074.
- Ben-Nun, A, H Wekerle, and I R Cohen. 1981. "Vaccination Against Autoimmune Encephalomyelitis with T-lymphocyte Line Cells Reactive Against Myelin Basic Protein." *Nature* 292 (5818) (July 2): 60–61.
- Bernasconi, Nadia L, Elisabetta Traggiai, and Antonio Lanzavecchia. 2002. "Maintenance of Serological Memory by Polyclonal Activation of Human Memory B Cells." *Science (New York, N.Y.)* 298 (5601) (December 13): 2199–2202. doi:10.1126/science.1076071.
- Berthelot, Laureline, David-Axel Laplaud, Ségolène Pettré, Caroline Ballet, Laure Michel, Sophie Hillion, Cécile Braudeau, et al. 2008. "Blood CD8+ T Cell Responses Against Myelin Determinants in Multiple Sclerosis and Healthy Individuals." *European Journal of Immunology* 38 (7) (July): 1889–1899. doi:10.1002/eji.200838023.
- Bettelli, Estelle, Dominique Baeten, Anneli Jäger, Raymond A Sobel, and Vijay K Kuchroo. 2006. "Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein-specific T and B Cells Cooperate to Induce a Devic-like Disease in Mice." *The Journal of Clinical Investigation* 116 (9) (September): 2393–2402. doi:10.1172/JCI28334.
- Casali, P, S E Burastero, M Nakamura, G Inghirami, and A L Notkins. 1987. "Human Lymphocytes Making Rheumatoid Factor and Antibody to ssDNA Belong to Leu-1+ B-cell Subset." *Science (New York, N.Y.)* 236 (4797) (April 3): 77–81.
- Compston, Alastair, and Alasdair Coles. 2008. "Multiple Sclerosis." *Lancet* 372 (9648) (October 25): 1502–1517. doi:10.1016/S0140-6736(08)61620-7.

- Dauphinée, M, Z Tovar, and N Talal. 1988. "B Cells Expressing CD5 Are Increased in Sjögren's Syndrome." *Arthritis and Rheumatism* 31 (5) (May): 642–647.
- Duddy, Martin E, Andrea Alter, and Amit Bar-Or. 2004. "Distinct Profiles of Human B Cell Effector Cytokines: a Role in Immune Regulation?" *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 172 (6) (March 15): 3422–3427.
- Duddy, Martin, Masaaki Niino, Femina Adatia, Sherry Hebert, Mark Freedman, Harry Atkins, Ho Jin Kim, and Amit Bar-Or. 2007. "Distinct Effector Cytokine Profiles of Memory and Naive Human B Cell Subsets and Implication in Multiple Sclerosis." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 178 (10) (May 15): 6092–6099.
- Elong Ngono, Annie, Ségolène Pettré, Marion Salou, Bouchaib Bahbouhi, Jean-Paul Soullillou, Sophie Brouard, and David-Axel Laplaud. 2012. "Frequency of Circulating Autoreactive T Cells Committed to Myelin Determinants in Relapsing-remitting Multiple Sclerosis Patients." *Clinical Immunology (Orlando, Fla.)* 144 (2) (August): 117–126. doi:10.1016/j.clim.2012.05.009.
- Ferrari-Lacraz, S., Tiercy, J.-M., and Villard, J. (2012). Detection of anti-HLA antibodies by solid-phase assay in kidney transplantation: friend or foe? *Tissue Antigens* 79, 315–325.
- Fillatreau, Simon, Claire H Sweenie, Mandy J McGeachy, David Gray, and Stephen M Anderton. 2002. "B Cells Regulate Autoimmunity by Provision of IL-10." *Nature Immunology* 3 (10) (October): 944–950. doi:10.1038/ni833.
- Franz, Bettina, Kenneth F May Jr, Glenn Dranoff, and Kai Wucherpfennig. 2011. "Ex Vivo Characterization and Isolation of Rare Memory B Cells with Antigen Tetramers." *Blood* 118 (2) (July 14): 348–357. doi:10.1182/blood-2011-03-341917.
- Fraser, K B, M Haire, J H Millar, and S McCrea. 1979. "Increased Tendency to Spontaneous In-vitro Lymphocyte Transformation in Clinically Active Multiple Sclerosis." *Lancet* 2 (8145) (October 6): 175–176.
- Genain, C P, B Cannella, S L Hauser, and C S Raine. 1999. "Identification of Autoantibodies Associated with Myelin Damage in Multiple Sclerosis." *Nature Medicine* 5 (2) (February): 170–175. doi:10.1038/5532.
- Haas, Jürgen, Andreas Hug, Andrea Viehöver, Benedikt Fritzsching, Christine S Falk, Andrea Filser, Tina Vetter, 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." *European Journal of Immunology* 35 (11) (November): 3343–3352. doi:10.1002/eji.200526065.
- Harp, Christopher T, Sara Ireland, Laurie S Davis, Gina Remington, Bonnie Cassidy, Petra D Cravens, Olaf Stuve, 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." *European Journal of Immunology* 40 (10) (October): 2942–2956. doi:10.1002/eji.201040516.
- Hauser, Stephen L, Emmanuelle Waubant, Douglas L Arnold, Timothy Vollmer, Jack Antel, Robert J Fox, Amit Bar-Or, et al. 2008. "B-cell Depletion with Rituximab in Relapsing-

remitting Multiple Sclerosis.” *The New England Journal of Medicine* 358 (7) (February 14): 676–688. doi:10.1056/NEJMoa0706383.

Iwata, Yohei, Takashi Matsushita, Mayuka Horikawa, David J Dilillo, Koichi Yanaba, Guglielmo M Venturi, Paul M Szabolcs, et al. 2011. “Characterization of a Rare IL-10-competent B-cell Subset in Humans That Parallels Mouse Regulatory B10 Cells.” *Blood* 117 (2) (January 13): 530–541. doi:10.1182/blood-2010-07-294249.

Jelinek, D F, J B Splawski, and P E Lipsky. 1986. “Human Peripheral Blood B Lymphocyte Subpopulations: Functional and Phenotypic Analysis of Surface IgD Positive and Negative Subsets.” *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 136 (1) (January): 83–92.

Kamburova, E. G., H. J. P. M. Koenen, K. J. E. Borgman, I. J. ten Berge, I. Joosten, and L. B. Hilbrands. 2013. “A Single Dose of Rituximab Does Not Deplete B Cells in Secondary Lymphoid Organs but Alters Phenotype and Function.” *American Journal of Transplantation* 13 (6): 1503–1511. doi:10.1111/ajt.12220.

Kamburova, E.G., Koenen, H.J.P.M., Boon, L., Hilbrands, L.B., and Joosten, I. (2012). In vitro effects of rituximab on the proliferation, activation and differentiation of human B cells. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* 12, 341–350.

Kinnunen, Tuure, Nicolas Chamberlain, Henner Morbach, Tineke Cantaert, Megan Lynch, Paula Preston-Hurlburt, Kevan C Herold, David A Hafler, Kevin C O’Connor, and Eric Meffre. 2013. “Specific Peripheral B Cell Tolerance Defects in Patients with Multiple Sclerosis.” *The Journal of Clinical Investigation* 123 (6) (June 3): 2737–2741. doi:10.1172/JCI68775.

Klein, Ulf, Klaus Rajewsky, and Ralf Küppers. 1998. “Human Immunoglobulin (Ig)M+IgD+ Peripheral Blood B Cells Expressing the CD27 Cell Surface Antigen Carry Somatic Mutated Variable Region Genes: CD27 as a General Marker for Somatic Mutated (Memory) B Cells.” *The Journal of Experimental Medicine* 188 (9) (November 2): 1679–1689. doi:10.1084/jem.188.9.1679.

Knippenberg, Stephanie, Evelyn Peelen, Joost Smolders, Mariëlle Thewissen, Paul Menheere, Jan Willem Cohen Tervaert, Raymond Hupperts, and Jan Damoiseaux. 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.” *Journal of Neuroimmunology* 239 (1–2) (October 28): 80–86. doi:10.1016/j.jneuroim.2011.08.019.

Koelsch, Kristi, Nai-Ying Zheng, Qingzhao Zhang, Andrew Duty, Christina Helms, Melissa D Mathias, Mathew Jared, Kenneth Smith, J Donald Capra, and Patrick C Wilson. 2007. “Mature B Cells Class Switched to IgD Are Autoreactive in Healthy Individuals.” *The Journal of Clinical Investigation* 117 (6) (June): 1558–1565. doi:10.1172/JCI27628.

Krishnamoorthy, Gurumoorthy, Hans Lassmann, Hartmut Wekerle, and Andreas Holz. 2006. “Spontaneous Opticospinal Encephalomyelitis in a Double-transgenic Mouse Model of Autoimmune T cell/B Cell Cooperation.” *The Journal of Clinical Investigation* 116 (9) (September): 2385–2392. doi:10.1172/JCI28330.

Lee, De-Hyung, and Ralf A Linker. 2012. “The Role of Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein in Autoimmune Demyelination: a Target for Multiple Sclerosis Therapy?” *Expert Opinion on Therapeutic Targets* (April 12). doi:10.1517/14728222.2012.677438.

- Leyendeckers, H, M Odendahl, A Löhndorf, J Irsch, M Spangfort, S Miltenyi, N Hunzelmann, M Assenmacher, A Radbruch, and J Schmitz. 1999. "Correlation Analysis Between Frequencies of Circulating Antigen-specific IgG-bearing Memory B Cells and Serum Titers of Antigen-specific IgG." *European Journal of Immunology* 29 (4) (April): 1406–1417. doi:10.1002/(SICI)1521-4141(199904)29:04<1406::AID-IMMU1406>3.0.CO;2-P.
- Linington, C, T Berger, L Perry, S Weerth, D Hinze-Selch, Y Zhang, H C Lu, H Lassmann, and H Wekerle. 1993. "T Cells Specific for the Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein Mediate an Unusual Autoimmune Inflammatory Response in the Central Nervous System." *European Journal of Immunology* 23 (6) (June): 1364–1372. doi:10.1002/eji.1830230627.
- Litzenburger, T, R Fässler, J Bauer, H Lassmann, C Linington, H Wekerle, and A Iglesias. 1998. "B Lymphocytes Producing Demyelinating Autoantibodies: Development and Function in Gene-targeted Transgenic Mice." *The Journal of Experimental Medicine* 188 (1) (July 6): 169–180.
- Lucchinetti, C, W Brück, J Parisi, B Scheithauer, M Rodriguez, and H Lassmann. 2000. "Heterogeneity of Multiple Sclerosis Lesions: Implications for the Pathogenesis of Demyelination." *Annals of Neurology* 47 (6) (June): 707–717.
- Mauri, Claudia, and Anneleen Bosma. 2012. "Immune Regulatory Function of B Cells." *Annual Review of Immunology* 30: 221–241. doi:10.1146/annurev-immunol-020711-074934.
- Meffre, Eric, and Hedda Wardemann. 2008. "B-cell Tolerance Checkpoints in Health and Autoimmunity." *Current Opinion in Immunology* 20 (6) (December): 632–638. doi:10.1016/j.coi.2008.09.001.
- Michel, Laure, Laureline Berthelot, Ségolène Pettré, Sandrine Wiertlewski, Fabienne Lefrère, Cécile Braudeau, Sophie Brouard, Jean-Paul Soulillou, and David-Axel Laplaud. 2008. "Patients with Relapsing-remitting Multiple Sclerosis Have Normal Treg Function When Cells Expressing IL-7 Receptor Alpha-chain Are Excluded from the Analysis." *The Journal of Clinical Investigation* 118 (10) (October): 3411–3419. doi:10.1172/JCI35365.
- Morabito, Fortunato, Rajendra N Damle, Silvia Deaglio, Michael Keating, Manlio Ferrarini, and Nicholas Chiorazzi. 2006. "The CD38 Ecto-enzyme Family: Advances in Basic Science and Clinical Practice." *Molecular Medicine (Cambridge, Mass.)* 12 (11-12) (December): 342–344. doi:10.2119/2006-00110.Morabito.
- Pallier, Annaick, Sophie Hillion, Richard Danger, Magali Giral, Maud Racapé, Nicolas Degauque, Emilie Dugast, et al. 2010. "Patients with Drug-free Long-term Graft Function Display Increased Numbers of Peripheral B Cells with a Memory and Inhibitory Phenotype." *Kidney International* 78 (5) (September): 503–513. doi:10.1038/ki.2010.162.
- Pöllinger, Bernadette, Gurumoorthy Krishnamoorthy, Kerstin Berer, Hans Lassmann, Michael R Bösl, Robert Dunn, Helena S Domingues, Andreas Holz, Florian C Kurschus, and Hartmut Wekerle. 2009. "Spontaneous Relapsing-remitting EAE in the SJL/J Mouse: MOG-reactive Transgenic T Cells Recruit Endogenous MOG-specific B Cells." *The Journal of Experimental Medicine* 206 (6) (June 8): 1303–1316. doi:10.1084/jem.20090299.
- Polman, Chris H, Stephen C Reingold, Gilles Edan, Massimo Filippi, Hans-Peter Hartung, Ludwig Kappos, Fred D Lublin, et al. 2005. "Diagnostic Criteria for Multiple Sclerosis: 2005

- Revisions to the ‘McDonald Criteria’.” *Annals of Neurology* 58 (6) (December): 840–846. doi:10.1002/ana.20703.
- Reindl, Markus, Franziska Di Pauli, Kevin Rostásy, and Thomas Berger. 2013. “The Spectrum of MOG Autoantibody-associated Demyelinating Diseases.” *Nature Reviews. Neurology* 9 (8) (August): 455–461. doi:10.1038/nrneuro.2013.118.
- Slifka, M K, and R Ahmed. 1996. “Limiting Dilution Analysis of Virus-specific Memory B Cells by an ELISPOT Assay.” *Journal of Immunological Methods* 199 (1) (November 29): 37–46.
- Soulillou, Jean-Paul. 2013. “Missing Links in Multiple Sclerosis Etiology. A Working Connecting Hypothesis.” *Medical Hypotheses* 80 (5) (May): 509–516. doi:10.1016/j.mehy.2013.01.036.
- Srivastava, Rajneesh, Muhammad Aslam, Sudhakar Reddy Kalluri, Lucas Schirmer, Dorothea Buck, Björn Tackenberg, Veit Rothhammer, et al. 2012. “Potassium Channel KIR4.1 as an Immune Target in Multiple Sclerosis.” *New England Journal of Medicine* 367 (2): 115–123. doi:10.1056/NEJMoa1110740.
- Steinman, Lawrence. 2007. “A Brief History of T(H)17, the First Major Revision in the T(H)1/T(H)2 Hypothesis of T Cell-mediated Tissue Damage.” *Nature Medicine* 13 (2) (February): 139–145. doi:10.1038/nm1551.
- Sun, J, H Link, T Olsson, B G Xiao, G Andersson, H P Ekre, C Linington, and P Diener. 1991. “T and B Cell Responses to Myelin-oligodendrocyte Glycoprotein in Multiple Sclerosis.” *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 146 (5) (March 1): 1490–1495.
- Tiller, Thomas, Makoto Tsuiji, Sergey Yurasov, Klara Velinzon, Michel C Nussenzweig, and Hedda Wardemann. 2007. “Autoreactivity in Human IgG+ Memory B Cells.” *Immunity* 26 (2) (February): 205–213. doi:10.1016/j.immuni.2007.01.009.
- Tørring, Caroline, Charlotte Christie Petersen, Lasse Bjerg, Emil Kofod-Olsen, Thor Petersen, and Per Höllsberg. 2013. “The B1-cell Subpopulation Is Diminished in Patients with Relapsing-remitting Multiple Sclerosis.” *Journal of Neuroimmunology* (July 12). doi:10.1016/j.jneuroim.2013.06.002.
- Tsuiji, Makoto, Sergey Yurasov, Klara Velinzon, Saskia Thomas, Michel C Nussenzweig, and Hedda Wardemann. 2006. “A Checkpoint for Autoreactivity in Human IgM+ Memory B Cell Development.” *The Journal of Experimental Medicine* 203 (2) (February 20): 393–400. doi:10.1084/jem.20052033.
- Van der Aa, Annegret, Niels Hellings, Claude C A Bernard, Jef Raus, and Piet Stinissen. 2003. “Functional Properties of Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein-reactive T Cells in Multiple Sclerosis Patients and Controls.” *Journal of Neuroimmunology* 137 (1-2) (April): 164–176.
- Viglietta, Vissia, Clare Baecher-Allan, Howard L Weiner, and David A Hafler. 2004. “Loss of Functional Suppression by CD4+CD25+ Regulatory T Cells in Patients with Multiple Sclerosis.” *The Journal of Experimental Medicine* 199 (7) (April 5): 971–979. doi:10.1084/jem.20031579.

Von Büdingen, H-Christian, Tracy C Kuo, Marina Sirota, Christopher J van Belle, Leonard Apeltsin, Jacob Glanville, Bruce A Cree, et al. 2012. “B Cell Exchange Across the Blood-brain Barrier in Multiple Sclerosis.” *The Journal of Clinical Investigation* 122 (12) (December 3): 4533–4543. doi:10.1172/JCI63842.

Wardemann, Hedda, Sergey Yurasov, Anne Schaefer, James W. Young, Eric Meffre, and Michel C. Nussenzweig. 2003. “Predominant Autoantibody Production by Early Human B Cell Precursors.” *Science* 301 (5638) (September 5): 1374–1377. doi:10.1126/science.1086907.

Weber, Martin S, Bernhard Hemmer, and Sabine Cepok. 2011. “The Role of Antibodies in Multiple Sclerosis.” *Biochimica et Biophysica Acta* 1812 (2) (February): 239–245. doi:10.1016/j.bbadis.2010.06.009.

Figure Legends

Figure 1: Quantification of MOG-specific B cell frequencies in MS patients and HI. Purified B cells stained with CD19 antibody were incubated with human albumin, rMOG or tetanus toxin (TT) coated beads. After exclusion of death cells (dapi⁺), we obtained the frequency of B cells which recognized albumin, rMOG in MS patients (n=38) and HI (n=50) *p=0.0188, *Unpaired T test*. The frequency of B cells for TT coated beads were also assessed in MS patients (n=20) and in HI (n=15), (ns, p>0.05) *Mann Whitney test*.

Figure 2: Quantification of MOG-specific B cell frequencies in MS patients according to disease activity and presentation: Disease activity regrouped clinical relapse and clinical remission. We analysed the difference in MOG-BBR frequencies for patients in relapses (n=9) and patients in clinical remission (n=29) versus HI (n=50) (*p<0.05) *Kruskall-wallis test*. No difference between patients in relapses and patients with clinical remission was observed (ns, p>0.05) (a). We included 8 patients with Secondary Progressive (SP) forms. We compare the three groups and there was statistically significant difference between SPMS patients and Relapsing-Remitting MS patients (p<0.05) but not between SPMS patients and HI (p>0.05) *kruskall-wallis test* (b).

Figure 3: Naïve, memory and surface IgD switched phenotype of MOG-specific B cells in MS patients and HI. B cells stained by CD19, CD27 and IgD antibodies were incubated with MOG coated beads. The frequency of memory (CD27⁺) and naïve (CD27⁻) MOG-BBR subset in MS (n=12) and HI (n=16) is represented. No difference are observed between MS and HI in memory (ns, p>0.05) and naïve sub-population (ns, p>0.05), *Mann withney test* (ns, p>0.05) (a). The frequency of switched (CD27⁺IgD⁻) and unswitched (CD27⁺IgD⁺) memory MOG-BBR subset was assessed in MS patients (n=12) and HI (n=15). No statistically significant difference was observed for switched and unswitched phenotype, *Mann withney test* (ns, p> 0.05) (b).

Figure 4: CD5 and KI-67 expression in MOG-specific B cells: We stained B cells with CD5 markers and the frequency of CD5⁺ B cells which recognized MOG was assessed in MS and HI (ns, p>0.05) *Mann Whitney Test* (a) Then, we included KI-67 markers to determine the proliferating states of MOG-BBR. We compared the frequency of MOG-BBR positive for KI67 in MS (n= 10) and HV (n=10), (ns, p=0.07) *Mann Whitney test* (b).

Figure 5: Analysis of apoptosis in MOG-specific B cells : We used annexin V and Dapi to characterize MOG-BBR apoptosis cells in MS (n=10) and HI (n=10). We analysed annexin V⁺ DAPI (early apoptotic cells) and annexin V⁺ DAPI⁺ (late apoptotic cells) in MOG-BBR subset. The gating strategy was represented (a). We compared the frequency of MOG-BBR apoptotic cells in MS and HI in early (ns, p>0.05) and late states (ns, p>0.05) *Mann withney test* (b)

Figure 6: Intrathecal MOG-specific B cells in CIS and patients with non MS related pathologies: Cells from fresh CSF samples were stained by CD19 antibody and incubated with rMOG and human albumin coated beads. After exclusion of death cells (dapi⁺), the frequency of B cells which recognized rMOG and albumin was assessed in CIS patients (n=8) and controls patients (n=8) (ns, p>0.05) *Mann whitney test*, *Wilcoxon test* was used to compare albumin-BBR and MOG-BBR in CIS (p<0.05) and control patients (p<0.05) (a) The frequency of circulating and intrathecal MOG-BBR was assessed in CIS patients (n=6) and controls patients (n=6). Intrathecal frequency of MOG-BBR was higher than circulating frequency (ns, p>0.005), *Mann withney test* (b).

Figure 7: Transmigration of B cells accross brain vessel derived endothelial cells : B cells were selected negatively and the transmigration assay accross HCMEC/D3 cell line has been performed. Transmigrated cells in MS and HI were counted to the microscope, no difference was observed (ns, p>0.05) *Mann withney test* (a) Transmigrated B cells were stained and incubated with MOG coated beads. The frequency of MOG-BBR was assessed in MS patients (n=10) and HI (n=9) (ns, p>0.05), *Mann withney test*(b).

Table legends

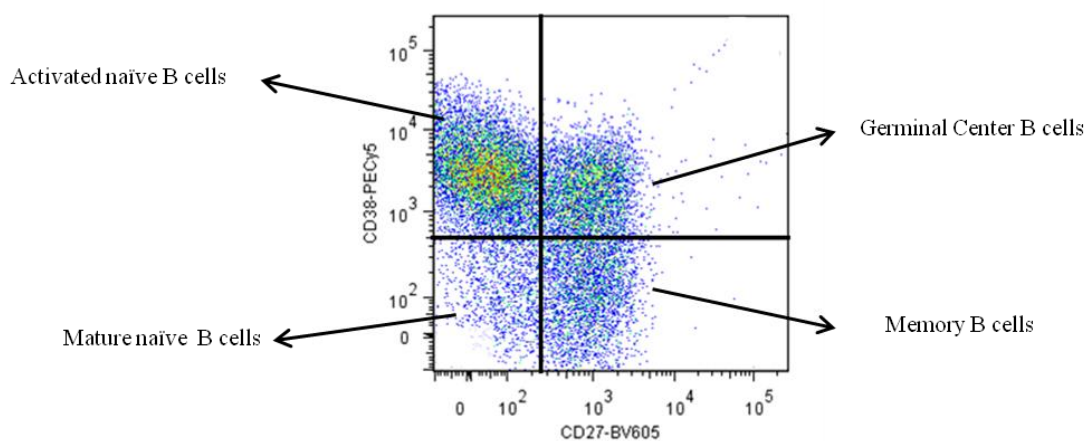
Table 1: Summary of Patients and sample characteristics: We included 38 patients with relapsing-remitting MS, 8 patients with secondary progressive MS and 50 Healthy Individuals (HI) to assess the frequency of circulating B cells which recognized MOG (MOG-BBR). We used also 8 patients with CIS and 8 patients without CIS or MS to determine intrathecal MOG-BBR (4 hydrocephalus, 1 N-Methyl-D-Aspartate (NMDA) encephalitis, 1 leukopathy, 1 tetra pyramidal syndrome and 1 idiopathic high pressure hydrocephalus).

Table 2: CD38 and CD27 Phenotype of MOG-specific B cells in MS and HI: We stained B cells with CD19, CD27 and CD38 antibodies and we assessed the frequency of CD27⁻CD38⁻ (Mature naïve B cells), CD27⁻CD38⁺ (activated-naïve B cells), CD27⁺CD38⁺ (Germinal center B cells) and CD27⁺CD38⁻ (memory B cells) among MOG-BBR and B cells in MS patients (n=10) and HI (n=10) *Mann whitney test*. No difference was observed between MS and HI for each subset (*ns*).

Table 1

	n	age	% females	% relapses	EDSS
RR MS	38	36.74 ± 1.59	71%	24%	1.75+/- 0.33
SP MS	8	53.25 ± 2.78	75%	-	-
HI	50	38.24 ± 1.65	62%	-	-
CIS	8	38.38 ± 5.15	62%	-	-
Controls	8	40.13 ± 7.67	50%	-	-

Table 2



Subsets	MOG-BBR (MS)	MOG-BBR (HI)	<i>P</i> value	B cells (MS)	B cells (HI)	<i>P</i> value
CD27 ⁻ CD38 ⁺	58.16 ± 4.91	53.06 ± 5.72	0.73	61.5 ± 4.63	58.32 ± 6.55	0.90
CD27 ⁻ CD38 ⁻	11.37 ± 2.73	7.63 ± 1.37	0.35	11.54 ± 1.44	10.99 ± 1.75	0.57
CD27 ⁺ CD38 ⁻	6.84 ± 1.46	6.78 ± 1.71	0.91	13.65 ± 1.72	15.25 ± 3.27	0.79
CD27 ⁺ CD38 ⁺	23.61 ± 3.98	32.54 ± 5.08	0.39	13.16 ± 2.88	15.37 ± 3.07	0.85

Figure 1

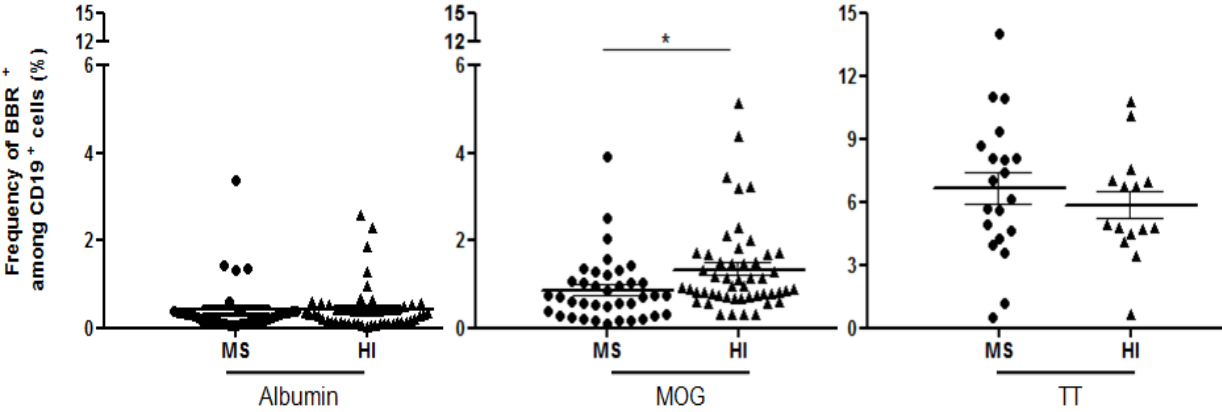


Figure 2

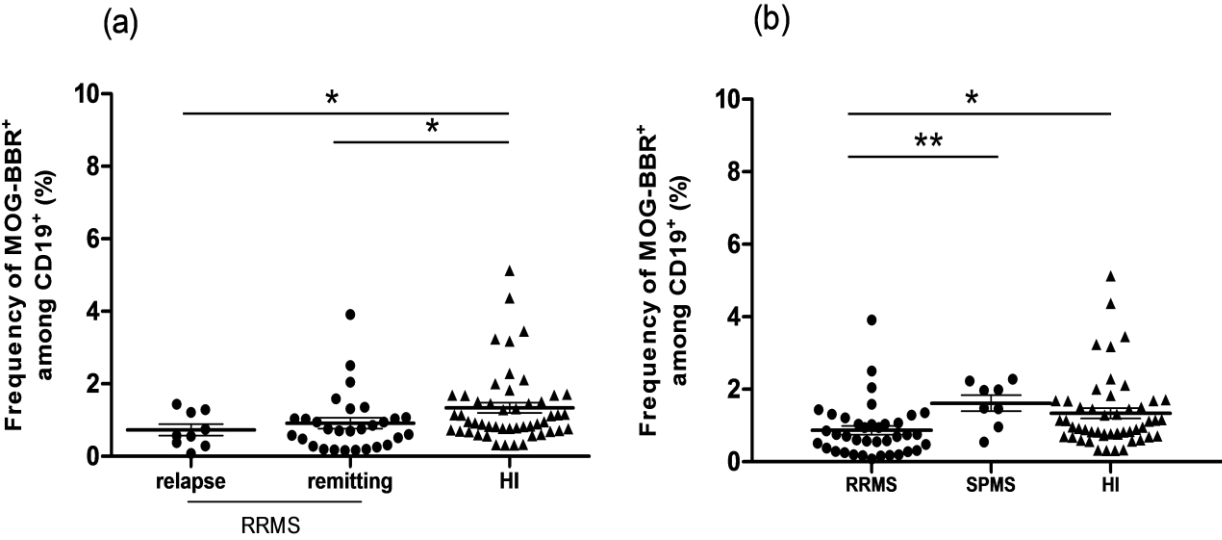


Figure 3

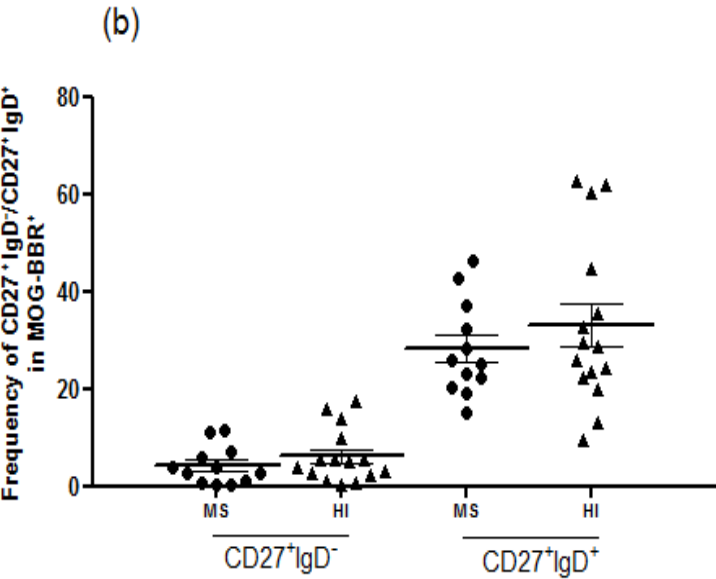
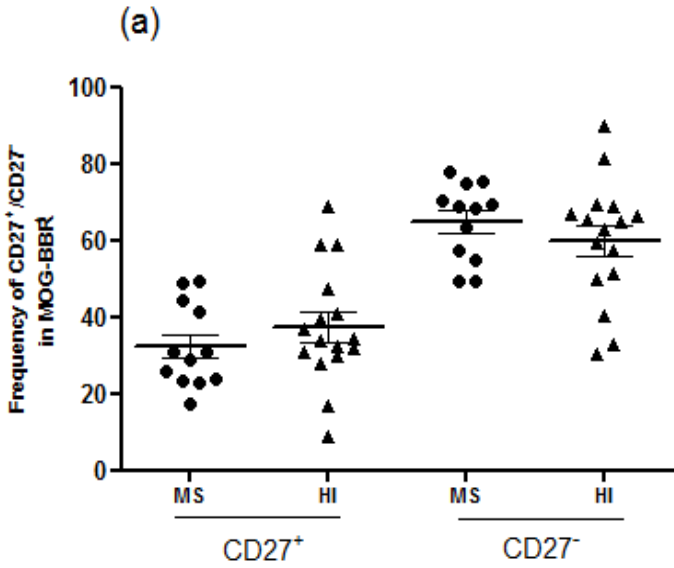


Figure 4

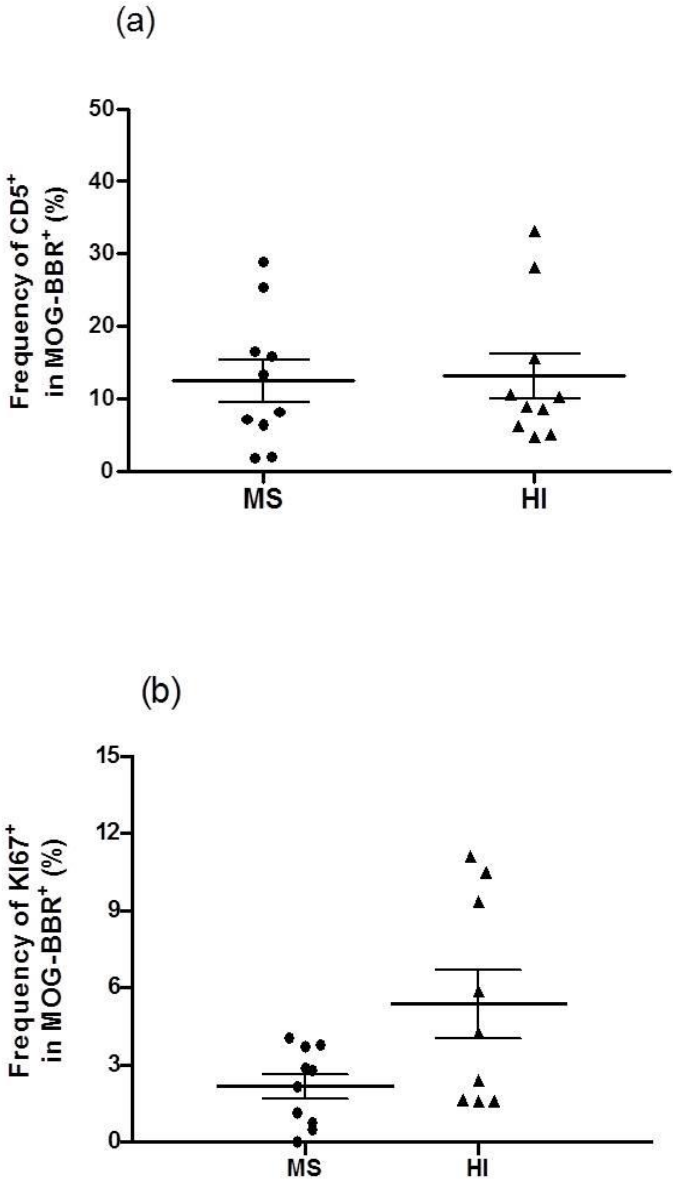


Figure 5

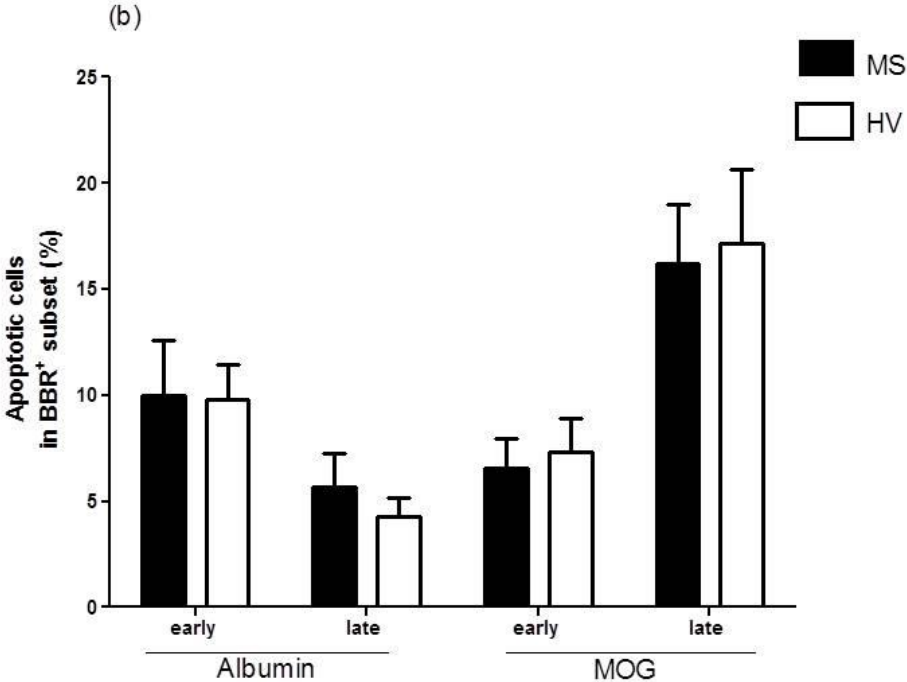
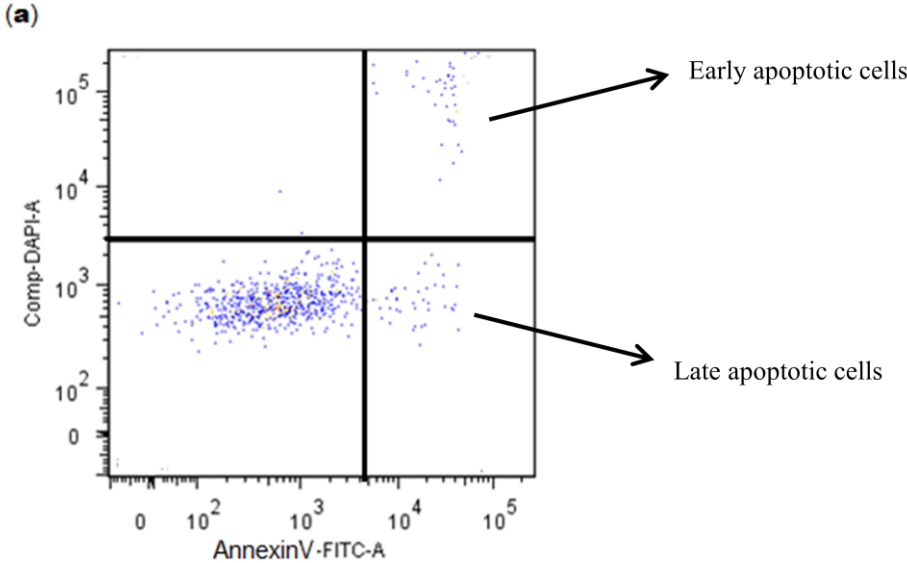


Figure 6

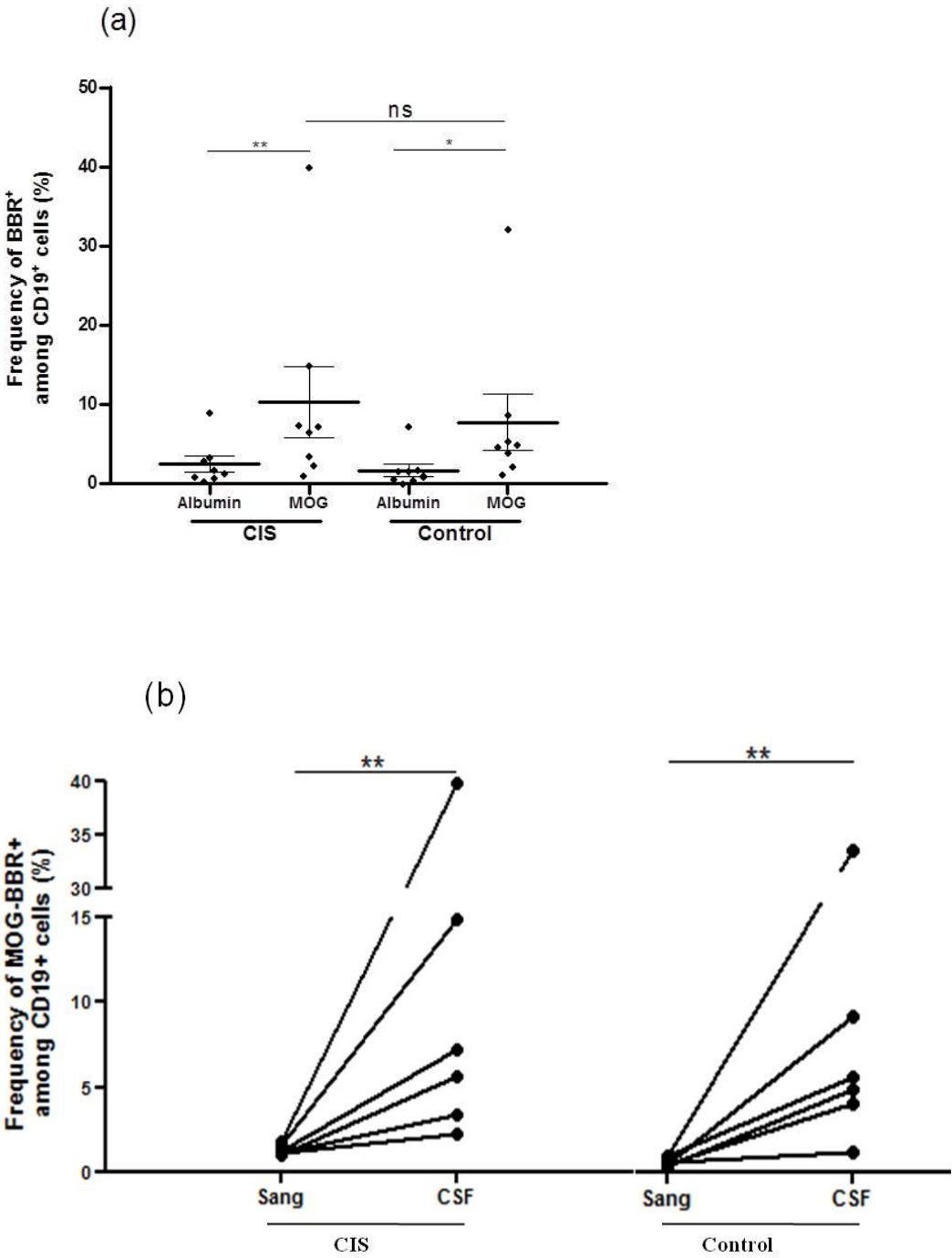
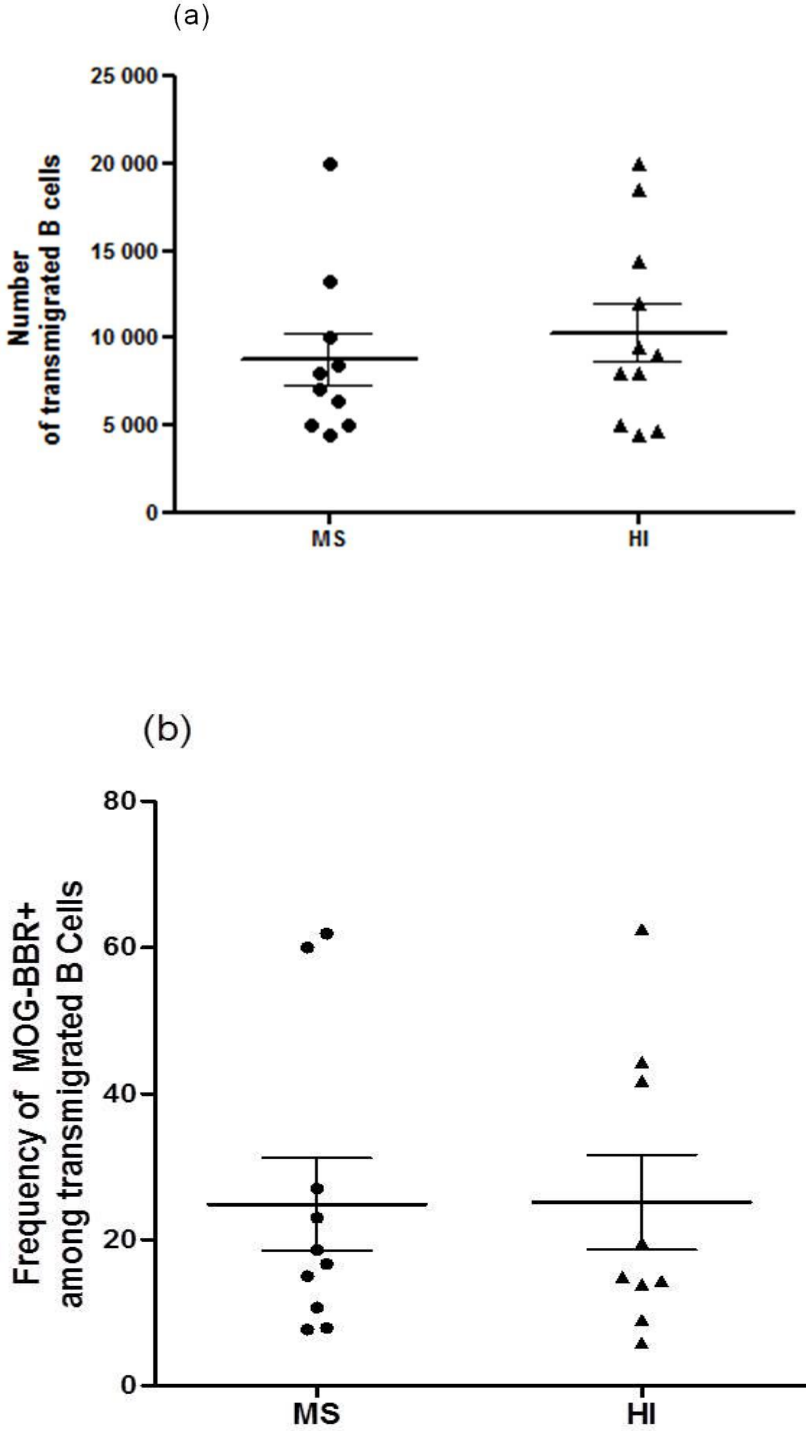


Figure 7



**DISCUSSION ET
PERSPECTIVES**

La Sclérose en plaques (SEP) est une maladie inflammatoire du SNC. Des études sur l'EAE encéphalomyélite auto-immune expérimentale, le modèle animal mimant certaines caractéristiques de la SEP, ont montré l'importance des lymphocytes auto-réactifs dans le développement de la maladie (Litzenburger et al., 1998; Ben-Nun et al., 1981a; Pöllinger et al., 2009). Dans le cadre de mon projet de thèse, j'ai eu pour objectif de contribuer aux investigations menées pour comprendre la place des LB auto-réactifs dans la SEP. Pour répondre à cette problématique, nous avons travaillé sur deux axes. Le premier concerne la détection des LB reconnaissant un auto-antigène en périphérie et le second axe est la caractérisation de ces cellules dans la SEP.

Les LB spécifiques d'un Ag donné sont en très faible quantité dans le sang, complexifiant ainsi leur détection. De plus la fonction productrice d'anticorps des LB étant la plus étudiée, la majorité des méthodes utilisées cible les LB différenciés en cellules sécrétrices d'anticorps. Un rôle direct de l'auto-réactivité des LB a été remis à l'ordre du jour par les résultats de l'utilisation thérapeutique d'anti-CD20 (Rituximab, RTX) dans la SEP : réduction considérable des poussées, sans modifier le titre des anticorps. (Hauser et al. 2008).

En général, les méthodes utilisées ciblent indirectement le LB, elles se basent sur les fonctions induites par la reconnaissance de l'Ag par le BCR (différenciation en cellules mémoires ou différenciation en cellules sécrétrices d'anticorps (CSA) (Amanna and Slifka, 2006; Crotty et al., 2003a, 2004; Slifka and Ahmed, 1996; Slifka et al., 1998). Elles nécessitent *in vitro* la stimulation du LB pour le permettre de se différencier mais en induisant des biais phénotypiques et fonctionnels (Jourdan et al., 2009). Ces méthodes (ELISPOT et ELISA) sont sensibles avec un seuil de détection très faible et sont excellentes pour caractériser du point de vue fonctionnel des LB reconnaissant un Ag dans le cadre de la vaccination par exemple (Amanna et al., 2007; Cao et al., 2010; Crotty et al., 2003b). Dans les maladies auto-immunes comme la SEP où les anticorps ne sont pas des marqueurs de la maladie, une approche semblable ne pourrait pas répondre à la problématique. D'autres méthodes comme le marquage de l'antigène ont été utilisées pour remédier à ce problème (Amanna and Slifka, 2006; Harp et al., 2010; Leyendeckers et al., 2002; Pape et al., 2011). Mais le marquage d'une protéine est souvent de faible intensité, peut marquer de manière aspécifique les cellules avoisinantes et enfin diffère souvent d'un Ag à l'autre. Une autre méthode, celle des tétramères récemment adaptée aux LB est une approche plus stable et sensible, permettant l'isolement des cellules d'intérêt et pouvant être utilisé pour générer rapidement des anticorps

(Franz et al., 2011). Cependant, le matériel utilisé pour les tétramères peut engendrer des reconnaissances aspécifiques nécessitant des contrôles spécifiques (Taylor et al., 2012).

Nous avons développé une technique utilisant des billes fluorescentes pour identifier les LB qui reconnaissent un antigène donné (BBR, beads-B cell rosettes). L'utilisation de splénocytes de souris transgéniques exprimant des LB avec un BCR spécifique de la MOG (IgH-MOG) a permis de mettre en avant la spécificité de cette méthode. De plus, notre méthode minimise la reconnaissance aspécifique car le fluorochrome est à l'intérieur de la bille. La méthode des Billes s'applique uniquement aux LB (absence de reconnaissance par les LT) et le couplage des protéines aux billes est standardisé pour tous les antigènes. Dans le cas du HLA par exemple, plusieurs antigènes peuvent être détectés en même temps. De nombreux Ags ont été testés (HLA, MOG, EBNA1, TT) mettant en évidence un vaste domaine d'application, la vaccination, les maladies auto-immunes et la transplantation. De plus, l'utilisation de la cytométrie nous permet de cibler les populations à étudier ou d'étudier toutes les sous-populations impliquées dans la reconnaissance antigénique dans le compartiment B. Cependant, il serait important de savoir si les LB isolés par notre méthode produisent des anticorps spécifiques de l'Ag testé. Pour cette partie, nos résultats encourageants sur le tri des complexes billes-LB vont nous permettre de tester la différenciation des cellules isolées en plasmocytes et la production d'anticorps. En effet, nous arrivons à enrichir la fraction de rosettes de 0.5 % à 30%. La limite de cette méthode reste le faible nombre de cellules d'intérêt pouvant limiter des études ambitieuses comme l'identification de sous-populations très faiblement représentées.

Les LB reconnaissent un Ag par leur BCR, cette reconnaissance intervient dès les premiers stades de développement. Ce mécanisme est physiologique et nécessite des contrôles bien précis permettant de maintenir l'homéostasie. Bien caractériser la population autoréactive et les mécanismes associés pourrait permettre de formuler des hypothèses et de mieux comprendre les maladies autoimmunes. Dans l'étude de Wardemann sur les LB autoréactifs, les auteurs suggèrent que ces LB sont à l'origine des anticorps naturels retrouvés pendant la réponse immune innée (Baumgarth et al., 1999) bien que leur persistance peut engendrer les destructions observées au niveau des tissus dans les maladies auto-immunes (Wardemann et al., 2003). D'autres études montrent que les mécanismes de tolérance des LB autoréactifs peuvent être impliqués dans les maladies auto-immunes. En effet, Yurasov a retrouvé une fréquence élevée de LB autoréactifs et polyréactifs dans le compartiment B matures naïfs des patients lupiques par rapport aux témoins. Ils suggèrent que cette augmentation montre un

défaut des points de contrôle due à une altération du signal BCR et des mécanismes liés à ce signal (Yurasov et al., 2005). Une étude récente a mis en avant l'étude des B autoréactifs dans la SEP en utilisant la méthode mise au point par l'équipe de Wardemann permettant d'étudier l'autoréactivité des LB à tous les stades du développement (Tiller et al., 2008). Ils ont inclus 7 patients rémittents non-traités et 11 témoins (Kinnunen et al., 2013). Ils retrouvent une fréquence identique de LB transitionnels autoréactifs entre patients et témoins mais une fréquence élevée de LB matures naifs autoréactifs dans le sang des patients par rapport aux témoins sains. Ces résultats suggèrent un défaut du second point de contrôle en périphérie. Les auteurs ont étendu l'étude en caractérisant le phénotype de ces LB autoréactifs. Ils montrent un phénotype différent des LB matures naifs des témoins, avec une absence de molécule d'activation CD80, CD86 mais une augmentation de l'expression du CD69 (autre marqueur d'activation). De plus, ces LB autoréactifs reconnaissent aussi des extraits de la substance blanche (Kinnunen et al., 2013). Cette étude montre l'implication des LB autoréactifs dans la SEP.

L'auto-réactivité des LB n'est pas beaucoup étudiée dans la SEP. Nous avons utilisé la méthode des billes fluorescentes pour caractériser les lymphocytes B reconnaissant la MOG dans la SEP. Nous avons observé une diminution de la fréquence (36%) des LB reconnaissant la MOG dans le sang des patients atteints d'une SEP de forme rémittente (n=38) par rapport aux témoins sains (n=50). Le nombre important d'individus testés réduit la variabilité observée sur les échantillons humains et l'utilisation d'antigènes contrôles renforce ce résultat. Bien qu'il existe une autre étude ayant évalué la fréquence des LB spécifiques de la MOG dans le sang des patients (n=9) (Harp et al., 2010), nous sommes les premiers à trouver une diminution de cette population en périphérie.

Dans la SEP, les antigènes n'ont pas encore été identifiés. La majorité des études concernent des antigènes dérivés de la myéline (Sospedra and Martin, 2005) bien que l'identification d'antigènes viraux (Virtanen et al., 2013) ou d'autres origines (Srivastava et al., 2012) reste possible. Le choix de la MOG reste judicieux car la MOG est souvent utilisée pour induire une EAE, et de façon intéressante la MOG humaine induit une EAE sévère avec une forte production d'anticorps (Oliver et al., 2003). C'est aussi la seule protéine de la myéline uniquement exprimée dans le SNC et sa localisation à la surface de la myéline fait de cette protéine une cible potentielle (Johns and Bernard, 1999). La MOG reste donc un bon candidat comme Ag dérivé de la myéline pour identifier les LB auto-réactifs dans la SEP. D'autres antigènes peuvent être testés pour élargir l'étude. En effet, plusieurs études plaident en

fonction d'un lien entre l'infection à EBV et la SEP (Pender, 2011) et l'EBNA1 est la seule protéine synthétisée par le virus EBV durant la réplication (Pender, 2011). De plus, un titre élevé d'anticorps anti-EBNA1 est retrouvé chez les patients SEP (Levin et al., 2005). La caractérisation des LB spécifiques de l'EBNA1 pourrait aider à la compréhension du lien entre EBV et la SEP. Nous pourrions aussi tester l'antigène Kir4.1 pour étudier s'il y a un lien entre la production d'anticorps retrouvée récemment (Srivastava et al., 2012) et les LB anti Kir4.1 circulants.

Pour expliquer cette diminution, nous avons évalué l'apoptose et la migration dans le SNC des BBR-MOG. Aucune de ses approches ne nous permet d'expliquer la baisse observée chez les patients. L'apoptose des LB est très importante dans le SNC comparée aux organes lymphoïdes secondaires (OLS) des souris EAE immunisées avec la MBP et surtout avant le début d'une phase de rémission (White et al., 2000). On pourrait penser aussi que l'apoptose pourrait être plus forte dans les OLS comparé au sang, réduisant ainsi le nombre de BBR-MOG chez les patients SEP. Les BBR peuvent aussi avoir subi une autre sélection différente de l'apoptose, comme le *receptor editing* par exemple au niveau des OLS. Les LB sont des cellules qui subissent de nombreuses sélections au cours de leur développement et ces mécanismes peuvent être altérés dans les maladies auto-immunes (Yurasov et al., 2005). Enfin, l'utilisation d'un modèle de BHE *in vitro* ne rend pas compte des processus dynamiques et des interactions complexes qui ont lieu dans l'organisme. En effet, selon le contexte inflammatoire (cytokines et chimiokines) la perméabilité de la barrière peut être modifiée (Larochelle et al., 2011). L'absence de différence de transmigration entre patients et témoins pourrait être due aux conditions non-inflammatoires de la BHE utilisées lors du test qui fut en outre réalisé sans tenir compte de l'effet des forces de cisaillement. Le modèle HCMEC reste un bon modèle pour l'étude de la transmigration *in vitro* (Daniels et al., 2013). Aucune différence phénotypique n'a été retrouvée entre patients atteints de SEP et témoins sains. Les BBR-MOG sont en majorité des cellules naïves bien qu'il y ait des cellules mémoires (et mémoires switchées) dans les BBR-MOG. Il faudrait ainsi élargir l'étude phénotypique pour mieux caractériser cette population : l'état d'activation des BBR-MOG en utilisant des marqueurs comme CD40L, CD80, CD86, HLA-DR serait utile. La population B1 est suspectée d'intervenir dans la pathogénèse de maladies auto-immunes telles que le Lupus ou la Polyarthrite Rhumatoïde. Récemment, une étude a montré une baisse (29%) de ces cellules dans le sang des patients SEP (Tørring et al., 2013) mais cette diminution n'explique pas celle obtenue dans notre étude car la sélection des LB que nous effectuons élimine les

cellules CD43⁺ qui sont majoritaires dans les B1. Chez l'homme, le marqueur CD5 serait également associé à des propriétés autoréactives (Berland and Wortis, 2002) et constitue un marqueur de B régulateurs (Mauri and Bosma, 2012; Yanaba et al., 2008). De plus, Villar et al, retrouvent un risque plus important de développer une SEP et un nombre plus important de poussées chez les patients présentant un taux élevé de CD5⁺(Villar et al., 2011). Dans notre étude, la fraction BBR-CD5⁺ est représentée de façon égale entre les groupes étudiés et correspond au fréquence retrouvée dans la population B, ce qui est concordant avec les résultats de la littérature (Niino et al., 2009).

Les BBR-MOG « restantes » ne semblent pas avoir une importance dans la Maladie car elles sont retrouvées chez les témoins sains et ne présentent aucune différence phénotypique et fonctionnelle (Transmigration). Mais pour confirmer cette conclusion, Il faudrait savoir quelles actions ont les LB anti-MOG sur les T. Comme le montrent certaines études sur EAE (Bettelli et al., 2006) et dans la SEP (Harp et al., 2010) la coopération B et T est très importante. L'exploration transcriptionnelle que nous mettons en place à partir de BBR enrichies (~30%) nous permettra d'affiner la caractérisation de ces cellules. Cette étude nous permettra de tester différentes voies d'activation : l'expression du CD20, les molécules d'activation (CD40L, CD80, CD86), des molécules de homing (CXCL13, LFA1, VLA4), de différenciation (BLIMP1), les cytokines (IL-6, IL-10), le BCR (Btk) et l'apoptose (Fas).

Les différentes hypothèses testées à ce jour ne permettent pas de comprendre cette diminution de LB reconnaissant la MOG chez les patients SEP. D'autres hypothèses sont envisagées et vont constituer les perspectives de ce projet :

Nous pouvons penser que les LB spécifiques de la MOG chez les patients se sont différenciés en plasmocytes (CD19⁻CD138⁺), entraînant des modifications de la reconnaissance de la MOG par le BCR. Pour explorer cette hypothèse, il faudrait isoler les BBR-MOG et induire *in vitro* leur différenciation en plasmocytes. Ainsi il serait possible d'évaluer si, chez les patients, les BBR-MOG se différencient plus facilement en plasmocytes. En parallèle, nous pouvons doser les anticorps anti-MOG dans le sérum des patients atteints de SEP en utilisant les billes fluorescentes recouvertes de MOG et comparé ce taux d'anticorps à celui des témoins sains. Le taux d'anticorps anti-MOG dans le sérum de patients pourrait être un argument en faveur de la différenciation.

Le LB peut sécréter des cytokines, en fonction des stimulations et de l'environnement (Doster et al., 2013; Duddy et al., 2004; Fillatreau et al., 2008). Des expériences préliminaires de stimulations réalisées chez le sujet sain ont montré une diminution des BBR-MOG après une

activation polyclonale (PMA, ionomycine, CD40L, Fab'2) alors même que le nombre de lymphocytes B ne varie pas. Cette diminution est maximale lorsqu'on rajoute de l'ODN (activation passant par le TLR9) à la stimulation. Nous pouvons penser que des anomalies encore non caractérisées peuvent mimer l'activation polyclonale et modifier la reconnaissance LB-MOG dans la SEP.

Les lésions caractéristiques de la SEP sont observées au niveau du SNC faisant de ce dernier le meilleur compartiment pour comprendre les mécanismes liés à l'auto-réactivité. Il est fondamental d'essayer de développer une technique permettant de repérer les LB reconnaissant la MOG au sein du SNC. Dans le cas où l'on repèrerait les LB spécifiques de la MOG dans le cerveau, une analyse immunohistologique poussée pourrait permettre de connaître leur localisation dans la lésion, leur état d'activation et d'identifier les cellules avoisinantes pour mettre en évidence des coopérations cellulaires. De plus, la microdissection laser pourrait permettre d'isoler chacune de ces cellules et de les étudier au niveau transcriptionnel.

Ma thèse a permis de bénéficier d'une nouvelle méthode d'analyse des LB spécifiques d'un Ag. Cette méthode simple récemment mise au point (Degauque, Elong Ngonon et al, soumis) est applicable dans plusieurs domaines et pourrait être utilisée pour de nombreux antigènes. Dans la SEP, cette méthode nous a permis de mettre en évidence pour la première fois, une diminution des LB spécifiques de la MOG en périphérie chez les patients rémittents. De plus, nous avons pu quantifier la fréquence intrathécale des LB spécifiques de la MOG. Les hypothèses que nous avons testées ne nous permettent pas de comprendre cette diminution mais les résultats obtenus permettent de caractériser les LB spécifiques de la MOG dans un premier temps.

ANNEXES



REVIEW

Frequency of circulating autoreactive T cells committed to myelin determinants in relapsing–remitting multiple sclerosis patients

Annie Elong Ngono ^{a, b, c, 1}, Ségolène Pettré ^{a, b, c, 1}, Marion Salou ^{a, b, c},
 Bouchaib Bahbouhi ^{a, b, c}, Jean-Paul Soulillou ^{a, b, c, *},
 Sophie Brouard ^{a, b, c, 1}, David-Axel Laplaud ^{a, b, c, d, e, 1}

^a INSERM, UMR 643, Nantes, F44093, France

^b CHU Nantes, Institut de Transplantation et de Recherche en Transplantation (ITERT) Nantes, F44000, France

^c Université de Nantes, Faculté de Médecine, Nantes, F44000, France

^d INSERM CIC004, University Hospital, Nantes, F44093, France

^e Department of Neurology, CHU Nantes, F44093, France

Received 29 February 2012; accepted with revision 24 May 2012

KEYWORDS

Multiple sclerosis;
 T cells;
 Autoreactive;
 Antigen presentation;
 Troglodytes

Abstract Multiple sclerosis (MS) is considered as an autoimmune disease in which T cell reactivity to self-antigens expressed in the brain, particularly myelin antigens, plays a pivotal role. Various myelin-derived peptides, including peptides of myelin basic protein (MBP), proteolipid protein (PLP) and myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG) have been studied as putative target in MS. However, CD4⁺ and CD8⁺ T cells recognizing autoantigens from brain have been detected in the blood of MS patients as well as the blood of normal individuals. Here we review and discuss studies focused on the assessment of the frequency of autoreactive T cells responding to a given antigen using different assays including LDA, IFN- γ -ELISPOT and TRAP (T cell Recognition of Antigen Presenting Cells by Protein transfer) in MS.

© 2012 Elsevier Inc. All rights reserved.

Contents

1. Introduction	118
2. Assessment of autoreactive T cell frequency using Limiting Dilution Assay	118

* Corresponding author at: INSERM UMR 643, 30 Boulevard J Monnet, 44093 Nantes Cedex 1, France.

E-mail address: jean-paul.soulillou@univ-nantes.fr (J.-P. Soulillou).

¹ These authors have similarly contributed.

2.1. Autoreactive precursor frequency in unstimulated fresh T cells in MS	118
2.2. Estimation of precursor frequency after stimulation	120
3. Analysis of autoreactive T cell frequency using the ELISPOT assay	121
3.1. Analysis of precursor frequency without prestimulation	121
3.2. ELISPOT estimation of precursor frequency following <i>ex vivo</i> culture	122
4. What is the importance of the HLA type on anti-myelin T cell frequency?	123
5. Next generation methods to detect myelin specific T cells in MS	123
5.1. Peptide/MHC multimers	123
5.2. CFSE-based flow cytometry	124
5.3. Measurement of autoreactive T cell frequency using protein transfer assay	124
6. Conclusion	124
Conflict of interest statement	125
References	125

1. Introduction

Despite strong evidence of the inflammatory nature of multiple sclerosis (MS) such as the presence of T cell and monocyte/macrophage infiltrates at the border or within the active lesions, the autoimmune etiology of the disease is still a subject of debate [1,2]. According to current hypotheses, mainly based on the animal model (Experimental Autoimmune Encephalitis, EAE), MS is considered in many aspects as an autoimmune disorder. In this disease, T cell reactivity to self-antigens expressed in the brain, particularly myelin-derived peptides, plays an essential role in disease progression and possibly as an exclusive etiology. The current physiopathological concept supporting this hypothesis in MS is based on the presence of activated and memory autoreactive T cells directed against myelin components within the peripheral blood. Autoreactive T cells from the blood of MS patients are able to transmigrate the Blood Brain Barrier (BBB) endothelium and may gain access to the Central Nervous System (CNS) and trigger, or contribute to, demyelinating lesions and axonal insult [3–5]. The main target in MS remains unknown but several myelin antigens, including myelin basic protein (MBP), proteolipid protein (PLP) and myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG) have been studied.

Both CD4⁺ [6] and CD8⁺ [6–8] circulating T cells recognizing sequestered autoantigens such as MBP and PLP have been demonstrated in normal individuals and in MS patients. Using different informative approaches such as tissue culture based techniques [9,10], quantitative polymerase chain reaction [11,12], flow cytometry [13] or tetramers [14], many teams have tried to demonstrate a higher frequency of MBP, MOG and PLP autoreactive CD4⁺ and/or CD8⁺ T cells in the blood of MS patients compared to healthy individuals. Several groups, including our own [15], have shown no difference in terms of the number of circulating autoreactive T cells in MS compared to age and gender-matched healthy controls [16,17]. However, other groups have also suggested an increased frequency of autoreactive T cells committed to myelin determinant in the blood of MS patients [18–20]. Thus, whether a higher number of myelin-specific T lymphocytes prevails in the peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of MS patients in comparison to healthy volunteers (HV) is still a debated question. Furthermore, qualitative differences have been observed leading to the concept that MS patient's circulating autoreactive T cells

may have a different activation state than healthy individuals [21,22] allowing more promiscuous BBB transmigration [5,23]. However, beside the traditional view of an enhanced activated state of autoreactive T cells, another possibility, which is not exclusive, is that myelin reactive T cells are present in a greater amount in patients than in controls, beyond a threshold that could lead to the disease process.

Here, we will review the reports on the frequencies of autoreactive T cells in MS and in particular, we will discuss the results in the context of the traditional methods such as Limiting Dilution Assay (LDA) or Enzyme Linked ImmunoSPOT (ELISPOT) assay. We will then describe the next generation methods and particularly a new method based on the trogocytosis phenomenon (Fig. 1) reassessing the frequency of cells responding to a given antigen without knowledge of the peptide antigens, the restricting MHC molecule, or the type of cytokine produced [24].

2. Assessment of autoreactive T cell frequency using Limiting Dilution Assay

There has been a longstanding effort to characterize myelin autoreactive cells in MS. T cells with high affinity receptors recognizing MBP and PLP are part of the normal T cell repertoire and are present in the blood of MS patients as well as in healthy individuals. Most of the studies based on the establishment of MBP-specific T cell lines show similar low frequencies of 1 in 10⁵–10⁶ T cells in both groups [9,10,25].

2.1. Autoreactive precursor frequency in unstimulated fresh T cells in MS

First of all, Limiting Dilution Assay (LDA) was the first method used to assess the precursor frequency of antigen responsive T cells. LDA allows detecting an all-or-none (positive or negative) immunoreponse in a dose-dependent manner that varies in the number of responder cells tested. This procedure requires *in vitro* culture and, depending on the readout, implies a selection of cells with preferential properties (for instance: proliferating cells rather than cells that respond by producing effector molecules). Therefore, the frequency of anti-myelin reactive T cells *in vivo* is potentially much higher than the frequency found from

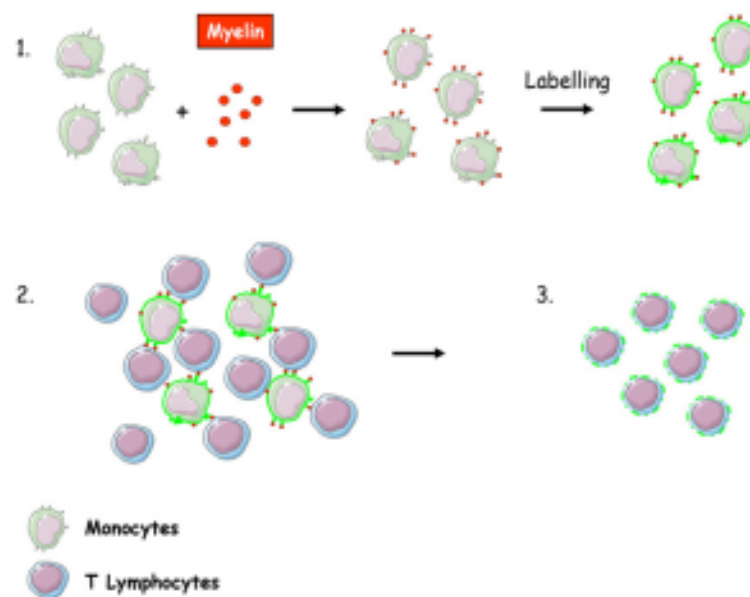


Figure. 1 Trogocytosis between myelin loading monocytes and autologous lymphocytes T. 1. Purified monocytes were incubated with myelin antigens. They were then labeled with fluorochrome conjugated antibodies. 2. Memory T lymphocytes were mixed with labeled monocytes. 3. At the end of the incubation, myelin-loaded monocytes had exchanged labeled plasma membrane proteins with autoreactive T lymphocytes. These lymphocytes were analysed for monocyte-fluorescence acquisition.

proliferation-based techniques only. The frequency of positive cultures is dependent on the number of precursors in the culture well that gave a positive response. The negative response demonstrates that there are no precursors of a given specificity. Evaluation of the cell frequency in the original population is possible by determining the number of cultures that are negative in the experiment. The percentage of negative cultures is then converted to its negative logarithm and plotted graphically. In addition, the LDA technique, which requires sophisticated experimentation and a relatively large amount of blood lymphocytes, makes it difficult to study the T cell frequencies of various myelin reactive T cell populations in individual patients. In the following paragraphs we will discuss the studies using LDA to evaluate T cell frequency in MS. All data about these studies are summarized in Table 1. Chou and colleagues used LDA to determine the frequency of MBP and PLP peptide specific T cells in blood from eight MS patients (stable relapsing–remitting MS patients – RRMS – and MS patients with chronic progressive disease) and six HV [21]. PBMC were cultured with whole MBP (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) or PLP_{139–151} (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$). While circulating MBP reactive T cells from MS patients had a mean frequency of 0.61 cells per 10^5 PBMC, significantly higher than that of normal individuals (0.10 cells per 10^5 PBMC), this frequency was still extremely low. In contrast, no difference was found in circulating T cell frequencies committed to PLP_{139–151} [21].

Using the same method, Jingwu and colleagues analyzed the frequency of blood CD4⁺ T cells reactive to whole MBP (40 $\mu\text{g}/\text{ml}$) in eight MS patients and four HV. However, no information was available on the treatment and disease state at the time of sampling. MBP specific T cells occurred with mean frequencies below 1 cell per 10^6 PBMC together in MS patients and HV without significant difference [16].

Zhang and colleagues [22] reported the frequencies of myelin reactive T cells using MBP (40 $\mu\text{g}/\text{ml}$) or PLP (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) proteins. Frequencies of MBP reactive T cells were similar in 19 MS patients (1.1 per 10^6 PBMC) and 17 HV (0.9 per 10^6 PBMC) [22]. In the same study, similar results were found for PLP reactivity [22].

Pender et al. have tested the peripheral blood T cell response to different myelin class II restricted peptides: PLP_{41–58}, PLP_{184–199}, PLP_{190–209}, MBP_{82–100} (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) and to MBP protein (30 $\mu\text{g}/\text{ml}$) using LDA, in five patients with RRMS and four HV. These patients received no treatment at the beginning of the study but three of them started IFN β therapy during the study and two received steroid treatments for a relapse. T cell frequencies for PLP_{41–58} were significantly higher in MS compared to HV (1.34 in MS vs 0.7 in HV per 10^5 PBMC, $p=0.019$) and a tendency was observed for PLP_{184–199} (2.0 MS vs 0.93 HV per 10^5 PBMC, $p=0.084$). The mean frequencies of T cells reacting to the 41–58 and 190–209 PLP residues were also significantly higher in MS patients than in HV. However, the mean frequencies of T cells reactive to PLP_{184–199}, MBP_{82–100} or whole MBP in MS patients were not significantly different to those of HV [18]. Results obtained for PLP_{190–209}, MBP_{82–100} and MBP are summed up in Table 1.

Tejada-Simon et al. also compared MBP and PLP reactivity in RRMS patients ($n=11$), chronic progressive MS ($n=5$) and HV ($n=9$) [26]. The patients did not receive immunosuppressive or modulating agents before the study. T cells recognizing whole human MBP (40 $\mu\text{g}/\text{ml}$) were tested and found not to be statistically significant between patients and controls. T cell responses to a complete panel of overlapping peptides of PLP were also tested in MS patients ($n=15$) and HV ($n=9$). Synthetic peptides of MBP and PLP were used at a

Table 1 Autoreactive T cell frequencies in peripheral blood from MS patients (NS: No significant difference; ND: not determined; RR: relapsing–remitting; SP: secondary progressive form; PP: primary progressive form).

	References	Number of patients and controls	Similar autoreactive T cell frequency	Higher autoreactive T cell frequency in MS	p	
LDA	Chou et al. [21]	MS=8, HV=6	PLP ₁₃₉₋₁₅₁	Whole MBP	<0.01 NS	
	Jingwu et al. [16]	MS=8, HV=4	Whole MBP		NS	
	Zhang et al. [22]	MS=19, HV=17	Whole MBP		NS	
			Whole PLP		NS	
	Pender et al. [18]	MS=5, HV=4	Whole MBP		NS	
			MBP ₈₂₋₁₀₀		0.39	
			PLP ₁₈₄₋₁₉₉		0.084	
				PLP ₄₁₋₅₈	0.019	
				PLP ₁₉₀₋₂₀₉	0.003	
		Tejada-Simon et al. [26]	MS=11, HV=9	Whole MBP		NS
			Synthetic MBP peptides		ND	
			Synthetic PLP peptides		NS	
	Van der Aa et al. [27]	MS=9, HV=5	MOG ₁₋₂₂ +MOG ₃₄₋₅₆ +MOG ₆₄₋₈₆ +MOG ₇₄₋₉₆		NS	
IFN γ ELISPOT	Olsson et al. [14]	MS=36, OND=41		Whole MBP	<0.001	
				MPB ₁₃₂₋₁₅₀	<0.001	
				MBP ₁₇₄₋₁₉₁	<0.001	
				Whole PLP	<0.001	
				Whole MOG	<0.05	
				MBP ₈₀₋₁₀₂	<0.01	
				Synthetic MOG peptides	<0.05	
				Synthetic PLP peptides	0.022	
					NS	
					NS	
					NS	
		Andersson et al. [35]	MS=26, OND=40	Whole MBP		<0.01
				Whole MOG		<0.05
				Synthetic myelin peptides		NS
						NS
				Whole MAG	<0.01	
				Whole MBP	<0.05	
			MAG ₂₀₋₄₀		NS	
			MAG ₄₁₋₆₃		<0.05	
			MAG ₂₄₁₋₂₆₀		NS	
			MAG ₅₉₆₋₆₁₂		<0.05	
			MAG ₆₀₉₋₆₂₆		NS	
	Van der Aa et al. [27]	MS=15, OND=8	whole MOG		NS	
	Niland et al. [39]	MS=14, OND=8		Whole transaldolase	$2.3 \cdot 10^{-8}$	
				Transaldolase peptide	$2.4 \cdot 10^{-6}$	
	Ratts et al. [31,51]	MS=12, OND=9		MBP ₈₃₋₁₀₆ +MBP ₁₁₁₋₁₂₉ +MBP ₁₄₃₋₁₇₁	ND	
	Berthelot et al. [15]	MS=27, OND=19	Synthetic myelin peptides		NS	

concentration of 12 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Again, no statistical difference was reported between MS patients and HV [26].

In another study, Van der Aa et al. tested blood samples from nine MS patients (RRMS and with a progressive disease course) and from five HV with a mixture of four synthetic class II-restricted MOG peptides (MOG₁₋₂₂, MOG₃₄₋₅₆, MOG₆₄₋₈₆ and MOG₇₄₋₉₆; 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ each) [27]. The frequency of MOG-reactive T cells was similar in both groups studied (13.3 cells per 10^7 PBMC from MS patients and 14.2 cells per 10^7 PBMC from HV) [27].

2.2. Estimation of precursor frequency after stimulation

Due to the low number of cells obtained in Cerebrospinal Fluid (CSF) samples, Chou and colleagues evaluated the myelin responding T cell frequencies after IL2 and IL4 stimulation [21]. Nine MS patients (three RRMS and six with chronic progressive disease) and six controls with other neurological diseases (OND) were tested. Firstly, CSF cells were expanded with a medium containing IL2 and IL4 (50 U/ml for each).

Myelin T cell specificity for MBP protein and a PLP class II-restricted peptide was then tested. The estimated frequency of CSF T cells specific for MBP among MS patients was 22.1 cells per 10^5 CSF cells and 9.5 cells per 10^5 CSF cells for PLP₁₃₉₋₁₅₁. These frequencies were significantly higher than those observed in the CSF of OND controls [21].

Zhang and colleagues also used an IL2 prestimulation step on PBMC and CSF cells before measuring MBP reactivity. T cells were stimulated by two rounds of IL2 (40 U/ml). In MS patients, CSF T cells exhibited a higher frequency than blood T cells (5.4 cells per 10^5 CSF cells vs 0.32 cells per 10^5 PBMC; $p < 0.001$). Besides, after the same treatment, the frequency of MBP specific CSF T cells was significantly higher in MS patients (5.4 cells per 10^5 CSF cells) compared with OND patients (0 cells per 10^5 CSF cells) [22].

In conclusion, as shown in Table 1, only two studies showed a significantly higher frequency of T cells committed to myelin derived antigen in MS vs HV using LDA. One of both used whole MBP [21] and the second one obtained significantly higher PLP-specific T cell frequency in MS using two synthetic class II-restricted peptides: PLP₄₁₋₅₈ and PLP₁₅₀₋₂₀₉ [18]. On the opposite, most LDA studies [16,22,26,27] did not show any difference in terms of autoreactive T cell frequencies between MS patients and HV (Table 1). Interestingly, Bieganowska et al. [28] suggested that the LDA might underestimate the frequency of circulating autoreactive T cells. Indeed, they observed that the frequency of anti-MBP₈₅₋₉₉ T cells was much higher using a T cell receptor sequence-based approach than LDA assay (1 in 300 vs 1 in 10^5 - 10^6 PBMC respectively) [28]. However, myelin autoreactive T cells from MS patients seem to be more sensitive to IL2 stimulation, suggesting an increased expression of high affinity IL2 receptor. Therefore, rather than differences in frequency, the activation threshold and possibly function of reactive T cells might be different in MS patients and controls.

3. Analysis of autoreactive T cell frequency using the ELISPOT assay

3.1. Analysis of precursor frequency without prestimulation

ELISPOT assays have been more extensively used to quantify myelin-derived antigen responding T cells that secrete IFN- γ . A major advantage of ELISPOT is its technical simplicity and reproducibility, which does not require *in vitro* proliferation. In addition, only small numbers of cells are needed, making it possible to simultaneously analyze T cell reactivity to a whole range of myelin antigens. Moreover, measurement of the IFN- γ secretion as a readout for T cell reactivity may be especially relevant to MS studies as this cytokine is thought to play an essential role in the disease process [29]. However, one of the limitations is that ELISPOT is based on the secretion of only one or a few cytokines and excludes cells that may secrete other types of cytokines. We will explore in this paragraph the studies using ELISPOT assay to determine T cell frequency in MS. All studies included in this part are summed up in Table 1.

Olsson and colleagues [14] collected blood and CSF samples from 39 untreated MS patients and OND as controls

(16 patients with acute meningitis and 25 patients with tension headache). In their study, PBMC were used at 2×10^5 cells per well and CSF cells at $5-20 \times 10^3$ cells per well. The cells were pulsed with whole MBP, whole PLP, or MBP class II-restricted peptides (MBP₁₃₂₋₁₅₀ or MBP₁₇₄₋₁₉₁ at a final concentration of 10 μ g/ml). After 48 h of culture, 2.7 out of 10^5 PBMC of MS patients responded to whole MBP, 5.2 out of 10^5 PBMC responded to MBP₁₃₂₋₁₅₀, 4.9 out of 10^5 PBMC responded to MBP₁₇₄₋₁₉₁, and 4.7 out of 10^5 PBMC responded to PLP. Frequencies of these autoreactive T cells were significantly increased as compared to controls ($p < 0.001$ for each tested antigen) [14]. In the same study, Olsson et al. also estimated autoreactive T cell frequencies in CSF cells. Due to the limited number of CSF cells available, only MBP-reactive specific T cells were examined. The authors found that 185 out of 10^5 CSF cells responded to whole MBP in MS patients while few cells responded in OND. They conclude that T cells autoreactive to different myelin components are significantly increased in the PBMC of MS patients and are also strongly enriched in the CSF of these MS patients compared with the OND control groups [14].

Another way to characterize the peripheral lymphocytes in MS is to analyse the skewing of the complementarity-determining region 3 length distribution (CDR3-LD) of the T cell receptor (TCR) variable β chain (V β). Some studies have focused on MBP specific T cells, showing a preferential use of certain V β genes [30]. In this context, IFN- γ -ELISPOT assays were performed with T cells from seven V β families with an altered CDR3-LD from seven MS patients and three HV [6]. Irradiated PBMC mixed with human MBP (20 μ g/ml) serving as antigen presenting cells (APC) were incubated with sorted T cells for 24 h. In presence of whole MBP, IFN- γ -ELISPOT scores were significantly increased for the altered V β families in MS patients as compared to HV ($p < 0.05$) [6].

More recently, Ratts and colleagues examined the frequency of blood T cell committed to class II-restricted synthetic MBP peptides in 12 MS patients (six RRMS and six PPMS) and nine HV. In their work, PBMC at 5×10^5 cells per wells were incubated for 36 hours with 50 μ g/ml MBP peptides (MBP₈₃₋₁₀₆, MBP₁₁₁₋₁₂₉ and MBP₁₄₃₋₁₇₁). The highest frequency of myelin reactive T cells was observed in MS patient [31].

Other myelin proteins have also been investigated with ELISPOT assay. Sun et al. have studied MOG reactive T cells in the CSF and the blood from 16 untreated MS patients and 18 OND controls (mainly aseptic meningitis and tension headache) [32]. IFN- γ -ELISPOT assays were performed with CSF cells at 4 to $10 \cdot 10^3$ cells per wells or PBMC at 2×10^5 cells per well and stimulated with MOG (10 μ g/ml) for 48 h. The mean value of MOG reactive T cells in MS patients was significantly increased compared to controls (22.1 per 10^5 PBMC in MS patients vs 7.6 per 10^5 PBMC in controls, $p < 0.05$). Similarly, mean values of autoreactive T cells in CSF were also increased in MS patients as compared to controls (804 per 10^5 cells and 346 per 10^5 cells, respectively). This suggested an increased frequency of anti-MOG T cells in the blood and in the CSF of MS patients [32].

In order to investigate the fine specificity of MOG T cell reactivity, Wallström and colleagues performed IFN- γ -ELISPOT on blood T cells with synthetic overlapping MOG class II peptides from 20 untreated MS patients and 14 HV with the MS-associated HLA haplotype DR2 [20]. Significant differences

were seen between patients and controls for the peptide MOG₆₃₋₈₇ (3.5 specific IFN γ secreting cells per 10⁵ PBMC in MS patients vs 0.3 in HV) after a 40-h culture step [20].

Other laboratories have studied the responses to different peptides from different myelin proteins. Pelfrey et al. examined reactivity using peptides spanning the entire PLP molecule [33]. In this work, MS patients (n=22) with RRMS (n=9), secondary progressive (SPMS, n=8) or primary progressive (PPMS, n=5) diseases were compared with 22 HV. Some patients were treated with immunomodulatory drugs (IFN β or glatiramer acetate) during the study. PBMC at 1.5 \times 10⁵ cells per well were incubated for 24 h with 7 μ M PLP nonamer peptides, which can bind extracellularly to class I molecules and stimulate CD8⁺ T cells. Although class II molecules preferentially bind longer peptides, nonamer peptides are also able to bind MHC class II molecules and to stimulate CD4⁺ T cells. The frequency of IFN γ positive T cells elicited by the PLP peptide pool was four times higher in MS patients than in HV (6.5 \pm 1.7 vs 1.5 \pm 0.6 respectively; *p*=0.022). However, no difference was observed between MS and HV when using IL5-ELISPOT assays (1.5 \pm 0.8 vs 0.6 \pm 0.4 respectively) [33].

Hellings et al. [17] have also analysed the T cell reactivity to MBP, to MOG, and to a panel of synthetic MBP, MOG and PLP peptides in 36 MS patients and 31 HV using IFN γ -ELISPOT. The MS group was composed of patients with RRMS (n=24) or a progressive disease course (n=12). In their work, PBMC at 2.10⁵ cells per well were incubated in a 20-h ELISPOT assay in the presence of MBP (40 μ g/ml), MOG (10 μ g/ml), or synthetic myelin class II-restricted peptides (MBP₈₄₋₁₀₂, MBP₁₄₃₋₁₆₈, MOG₁₋₂₂, MOG₃₄₋₅₆, MOG₆₄₋₈₆, MOG₇₄₋₉₆, PLP₄₁₋₅₈, PLP₁₈₄₋₁₉₉, and PLP₁₉₀₋₂₀₉; 10 μ g/ml). The mean frequency of MBP reactive T cells was similar for MS patients (4.1 \times 10⁻⁵) and HV (4.4 \times 10⁻⁵). The frequency of anti-MOG T cells was also similar for both groups (4.0 per 10⁵ PBMC in MS patients vs 4.2 per 10⁵ PBMC in HV). No significant difference was observed between MS patients and control subjects to any of the myelin peptides tested [17].

MOG specific T cell frequency was also assessed in 15 MS patients (including RRMS and patients with a progressive disease course) and eight HV by Van der Aa et al. [27]. In their work, PBMC (2 \times 10⁵ per wells) were incubated with the MOG protein (10 μ g/ml) in a 20-h ELISPOT assay. The frequency of MOG reactive cells was not statistically different between patients and controls (14.7 cells per 10⁵ PBMC in MS patients vs 12 cells per 10⁵ PBMC in HV) [27].

Myelin associated glycoprotein (MAG) is a minor component of myelin which counts for less than 1% of the total myelin proteins in the CNS. It is also present, but in lower proportion, in the peripheral nervous system [34]. As shown in Table 1, Andersson and colleagues [35] examined the T cell response to MAG or five selected MAG peptides of 16 and 20 amino acids to elicit CD4⁺ responses. Eleven of the MS patients were tested during disease exacerbation and 15 patients were tested during remission. Two control groups consisting of 23 patients with OND and 17 HV were also tested. PBMC (2 \times 10⁵ per wells) were added with either whole MAG or MBP, or MAG peptides (MAG₂₀₋₄₀, MAG₄₁₋₆₃, MAG₂₄₁₋₂₆₀, MAG₅₉₆₋₆₁₂ and MAG₆₀₉₋₆₂₆) in a 48-h ELISPOT assay. MS patients had significantly higher numbers of MAG reactive T cells in peripheral blood than HV (2.5 per 10⁵ PBMC in MS patients vs 0.6 per 10⁵ PBMC in HV). Similar results were obtained for MBP (2.2 per 10⁵ PBMC in MS

patients vs 0.6 per 10⁵ PBMC in HV). MS patients also had higher numbers of T cells recognizing three MAG peptides (MAG₄₁₋₆₃, MAG₅₉₆₋₆₁₂ and MAG₆₀₉₋₆₂₆), with frequencies varying from 1 to 2 cells for 10⁵ PBMC in MS patients compared to 0.2 to 0.5 cells for HV [35].

Recently, our group has analysed fresh blood CD8⁺ T cell frequency committed to class I-restricted myelin derived peptides of 27 RRMS patients treated or not with immunomodulatory drugs and 19 HV [15]. In our work, PBMC (4 \times 10⁵ cells per wells) or purified CD8⁺ cells (4 \times 10⁴ cells per wells) were incubated with 10 μ g/ml peptides in a 15-h ELISPOT assay. PBMC from the two groups showed roughly similar autoreactive responses against the myelin peptide pool (MOG₇₄₋₈₁, MOG₉₇₋₁₀₅, MOG₂₂₅₋₂₃₂, PLP₂₀₂₋₂₁₀, MBP₂₄₄₋₂₅₂ and MBP₁₃₈₋₁₄₇) as well as to each tested peptide. The mean value of reactive T cell was 11 per 4 \times 10⁵ cells without difference between untreated or treated MS patients. Using purified CD8⁺ from five MS patients and two HV, we showed that only memory CD8⁺ T cells produced IFN γ in response to class I restricted peptides derived from myelin. Similar response was observed between MS patients and HV [15]. Finally, as Tranquilli et al. suggested that MS patients could present enhanced T cell responsiveness to citrullinated peptides from MBP [36], citrullinated peptides derived from MBP were tested but did not induce CD8⁺ T cell responses either in MS patients or HV [15].

3.2. ELISPOT estimation of precursor frequency following ex vivo culture

All previous studies were performed ex vivo with fresh cells but with different incubation times. Niland and colleagues analysed 14 patients with MS (RRMS or PPMS or SPMS) and eight patients with OND for transaldolase committed blood T cells after a prestimulation procedure. Transaldolase is expressed at high levels in oligodendrocytes and may be targeted by autoreactive T cells of MS patients [37]. The presence of transaldolase antibodies has also been described in the blood and in the CSF of MS patients [38]. In the work of Niland et al., PBMC at 2 \times 10⁵ cells per wells were prestimulated for 1 week with 5 μ g/ml of whole transaldolase or a class I HLA-A2 transaldolase peptide. Then, PBMC were tested for a 20-h ELISPOT assay either with protein or peptide. The frequency of IFN γ -producing T cells was significantly increased in HLA-A2⁺ MS patients (whole protein: 40.4 \pm 2.7 IFN γ spots per 10⁵ PBMC or peptide: 48.5 \pm 6.2 IFN γ spots per 10⁵ PBMC) compared to HLA-A2⁺ OND patients [39].

As previously outlined, LDA and ELISPOT assays are the two most common techniques that have been used to analyse the frequency of myelin reactive cells in MS. LDA is usually based on the proliferative response to myelin of autoreactive T cells whereas ELISPOT is based on the detection of cytokine secreting cells, usually memory cells according to test parameters or purified memory cells, upon antigen stimulation. Few reports compare the two techniques. Although the majority of the studies using these techniques did not reveal frequency differences between MS and controls, the number of myelin-responsive cells was underestimated by LDA [27]. Time of incubation and final concentrations of antigens differ between studies and may explain the discrepancies observed. In particular, the duration of incubation time in ELISPOT

assays may explain the differences observed in several studies. Indeed, differences were observed between patients and controls when the incubation times were longer. Since IL2 responsive myelin T cells might be more frequent in MS than in control subjects, longer incubation times may facilitate the proliferation of such T cells.

Another difficulty in interpreting differences in frequencies is related to the different clinical status of MS and control cohorts. Indeed, the MS cohorts in the different studies reported in this review are heterogeneous in term of disease types, treatment, and the cohorts are frequently small in size. Moreover, the control groups are not homogeneous with some authors using HV and others using OND patients.

4. What is the importance of the HLA type on anti-myelin T cell frequency?

Studies of T cell reactivity to myelin antigens have led to various and contradictory results. A possible explanation could be that anti-myelin reactivity differs among individuals due to disease heterogeneity or differences in genetic background particularly for the HLA molecules. Central in MS pathogenesis is the association and the linkage disequilibrium with HLA-DR2(15), -DQ6 (equals Dw2 or -DRB1*1501 -DRB5*0101 -DQA1*0102 -DQB1*0602) [40–42]. These data support the fact that autoreactive CD4⁺ T cells are implicated in the pathogenesis of MS. We tried to determine whether the HLA type of the individuals included in the studies have an implication on the precursor frequency of anti-myelin reactive T cells.

Although some studies included MS patients and HV characterized by their HLA-DR and HLA-DQ haplotypes [16,22], the authors were not able to conclude whether there was a link between the haplotypes and the frequency of autoreactive T cells.

Using LDA, Pender et al. [18] reported the frequency of reactive T cells to different myelin class II restricted peptides, in MS patients and HV. The HLA haplotypes for DRB1, DQA1 and DQB1 were determined for all individuals. The authors used PLP and MBP peptides known to bind with high affinity to a broad range of HLA alleles [43,44]. They considered that the differences observed in T cell reactivity between the MS patients and HV were not due to HLA difference [18].

In another study, Tejada-Simon and collaborators [26] assessed the frequency of autoreactive T cells using whole MBP, synthetic MBP and PLP peptides. Despite the fact that a biased expression of DRB1*1501 was found in the group of MS patients as compared to HV, similar autoreactive T cell frequency was observed in the two cohorts, suggesting a lack of effect of the HLA haplotype for the T cell reactivity to myelin antigens [26].

Using the IFN- γ -ELISPOT assay, Wallström and colleagues choose to analyze MOG autoreactive T cell responses in MS patients and HV groups selected with a DR2 HLA haplotype. Thus, the difference of reactivity observed in MS patients as compared to HV would be due to the disease process and not biased by the HLA group [20].

In other studies, some authors used HLA-DR2⁺ MS patients and HV and compared HLA-DR2⁺ and HLA-DR2⁻ groups by IFN- γ -ELISPOT. No significant difference for T cell reactivity to whole MBP and whole MOG was found between MS HLA-DR2⁺ vs

HLA-DR2⁻ groups suggesting a lack of effect of the HLA haplotype [17,27].

However an effect of the HLA haplotypes for class I molecules was found in the work from Niland et al [39]. HLA-A3 is the most common HLA class I molecule associated with MS [45,46] and a single HLA-A3-restricted peptide (PLP_{43–53}) has been characterized [47]. However, little attention has been paid to HLA class I-restricted epitopes derived from myelin proteins. Niland and colleagues [39] found an increased frequency of IFN- γ producing CD8⁺ T cells in each of HLA-A2⁺ MS patients when compared to HLA-A2⁻ MS patients and HLA-A2⁺ and HLA-A2⁻ HV or OND for restricted peptides derived from the transaldolase protein.

In conclusion, independently of the technique used to assess myelin-derived antigen responding T cells, it is difficult to ensure the role of HLA haplotype in this response. When the data about HLA haplotype of the cohorts are available, autoreactive T cell frequency seem to be independent from this factor. However, the heterogeneity and the size of MS patients and control cohorts lead to difficulties in interpreting these results.

5. Next generation methods to detect myelin specific T cells in MS

Recently, the development of novel techniques has allowed the detection of antigen specific T cell responses directly in MS according to their *in vitro* reaction such as proliferation, cytokine expression or other. As previously noticed, LDA and ELISPOT techniques may have several drawbacks, which can mostly be avoided using more recent methods based on flow cytometry.

5.1. Peptide/MHC multimers

This method was introduced in 1996 by Altman et al. and since, progress has been done to improve its specificity and sensitivity [48]. Tetramer methods have been especially used on virus to determine frequencies and phenotypes of virus specific T cells [49]. Generally, they use a complex of four biotinylated MHC molecules loaded with a specific peptide and bound to a fluorescent streptavidin molecule. Cells are incubated with peptide-loaded tetramers at 37 °C and tetramer-positive cells are selected by flow cytometry. The temperature is a key point since it may modify the TCR-tetramer interactions.

Using this approach in a recent study, Raddassi et al. compared the frequency of autoreactive T cells against MOG peptide after culture in the presence of IL-2. The studied cohorts were composed of RR MS (n=14) and HV (n=12) expressing HLA class II DRB1*0401. CD4⁺ T cells were cultured for 14 days with autologous APC loaded with MOG_{97–109} (107E-5). Cells were then incubated with 10 μ g/ml tetramer DRB1*0401/MOG97–109(107E-5) or DRB1*0401/GAD65 555–567 (557F-I). After stimulation, the authors observed that the frequency of CD4⁺CD25^{int} DRB1*0401/MOG97–109(107E-5) tetramer⁺ T cells was higher in MS patients than in HV [50].

Currently, tetramer methods can be used to directly identify and characterize the phenotype of antigen specific T cells by flow cytometry detection. In addition, MHC class I and MHC class II but also nonclassical tetramers can be used

to determine epitope specific T cells. The main drawback of this method remains the necessity to know the MHC restriction and the peptide sequence in the context of the disease studied. In that context, only a small fraction of T cell response can be measured.

5.2. CFSE-based flow cytometry

More studies developed a flow cytometry approach using Carboxyfluorescein diacetate Succinimidylester (CFSE) to directly analyze proliferation of cells reacting to an antigen. Cells are stained with CFSE and then cultured in the presence of different antigens. After culture, cells are stained with specific antibodies and analysed by flow cytometry. All studies were performed using CFSE-based flow cytometry with frozen cells but with different culture times. Some studies used this method to evaluate antigen specific T cell frequency in MS.

Ratts and colleagues studied the phenotypic characterization of autoreactive T cells in MS. In this study, they compared the frequency of autoreactive CD8^{hi} T cells committed to a panel of myelin peptides in 12 MS patients and nine HV. They obtained different results depending on the CD8 phenotype. A high frequency of myelin specific CD28⁺CD57⁺CD8^{hi} T cells was observed in MS patients, while in HV, the frequency was higher for CD28⁺CD57⁻CD8^{hi} [51].

Zafranskaya et al. characterized the phenotype and function of autoreactive T cells from untreated and IFN β -treated MS patients, and controls by CFSE-based flow cytometric assay. They observed a high frequency of anti-MOG memory CD8⁺ T cells in untreated MS patients as compared to HV [52].

The proliferation evaluated by CFSE assay is not an immediate response of T cells to antigens because of the *in vitro* culture period. Nevertheless, this test remains an efficient method to determine T cell frequency.

5.3. Measurement of autoreactive T cell frequency using protein transfer assay

Trogocytosis is an active membrane transfer of lymphocytes having engaged an immune synapse with an antigen presenting cell (APC). It involves the transfer of plasma membrane fragments from the APC to the lymphocyte, and has been documented in T, B and natural killer cells, *in vivo* and *in vitro* [53–55]. Protein transfer is specifically dependent on antigen receptor signalling. This phenomenon might be involved in the immune response and possibly in the control of other cellular systems [56].

Recently, protein transfer has been used as a global method to quantify antigen reactive T cells. This method, – called TRAP (T cell Recognition of Antigen Presenting Cells by Protein transfer) and based on trogocytosis, has been established in a mouse model of induced responses against CMV. It has been proposed as a sensitive method to enumerate antigen-reactive lymphocytes. When used with autologous APC, the TRAP method does not require the knowledge of neither the MHC restriction molecule involved nor the peptide presented, regardless of the protein tested [24]. By labeling the plasma membrane of APC with fluorescent dyes detectable by flow cytometry, it is possible to measure the number of T lymphocytes that specifically interact with APC by quantifying

T cells which acquire APC labeled membrane material (Fig. 1). The readout is thus not restricted to one or few cytokines as in ELISPOT assay, or to a selection of preferential properties cells as in LDA. One advantage of TRAP is to provide a readout for any T cell subset because trogocytosis is a compulsory step for T cell response. The TRAP assay provides the opportunity to test the response of T cells processed by APC *in vitro*.

Using this novel technique, we have recently reassessed the frequency of both CD4⁺ and CD8⁺ T cells engaging immune synapses with autologous APC, in the presence of myelin autoantigens [57]. Pre-incubated APC with whole native human myelin was used to stimulate syngenic memory CD45RO⁺ lymphocytes overnight, and TRAP was measured in the CD3⁺ T lymphocytes. In our study, in the presence of whole native human myelin, the median frequency of TRAP⁺ cells was 2.08% in untreated RRMS patients (n=22, range 0–6%) and 0.1% in HV (n=18; range 0–5.3%, $p<0.0001$). The background signal, without the autoantigen, was comparable between the two groups (1%, range 0–4% and 1.45%, range 0.1–4% in the MS and HV, respectively). In the presence of human myelin, TRAP positive CD8⁺ T cells were also observed in two MS patients and in two HV who were previously found to have INF γ ⁺ T cells in the presence of myelin-derived HLA class I-restricted peptides. Furthermore, myelin TRAP-reactive T cell frequency was considerably higher than the one of INF γ producing T cells in the ELISPOT assay (58-fold increase). There was also a significant correlation between INF γ -ELISPOT and TRAP frequencies in samples tested simultaneously under similar conditions ($r^2=0.86$, $p<0.001$). Finally, 70–80% of the TRAP⁺ cells expressed CD154 (CD40L), suggesting they were in an activated state and capable of interacting with APC *in vitro*. Furthermore, these cells were also CD62L^{low} suggesting homing abilities.

By using the two approaches, whole native human myelin as autoantigen and the TRAP assay to enumerate the T cells able to engage immune synapses with APC, we found a higher frequency of autoreactive T cells in MS patients than in HV. To assess autoreactive T cell frequencies, whole human myelin seemed to be more appropriate than the usual peptides or proteins for several reasons. Firstly, it may best reproduce what happens in the CNS of patients. Secondly, the use of whole human myelin as antigen allows the recruitment of most of the potential anti-myelin T cells. This is not the case with the use of peptides or proteins derived myelin as antigens since it does not cover all the potential epitopes derived from myelin. These two new approaches may lead to a new assessment of the actual level of autoimmunity in MS [57].

Taken together, the use of flow cytometry detection allowed the selection of only the interesting cells, because the doublets, the dead and the nonspecific binding cells are excluded. However, this technology requires a high cell number. Combining two methods may be the best approach to analyse the frequency of very rare cell populations. This was demonstrated with the use of tetramers and proliferation assays, among others [58].

6. Conclusion

Frequencies of autoreactive T cells in MS patients and HV appear to vary greatly depending on the enumeration methodology used. However, new methods (like the TRAP

assay) that take into account a more global readout of immune activation than the ELISPOT or the proliferation assays are needed and may give rise to a new assessment of the autoreactive pool of T cells in MS patients. However it is important to keep in mind that differences in frequency of autoreactive T cells may not be the only factor involved in the development of the disease. Qualitative difference may also exist and contribute to the disease process.

Conflict of interest statement

The authors declare that there are no conflicts of interest.

References

- [1] C.F. Lucchinetti, W. Brück, M. Rodriguez, H. Lassmann, Distinct patterns of multiple sclerosis pathology indicates heterogeneity on pathogenesis, *Brain Pathol.* 6 (1996) 259–274.
- [2] B.O. Fabrik, J.N.P. Zwemmer, C.E. Teunissen, C.D. Dijkstra, C.H. Polman, J.D. Laman, et al., In vivo detection of myelin proteins in cervical lymph nodes of MS patients using ultrasound-guided fine-needle aspiration cytology, *J. Neuroimmunol.* 161 (2005) 190–194.
- [3] A. Prat, A. Al-Asmi, P. Duquette, J.P. Antel, Lymphocyte migration and multiple sclerosis: relation with disease course and therapy, *Ann. Neurol.* 46 (1999) 253–256.
- [4] L. Battistini, L. Piccio, B. Rossi, S. Bach, S. Galgani, C. Gasperini, et al., CD8+ T cells from patients with acute multiple sclerosis display selective increase of adhesiveness in brain venules: a critical role for P-selectin glycoprotein ligand-1, *Blood* 101 (2003) 4775–4782.
- [5] B. Bahbouhi, L. Berthelot, S. Pettré, L. Michel, S. Wiertlewski, B. Weksler, et al., Peripheral blood CD4+ T lymphocytes from multiple sclerosis patients are characterized by higher PSGL-1 expression and transmigration capacity across a human blood-brain barrier-derived endothelial cell line, *J. Leukoc. Biol.* 86 (2009) 1049–1063.
- [6] D.-A. Laplaud, C. Ruiz, S. Wiertlewski, S. Brouard, L. Berthelot, M. Gullet, et al., Blood T-cell receptor beta chain transcriptome in multiple sclerosis. Characterization of the T cells with altered CDR3 length distribution, *Brain* 127 (2004) 981–995.
- [7] C. Skulina, S. Schmidt, K. Dornmair, H. Babbe, A. Roers, K. Rajewsky, et al., Multiple sclerosis: brain-infiltrating CD8+ T cells persist as clonal expansions in the cerebrospinal fluid and blood, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101 (2004) 2428–2433.
- [8] I.R. Moldovan, R.A. Rudick, A.C. Cotleur, S.E. Bom, J.-C. Lee, M.T. Karafa, et al., Interferon gamma responses to myelin peptides in multiple sclerosis correlate with a new clinical measure of disease progression, *J. Neuroimmunol.* 141 (2003) 132–140.
- [9] K. Ota, M. Matsui, E.L. Milford, G.A. Mackin, H.L. Weiner, D.A. Hafler, T-cell recognition of an immunodominant myelin basic protein epitope in multiple sclerosis, *Nature* 346 (1990) 183–187.
- [10] R. Martin, D. Jaraquemada, M. Fierlage, J. Richert, J. Whitaker, E.O. Long, et al., Fine specificity and HLA restriction of myelin basic protein-specific cytotoxic T cell lines from multiple sclerosis patients and healthy individuals, *J. Immunol.* 145 (1990) 540–548.
- [11] P.A. Muraro, K.-P. Wandinger, B. Bielekova, B. Gran, A. Marques, U. Utz, et al., Molecular tracking of antigen-specific T cell clones in neurological immune-mediated disorders, *Brain* 126 (2003) 20–31.
- [12] J. Hong, Y.C.Q. Zang, S. Li, V.M. Rivera, J.Z. Zhang, Ex vivo detection of myelin basic protein-reactive T cells in multiple sclerosis and controls using specific TCR oligonucleotide probes, *Eur. J. Immunol.* 34 (2004) 870–881.
- [13] M.P. Crawford, S.X. Yan, S.B. Ortega, R.S. Mehta, R.E. Hewitt, D.A. Price, et al., High prevalence of autoreactive, neuroantigen-specific CD8+ T cells in multiple sclerosis revealed by novel flow cytometric assay, *Blood* 103 (2004) 4222–4231.
- [14] T. Olsson, W.W. Zhi, B. Hildebrand, V. Kostulas, Y.P. Jiang, G. Anderson, et al., Autoreactive T lymphocytes in multiple sclerosis determined by antigen-induced secretion of interferon-gamma, *J. Clin. Invest.* 86 (1990) 981–985.
- [15] L. Berthelot, D.-A. Laplaud, S. Pettré, C. Ballet, L. Michel, S. Hillion, et al., Blood CD8+ T cell responses against myelin determinants in multiple sclerosis and healthy individuals, *Eur. J. Immunol.* 38 (2008) 1889–1899.
- [16] Z. Jingwu, R. Medaer, G.A. Hashim, Y. Chin, E. van den Berg-Loonen, J.C. Raus, Myelin basic protein-specific T lymphocytes in multiple sclerosis and controls: precursor frequency, fine specificity, and cytotoxicity, *Ann. Neurol.* 32 (1992) 330–338.
- [17] N. Hellings, M. Barée, C. Verhoeven, M.B. Dhooghe, R. Medaer, C.C. Bernard, et al., T-cell reactivity to multiple myelin antigens in multiple sclerosis patients and healthy controls, *J. Neurosci. Res.* 63 (2001) 290–302.
- [18] M.P. Pender, P.A. Csurhes, J.M. Greer, P.D. Mowat, R.D. Henderson, K.D. Cameron, et al., Surges of increased T cell reactivity to an encephalitogenic region of myelin proteolipid protein occur more often in patients with multiple sclerosis than in healthy subjects, *J. Immunol.* 165 (2000) 5322–5331.
- [19] T. Olsson, J. Sun, J. Hillert, B. Hildebrand, H.P. Ekre, G. Andersson, et al., Increased numbers of T cells recognizing multiple myelin basic protein epitopes in multiple sclerosis, *Eur. J. Immunol.* 22 (1992) 1083–1087.
- [20] E. Wallström, M. Khademi, M. Andersson, R. Weissert, C. Linington, T. Olsson, Increased reactivity to myelin oligodendrocyte glycoprotein peptides and epitope mapping in HLA DR2(15)+ multiple sclerosis, *Eur. J. Immunol.* 28 (1998) 3329–3335.
- [21] Y.K. Chou, D.N. Bourdette, H. Offner, R. Whitham, R.Y. Wang, G.A. Hashim, et al., Frequency of T cells specific for myelin basic protein and myelin proteolipid protein in blood and cerebrospinal fluid in multiple sclerosis, *J. Neuroimmunol.* 38 (1992) 105–113.
- [22] J. Zhang, S. Markovic-Plese, B. Lacet, J. Raus, H.L. Weiner, D.A. Hafler, Increased frequency of interleukin 2-responsive T cells specific for myelin basic protein and proteolipid protein in peripheral blood and cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis, *J. Exp. Med.* 179 (1994) 973–984.
- [23] A. Dressel, D. Mirowska-Guzel, C. Gerlach, F. Weber, Migration of T-cell subsets in multiple sclerosis and the effect of interferon-beta1a, *Acta Neurol. Scand.* 116 (2007) 164–168.
- [24] C. Beadling, M.K. Slifka, Quantifying viable virus-specific T cells without a priori knowledge of fine epitope specificity, *Nat. Med.* 12 (2006) 1208–1212.
- [25] M. Pette, K. Fujita, D. Wilkinson, D.M. Altmann, J. Trowsdale, G. Giegerich, et al., Myelin autoreactivity in multiple sclerosis: recognition of myelin basic protein in the context of HLA-DR2 products by T lymphocytes of multiple-sclerosis patients and healthy donors, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87 (1990) 7968–7972.
- [26] M.V. Tejada-Simon, J. Hong, V.M. Rivera, J.Z. Zhang, Reactivity pattern and cytokine profile of T cells primed by myelin peptides in multiple sclerosis and healthy individuals, *Eur. J. Immunol.* 31 (2001) 907–917.
- [27] A. Van der Aa, N. Hellings, C.C.A. Bernard, J. Raus, P. Stinissen, Functional properties of myelin oligodendrocyte glycoprotein-reactive T cells in multiple sclerosis patients and controls, *J. Neuroimmunol.* 137 (2003) 164–176.

- [28] K.D. Bieganowska, L.J. Ausubel, Y. Wodabber, E. Slovik, W. Messersmith, D.A. Hafler, Direct ex vivo analysis of activated, Fas-sensitive autoreactive T cells in human autoimmune disease, *J. Exp. Med.* 185 (1997) 1585–1594.
- [29] G. Hermans, P. Stinissen, L. Hauben, E. Van den Berg-Loonen, J. Raus, J. Zhang, Cytokine profile of myelin basic protein-reactive T cells in multiple sclerosis and healthy individuals, *Ann. Neurol.* 42 (1997) 18–27.
- [30] K.W. Wucherpfennig, K. Ota, N. Endo, J.G. Seidman, A. Rosenzweig, H.L. Weiner, et al., Shared human T cell receptor V beta usage to immunodominant regions of myelin basic protein, *Science* 248 (1990) 1016–1019.
- [31] R.B. Ratts, N.J. Karandikar, R.Z. Hussain, J. Choy, S.C. Northrop, A.E. Lovett-Racke, et al., Phenotypic characterization of autoreactive T cells in multiple sclerosis, *J. Neuroimmunol.* 178 (2006) 100–110.
- [32] J. Sun, H. Link, T. Olsson, B.G. Xiao, G. Andersson, H.P. Ekre, et al., T and B cell responses to myelin-oligodendrocyte glycoprotein in multiple sclerosis, *J. Immunol.* 146 (1991) 1490–1495.
- [33] C.M. Pelfrey, R.A. Rudick, A.C. Cotleur, J.C. Lee, M. Tary-Lehmann, P.V. Lehmann, Quantification of self-recognition in multiple sclerosis by single-cell analysis of cytokine production, *J. Immunol.* 165 (2000) 1641–1651.
- [34] M. Sospedra, R. Martin, Immunology of multiple sclerosis, *Annu. Rev. Immunol.* 23 (2005) 683–747.
- [35] M. Andersson, M. Yu, M. Söderström, S. Weerth, S. Baig, G. Solders, et al., Multiple MAG peptides are recognized by circulating T and B lymphocytes in polyneuropathy and multiple sclerosis, *Eur. J. Neurol.* 9 (2002) 243–251.
- [36] L.R. Tranquill, L. Cao, N.C. Ling, H. Kalbacher, R.M. Martin, J.N. Whitaker, Enhanced T cell responsiveness to citrulline-containing myelin basic protein in multiple sclerosis patients, *Mult. Scler.* 6 (2000) 220–225.
- [37] K. Banki, E. Colombo, F. Sia, D. Halladay, D.H. Mattson, A.H. Tatum, et al., Oligodendrocyte-specific expression and autoantigenicity of transaldolase in multiple sclerosis, *J. Exp. Med.* 180 (1994) 1649–1663.
- [38] E. Colombo, K. Banki, A.H. Tatum, J. Daucher, P. Ferrante, R.S. Murray, et al., Comparative analysis of antibody and cell-mediated autoimmunity to transaldolase and myelin basic protein in patients with multiple sclerosis, *J. Clin. Invest.* 99 (1997) 1238–1250.
- [39] B. Niland, K. Banki, W.E. Biddison, A. Perl, CD8+ T cell-mediated HLA-A*0201-restricted cytotoxicity to transaldolase peptide 168–176 in patients with multiple sclerosis, *J. Immunol.* 175 (2005) 8365–8378.
- [40] O. Olenup, J. Hillert, HLA class II-associated genetic susceptibility in multiple sclerosis: a critical evaluation, *Tissue Antigens* 38 (1991) 1–15.
- [41] J. Yaouanq, G. Semana, S. Eichenbaum, E. Quelvennec, M.P. Roth, M. Clanet, et al., Evidence for linkage disequilibrium between HLA-DRB1 gene and multiple sclerosis. The French Research Group on Genetic Susceptibility to MS, *Science* 276 (1997) 664–665.
- [42] J.L. Haines, H.A. Terwedow, K. Burgess, M.A. Pericak-Vance, J.B. Rimmier, E.R. Martin, et al., Linkage of the MHC to familial multiple sclerosis suggests genetic heterogeneity. The Multiple Sclerosis Genetics Group, *Hum. Mol. Genet.* 7 (1998) 1229–1234.
- [43] S. Markovic-Plese, H. Fukaura, J. Zhang, A. al-Sabbagh, S. Southwood, A. Sette, et al., T cell recognition of immunodominant and cryptic proteolipid protein epitopes in humans, *J. Immunol.* 155 (1995) 982–992.
- [44] A. Valli, A. Sette, L. Kappos, C. Oseroff, J. Sidney, G. Miescher, et al., Binding of myelin basic protein peptides to human histocompatibility leukocyte antigen class II molecules and their recognition by T cells from multiple sclerosis patients, *J. Clin. Invest.* 91 (1993) 616–628.
- [45] H.F. Harbo, B.A. Lie, S. Sawcer, E.G. Celius, K.-Z. Dai, A. Oturai, et al., Genes in the HLA class I region may contribute to the HLA class II-associated genetic susceptibility to multiple sclerosis, *Tissue Antigens* 63 (2004) 237–247.
- [46] A. Fogdell-Hahn, A. Ligors, M. Gronning, J. Hillert, O. Olerup, Multiple sclerosis: a modifying influence of HLA class I genes in an HLA class II associated autoimmune disease, *Tissue Antigens* 55 (2000) 140–148.
- [47] K. Honma, K.C. Parker, K.G. Becker, H.F. McFarland, J.E. Coligan, W.E. Biddison, Identification of an epitope derived from human proteolipid protein that can induce autoreactive CD8+ cytotoxic T lymphocytes restricted by HLA-A3: evidence for cross-reactivity with an environmental microorganism, *J. Neuroimmunol.* 73 (1997) 7–14.
- [48] J.D. Altman, P.A.H. Moss, P.J.R. Goulder, D.H. Barouch, M.G. McHeyzer-Williams, J.I. Bell, et al., Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes, *Science* 274 (1996) 94–96.
- [49] M.F. Callan, L. Tan, N. Annels, G.S. Ogg, J.D. Wilson, C.A. O'Callaghan, et al., Direct visualization of antigen-specific CD8+ T cells during the primary immune response to Epstein-Barr virus in vivo, *J. Exp. Med.* 187 (1998) 1395–1402.
- [50] K. Raddassi, S.C. Kent, J. Yang, K. Bourcier, E.M. Bradshaw, V. Seyfert-Margolis, et al., Increased frequencies of myelin oligodendrocyte glycoprotein/MHC class II-binding CD4 cells in patients with multiple sclerosis, *J. Immunol.* 187 (2011) 1039–1046.
- [51] R.B. Ratts, N.J. Karandikar, R.Z. Hussain, J. Choy, S.C. Northrop, A.E. Lovett-Racke, et al., CD28- CD57+ T cells predominate in CD8 responses to glatiramer acetate, *J. Neuroimmunol.* 178 (2006) 100–110.
- [52] M. Zafranskaya, P. Oschmann, R. Engel, A. Weishaupt, J.M. van Noort, H. Jomaa, et al., Interferon-beta therapy reduces CD4+ and CD8+ T-cell reactivity in multiple sclerosis, *Immunology* 121 (2007) 29–39.
- [53] J.F. Huang, Y. Yang, H. Sepulveda, W. Shi, I. Hwang, P.A. Peterson, et al., TCR-mediated internalization of peptide-MHC complexes acquired by T cells, *Science* 286 (1999) 952–954.
- [54] D. Hudrisier, J. Riond, H. Mazarguil, J.E. Gairin, E. Joly, Cutting edge: CTLs rapidly capture membrane fragments from target cells in a TCR signaling-dependent manner, *J. Immunol.* 166 (2001) 3645–3649.
- [55] J.C. Stinchcombe, G. Bossi, S. Booth, G.M. Griffiths, The immunological synapse of CTL contains a secretory domain and membrane bridges, *Immunity* 15 (2001) 751–761.
- [56] E. Joly, D. Hudrisier, What is trogocytosis and what is its purpose? *Nat. Immunol.* 4 (2003) 815.
- [57] B. Bahbouhi, S. Pettré, L. Berthelot, A. Garcia, A. Elong Ngonu, N. Degauque, et al., T cell recognition of self-antigen presenting cells by protein transfer assay reveals a high frequency of anti-myelin T cells in multiple sclerosis, *Brain* 133 (2010) 1622–1636.
- [58] H. Takata, M. Takiguchi, Three memory subsets of human CD8+ T cells differently expressing three cytolytic effector molecules, *J. Immunol.* 177 (2006) 4330–4340.

Etude de la fréquence des lymphocytes T spécifiques d'un extrait de myéline humaine dans la SEP par la méthode TRAP

Méthodologie

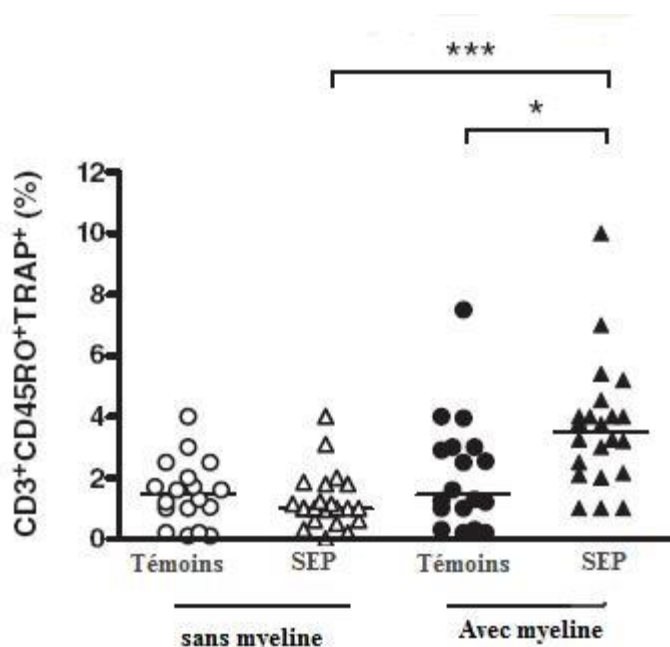
Notre équipe s'est intéressée à la caractérisation des LT spécifiques de la myéline. Pour débiter, nous avons évalué la fréquence des LT spécifiques de la myéline ou des protéines dérivées par deux différentes méthodes (Bahbouhi et al., 2010; Berthelot et al., 2008). Un intérêt particulier a été apporté à la méthode TRAP, *T cell Recognition of APC by Protein transfer* déjà décrite chez la souris et basée sur le phénomène de la trogocytose (Beadling and Slifka, 2006) a été adapté à l'homme dans le contexte de la SEP (Bahbouhi et al., 2010). C'est une méthode qui permet de mesurer de façon globale le pool de LT ayant une réactivité contre un extrait de myéline humaine. Lors de la présentation antigénique par les Cellules présentatrices d'antigènes (CPA), un échange de membrane plasmique s'effectue entre le CPA et la cellule effectrice (Trogocytose) au niveau de la synapse immune (Joly and Hudrisier, 2003). Cette signature biologique peut être mesurée et permet ainsi d'identifier et de quantifier les LT spécifiques de l'extrait de myéline totale.

80 ml de sang sont dilués au 1/2 dans du PBS et les PBMC sont obtenus par gradient de densité (Ficoll). Les cellules sont triées positivement par des billes magnétiques CD45RO⁺ et les CD14⁺ pour obtenir des cellules effectrices mémoires et les CPA (Monocytes) respectivement. Les monocytes sont comptés ($3.10^5/100\mu\text{L}$) et incubés avec de la myéline totale humaine (extraite au laboratoire) : $10\mu\text{g}/100\mu\text{L}$ pendant 48H à 37°C 5% CO₂. Les cellules mémoires sont incubées dans du milieu enrichi en parallèle. Après l'incubation les monocytes sont marqués avec de la biotine NH₂ (biotinylation de tous les groupements NH₂ de la membrane plasmique) pendant 30 minutes à TA. Les cellules mémoires sont rajoutées aux monocytes et incubées toute la nuit pour permettre la trogocytose. La co-culture est marquée au CD3, CD4 et à la streptavidine-fluorescente ayant une forte affinité avec la biotine. Ce marquage va permettre de visualiser au LSR II les LT mémoires (CD3⁺) et les sous-populations lymphocytaires CD4⁺ et CD8⁺ (CD3⁺CD4⁺) qui ont reconnu la myéline présentée par les monocytes.

Cette méthodologie a fait l'objet d'un article paru dans *Brain* en 2010 : (Bahbouhi et al., 2010)

Données obtenues sur des patients rémittents non-traités

Nous avons inclus 22 patients non-traités atteints de forme rémittente, 18 femmes et 4 hommes (moyenne d'âge: 36 ans, 22-60 ans) et 18 témoins sains avec 14 femmes et 4 hommes (moyenne d'âge : 36 ans, 24-62 ans).



Nous obtenons une différence significative entre patients atteints de SEP (3.5%) et témoins sains (1.45%). Comme le montre les résultats obtenus, il existe une ségrégation différente entre les patients et les témoins en fonction de la réponse TRAP-myéline.

Dans cette étude, l'extrait de myéline totale était commerciale (fourni par AbD serotec) mais suite à un arrêt de sa commercialisation, j'ai du extraire de la myéline au sein du laboratoire et la valider pour son utilisation lors du PHRC.

Obtention de la myéline totale humaine

Pour obtenir cette myéline, nous avons utilisé un protocole adapté de (Norton and Poduslo, 1973). La myéline est obtenue après des séparations successives par gradient de sucrose (0.83M) et (0.30M). L'extrait subi ensuite de nombreux lavages pour augmenter sa pureté. La fiche ci-dessous représente les caractéristiques de la myéline humaine obtenue.

INSERM UMR 643 : Directeur Ignacio ANEGON

ITUN : Directeur Gilles BLANCHO

Extrait total de la Myéline Humaine

Description

Myéline extraite au laboratoire INSERM UMR 1064 à partir de Cerveau humain d'un donneur de sexe masculin âgée de 55 ans.

L'extraction des protéolipides de la myéline (*Current Protocols in Cell Biology, 2006*) est basée sur le protocole révisé de Norton et Poduslo (Norton and Poduslo, 1973) avec 5 -10 g de tissus humains congelés. L'isolation se fait grâce à une succession de centrifugations sur gradient de sucrose.

Quantité : 40 mg

Concentration : 10.8 mg/ml

Tampon et Condition de stockage : Tampon Tris HCl pH 7.45. Conservation -80°C pendant 6 mois, Après la première utilisation, aliquot mis à -20°C et utilisé dans le mois.

Applications : Culture cellulaire

Vérification de l'extrait

1) Analyse par western Blot :

- Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein (MOG, 28Kda): Rabbit Monoclonal Antibody (Epitomics #3342-1) (**Figure 1**)
- Proteolipid Protein (PLP,30 kda): Mouse Monoclonal Antibody (SantaCruz Sc-58571)
- Myelin Basic Protein (MBP,21.5 Kda) : FL-304 Rabbit Polyclonal Antibody (Santa Cruz Sc-25665)

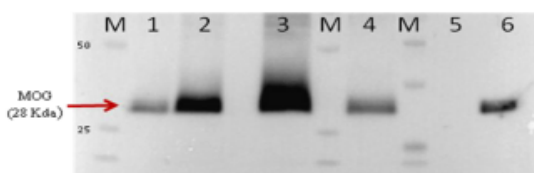


Figure 1 : Western Blot MOG de l'extrait de myéline humaine.
(1) Myéline humaine 1µg, (2) Myéline humaine 5 µg, (3) Myéline humaine 15 µg,
(4) Myéline humaine commerciale, (5) Rate de souris, (6) Moelle épinière de souris.

2) Analyse Biochimique de l'extrait de myéline par spectrométrie de masse :

Plate forme « Biopolymères, Interactions, Assemblages » INRA UR1268, Laboratoire de spectrométrie de masse Les bandes hydrolysées à la trypsine ont été analysées en nanoLC-MS/MS sur l'instrument ESI-ORBITRAP Velos après révélation des bandes au Bleu de Comassie.

Moteur de recherche : Mascot 2.2 (Matrix Science), les données sont comparées à la banque de données « uniprot réduite à Homo Sapiens ».

Les protéines principales de la Myéline ont été identifiées :

Myelin Basic Protein (MBP), Myelin Associated glycoprotein (MAG), Proteolipid protein 1 (PLP1), Myelin Oligodendrocyte glycoprotein (MOG), Oligodendrocyte specific protein (OSP/Claudin 11).

L'analyse par spectrométrie a identifié d'autres protéines notamment l'Albumine, Neural cell adhesion molecule 1 (NCAM1), Glial fibrillary acidic protein (GFAP), Synaptosomal associated protein 25 (SNAP 25), Brain acid soluble protein (BASP1), 2',3'-cyclic-nucleotide 3'-phosphodiesterase (CNP).

Plan Hospitalier pour la Recherche Clinique (PHRC)

Objectif du PHRC

Caractériser la réponse TRAP chez les patients atteints de SEP et évaluer la sensibilité et la spécificité de la méthode afin de pouvoir la développer comme un outil diagnostique dans la Maladie.

Déroulement de l'étude

C'est une étude incluant 200 individus correspondant chacun à un groupe bien précis comme spécifié ci-dessous. La méthode au sein du laboratoire se déroule en aveugle pour la technique et l'analyse.

- Sous-groupe 1 : 25 individus

Patients atteints de SEP de forme rémittente

Dernière poussée datant de plus de 30 jours

Entre 18 et 55 ans

Naïf de traitement de fond ou traitement immuno-modulateur arrêté depuis au moins 6 mois

- Sous-groupe 2 : 25 individus

Patients atteints de SEP de forme rémittente

Dernière poussée datant de plus de 30 jours

Entre 18 et 55 ans

Patient sous traitement de fond ou immunomodulateur

- Sous-groupe 3 : 25 individus

Patients atteints de SEP secondairement progressive

Dernière poussée datant de plus de 30 jours (Poussée surajoutée)

Entre 18 et 65 ans

Patient naïf de traitement de fond ou de traitement immunomodulateur arrêté depuis au moins 6 mois

- Sous-groupe 4 : 25 individus

Patients atteints de forme primaire progressive

Dernière poussée datant de plus de 30 jours (Poussée surajoutée)

Entre 18 et 65 ans

Patient naïf de traitement de fond ou de traitement immunomodulateur arrêté depuis au moins 6 mois

- Sous-groupe contrôle 1 : 33 individus

Volontaires sains

Entre 18 et 55 ans

- Sous-groupe contrôle 2 : 33 individus

Patients ayant une pathologie neurologique centrale ou périphérique non-inflammatoire, non auto-immune

Entre 18 et 55 ans

- Sous-groupe contrôle 3 : 34 individus

Patients ayant une pathologie auto-immune ou considérée comme telle selon les critères cliniques qui s'y appliquent, épargnant le Système Nerveux Central.

Entre 18 et 55 ans

Etat actuel de l'étude

10 centres en France sont ouverts pour ce PHRC. A l'heure actuelle, la fréquence des LT spécifiques de la myéline humaine de 120 individus a été évaluée.

Résultats attendus et discussion

Le diagnostic de la SEP repose sur des critères de McDonald (polman, 2005) récemment révisité. C'est un ensemble de critères cliniques, radiologiques et d'analyse de liquide céphalorachidien. En effet, l'analyse du LCR reste non-spécifique car les bandes oligoclonales retrouvées chez les patients atteints de SEP sont aussi retrouvées chez des patients ayant d'autres pathologies inflammatoires du SNC. Cette analyse n'apporte qu'une aide au diagnostic. L'apparition au cours du temps de nouvelles lésions est visible par IRM pouvant survenir lors d'une poussée clinique et qui peut parfois prendre plusieurs années. Cependant l'IRM ne permet pas de discriminer les patients évoluant rapidement vers une SEP cliniquement définie et d'autre part même des patients avec une IRM normale peuvent

évoluer vers une SEP (Optic Neuritis Study Group, 2008). Il est donc absolument nécessaire de développer des outils diagnostics plus performants que l'IRM pouvant permettre de discriminer rapidement les patients à fort potentiel évolutif vers une SEP. En effet, L'existence d'un test diagnostique tel que le TRAP (simple prise de sang) pourrait donc avoir une utilité pour mettre en route un traitement rapidement.

La méthode TRAP comparée aux autres techniques utilisées (ELISPOT, ELISA, technique des tétramères) a plusieurs avantages:

- Les réponses CD4⁺ et CD8⁺ peuvent être évaluées dans le même test
- L'analyse globale de la réactivité des LT est possible car le test ne repose pas sur la production d'une cytokine ou une fonction n'incluant qu'une sous-population lymphocytaire
- Plusieurs molécules peuvent être testées en parallèle pour caractériser les LT spécifiques de la myéline (molécules d'adhésion, cytokines, molécules d'activation)
- Les cellules restent vivantes et peuvent être isolées (FACS ARIA) pour des études fonctionnelles

Les résultats que nous allons obtenir en 2014 à la fin de l'inclusion des individus à tester nous permettront d'évaluer cette méthode à grande échelle et de répondre à notre objectif.

REFERENCES

Références bibliographiques

Abbott, N.J., Rönnbäck, L., and Hansson, E. (2006). Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat. Rev. Neurosci.* 7, 41–53.

Agematsu, K., Nagumo, H., Yang, F.C., Nakazawa, T., Fukushima, K., Ito, S., Sugita, K., Mori, T., Kobata, T., Morimoto, C., et al. (1997). B cell subpopulations separated by CD27 and crucial collaboration of CD27+ B cells and helper T cells in immunoglobulin production. *Eur. J. Immunol.* 27, 2073–2079.

Agematsu, K., Hokibara, S., Nagumo, H., and Komiyama, A. (2000). CD27: a memory B-cell marker. *Immunol. Today* 21, 204–206.

Agrawal, S., Smith, S.A.B.C., Tangye, S.G., and Sewell, W.A. (2013). Transitional B cell subsets in human bone marrow. *Clin. Exp. Immunol.*

Aigner, S., Sthoeger, Z.M., Fogel, M., Weber, E., Zarn, J., Ruppert, M., Zeller, Y., Vestweber, D., Stahel, R., Sammar, M., et al. (1997). CD24, a mucin-type glycoprotein, is a ligand for P-selectin on human tumor cells. *Blood* 89, 3385–3395.

Akira, S., Takeda, K., and Kaisho, T. (2001). Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat. Immunol.* 2, 675–680.

Alcami, A., and Koszinowski, U.H. (2000). Viral mechanisms of immune evasion. *Immunol. Today* 21, 447–455.

Allen, C.D.C., Ansel, K.M., Low, C., Lesley, R., Tamamura, H., Fujii, N., and Cyster, J.G. (2004). Germinal center dark and light zone organization is mediated by CXCR4 and CXCR5. *Nat. Immunol.* 5, 943–952.

Allman, D., Lindsley, R.C., DeMuth, W., Rudd, K., Shinton, S.A., and Hardy, R.R. (2001). Resolution of three nonproliferative immature splenic B cell subsets reveals multiple selection points during peripheral B cell maturation. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 167, 6834–6840.

Alt, F.W., and Baltimore, D. (1982). Joining of immunoglobulin heavy chain gene segments: implications from a chromosome with evidence of three D-JH fusions. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 79, 4118–4122.

Alter, A., Duddy, M., Hebert, S., Biernacki, K., Prat, A., Antel, J.P., Yong, V.W., Nuttall, R.K., Pennington, C.J., Edwards, D.R., et al. (2003). Determinants of human B cell migration across brain endothelial cells. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 170, 4497–4505.

Amanna, I.J., and Slifka, M.K. (2006). Quantitation of rare memory B cell populations by two independent and complementary approaches. *J. Immunol. Methods* 317, 175–185.

Amanna, I.J., Carlson, N.E., and Slifka, M.K. (2007). Duration of humoral immunity to common viral and vaccine antigens. *N. Engl. J. Med.* 357, 1903–1915.

Andersson, M., Yu, M., Söderström, M., Weerth, S., Baig, S., Solders, G., and Link, H. (2002). Multiple MAG peptides are recognized by circulating T and B lymphocytes in

polyneuropathy and multiple sclerosis. *Eur. J. Neurol. Off. J. Eur. Fed. Neurol. Soc.* 9, 243–251.

Anolik, J.H., Friedberg, J.W., Zheng, B., Barnard, J., Owen, T., Cushing, E., Kelly, J., Milner, E.C.B., Fisher, R.I., and Sanz, I. (2007). B cell reconstitution after rituximab treatment of lymphoma recapitulates B cell ontogeny. *Clin. Immunol. Orlando Fla* 122, 139–145.

Antel, J., Antel, S., Caramanos, Z., Arnold, D.L., and Kuhlmann, T. (2012). Primary progressive multiple sclerosis: part of the MS disease spectrum or separate disease entity? *Acta Neuropathol. (Berl.)* 123, 627–638.

Aplin, B.D., Keech, C.L., de Kauwe, A.L., Gordon, T.P., Cavill, D., and McCluskey, J. (2003). Tolerance through indifference: autoreactive B cells to the nuclear antigen La show no evidence of tolerance in a transgenic model. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 171, 5890–5900.

Archelos, J.J., Trotter, J., Previtali, S., Weissbrich, B., Toyka, K.V., and Hartung, H.P. (1998). Isolation and characterization of an oligodendrocyte precursor-derived B-cell epitope in multiple sclerosis. *Ann. Neurol.* 43, 15–24.

Arpin, C., Déchanet, J., Van Kooten, C., Merville, P., Grouard, G., Brière, F., Banchereau, J., and Liu, Y.J. (1995). Generation of memory B cells and plasma cells in vitro. *Science* 268, 720–722.

Arpin, C., Banchereau, J., and Liu, Y.J. (1997). Memory B cells are biased towards terminal differentiation: a strategy that may prevent repertoire freezing. *J. Exp. Med.* 186, 931–940.

Ascherio, A., Munger, K.L., and Simon, K.C. (2010). Vitamin D and multiple sclerosis. *Lancet Neurol.* 9, 599–612.

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.

Attanavanich, K., and Kearney, J.F. (2004). Marginal Zone, but Not Follicular B Cells, Are Potent Activators of Naive CD4 T Cells. *J. Immunol.* 172, 803–811.

Avery, D.T., Kalled, S.L., Ellyard, J.I., Ambrose, C., Bixler, S.A., Thien, M., Brink, R., Mackay, F., Hodgkin, P.D., and Tangye, S.G. (2003). BAFF selectively enhances the survival of plasmablasts generated from human memory B cells. *J. Clin. Invest.* 112, 286–297.

Avrameas, S. (1991). Natural autoantibodies: from “horror autotoxicus” to “gnothi seauton.” *Immunol. Today* 12, 154–159.

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.

Bahbouhi, B., Berthelot, L., Pettré, S., Michel, L., Wiertlewski, S., Weksler, B., Romero, I.-A., Miller, F., Couraud, P.-O., Brouard, S., et al. (2009). Peripheral blood CD4+ T lymphocytes from multiple sclerosis patients are characterized by higher PSGL-1 expression

and transmigration capacity across a human blood-brain barrier-derived endothelial cell line. *J. Leukoc. Biol.* *86*, 1049–1063.

Bahbouhi, B., Pettré, S., Berthelot, L., Garcia, A., Elong Ngonu, A., Degauque, N., Michel, L., Wiertlewski, S., Lefrère, F., Meyniel, C., et al. (2010). T cell recognition of self-antigen presenting cells by protein transfer assay reveals a high frequency of anti-myelin T cells in multiple sclerosis. *Brain J. Neurol.* *133*, 1622–1636.

Bajénoff, M., and Germain, R.N. (2009). B-cell follicle development remodels the conduit system and allows soluble antigen delivery to follicular dendritic cells. *Blood* *114*, 4989–4997.

Balázs, M., Martin, F., Zhou, T., and Kearney, J. (2002). Blood dendritic cells interact with splenic marginal zone B cells to initiate T-independent immune responses. *Immunity* *17*, 341–352.

Baranzini, S.E., Jeong, M.C., Butunoi, C., Murray, R.S., Bernard, C.C., and Oksenberg, J.R. (1999). B cell repertoire diversity and clonal expansion in multiple sclerosis brain lesions. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *163*, 5133–5144.

Barcellos, L.F., Sawcer, S., Ramsay, P.P., Baranzini, S.E., Thomson, G., Briggs, F., Cree, B.C.A., Begovich, A.B., Villoslada, P., Montalban, X., et al. (2006). Heterogeneity at the HLA-DRB1 locus and risk for multiple sclerosis. *Hum. Mol. Genet.* *15*, 2813–2824.

Barnett, M.H., and Prineas, J.W. (2004). Relapsing and remitting multiple sclerosis: pathology of the newly forming lesion. *Ann. Neurol.* *55*, 458–468.

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.

Barral, P., Eckl-Dorna, J., Harwood, N.E., De Santo, C., Salio, M., Illarionov, P., Besra, G.S., Cerundolo, V., and Batista, F.D. (2008). B cell receptor-mediated uptake of CD1d-restricted antigen augments antibody responses by recruiting invariant NKT cell help in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 8345–8350.

Bartholomé, E.J., Willems, F., Crusiaux, A., Thielemans, K., Schandene, L., and Goldman, M. (1999). IFN-beta interferes with the differentiation of dendritic cells from peripheral blood mononuclear cells: selective inhibition of CD40-dependent interleukin-12 secretion. *J. Interf. Cytokine Res. Off. J. Int. Soc. Interf. Cytokine Res.* *19*, 471–478.

Basten, A., and Silveira, P.A. (2010). B-cell tolerance: mechanisms and implications. *Curr. Opin. Immunol.* *22*, 566–574.

Batoulis, H., Recks, M.S., Addicks, K., and Kuerten, S. (2011). Experimental autoimmune encephalomyelitis—achievements and prospective advances. *APMIS Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand.* *119*, 819–830.

Baumgarth, N., Herman, O.C., Jager, G.C., Brown, L., Herzenberg, L.A., and Herzenberg, L.A. (1999). Innate and acquired humoral immunities to influenza virus are mediated by distinct arms of the immune system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *96*, 2250–2255.

- Baxter, A.G. (2007). The origin and application of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Nat. Rev. Immunol.* 7, 904–912.
- Beadling, C., and Slifka, M.K. (2006). Quantifying viable virus-specific T cells without a priori knowledge of fine epitope specificity. *Nat. Med.* 12, 1208–1212.
- Becher, B., Durell, B.G., and Noelle, R.J. (2002). Experimental autoimmune encephalitis and inflammation in the absence of interleukin-12. *J. Clin. Invest.* 110, 493–497.
- Berger, T., Weerth, S., Kojima, K., Linington, C., Wekerle, H., and Lassmann, H. (1997). Experimental autoimmune encephalomyelitis: the antigen specificity of T lymphocytes determines the topography of lesions in the central and peripheral nervous system. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* 76, 355–364.
- Berger, T., Rubner, P., Schautzer, F., Egg, R., Ulmer, H., Mayringer, I., Dilitz, E., Deisenhammer, F., and Reindl, M. (2003). Antimyelin antibodies as a predictor of clinically definite multiple sclerosis after a first demyelinating event. *N. Engl. J. Med.* 349, 139–145.
- Berkowska, M.A., Driessen, G.J.A., Bikos, V., Grosserichter-Wagener, C., Stamatopoulos, K., Cerutti, A., He, B., Biermann, K., Lange, J.F., van der Burg, M., et al. (2011). Human memory B cells originate from three distinct germinal center-dependent and -independent maturation pathways. *Blood* 118, 2150–2158.
- Berland, R., and Wortis, H.H. (2002). Origins and functions of B-1 cells with notes on the role of CD5. *Annu. Rev. Immunol.* 20, 253–300.
- Bernasconi, N.L., Traggiai, E., and Lanzavecchia, A. (2002). Maintenance of serological memory by polyclonal activation of human memory B cells. *Science* 298, 2199–2202.
- Bernasconi, N.L., Onai, N., and Lanzavecchia, A. (2003). A role for Toll-like receptors in acquired immunity: up-regulation of TLR9 by BCR triggering in naive B cells and constitutive expression in memory B cells. *Blood* 101, 4500–4504.
- Berthelot, L., Laplaud, D.-A., Pettré, S., Ballet, C., Michel, L., Hillion, S., Braudeau, C., Connan, F., Lefrère, F., Wiertlewski, S., et al. (2008). Blood CD8+ T cell responses against myelin determinants in multiple sclerosis and healthy individuals. *Eur. J. Immunol.* 38, 1889–1899.
- Berthelot, L., Miqueu, P., Pettré, S., Guillet, M., Moynard, J., Wiertlewski, S., Lefrère, F., Brouard, S., Soulillou, J.-P., and Laplaud, D.-A. (2010). Failure of glatiramer acetate to modify the peripheral T cell repertoire of relapsing-remitting multiple sclerosis patients. *Clin. Immunol. Orlando Fla* 135, 33–42.
- Bettelli, E., Baeten, D., Jäger, A., Sobel, R.A., and Kuchroo, V.K. (2006). Myelin oligodendrocyte glycoprotein-specific T and B cells cooperate to induce a Devic-like disease in mice. *J. Clin. Invest.* 116, 2393–2402.
- Bielekova, B., and Becker, B.L. (2010). Monoclonal antibodies in MS: mechanisms of action. *Neurology* 74 Suppl 1, S31–40.
- Bielekova, B., Goodwin, B., Richert, N., Cortese, I., Kondo, T., Afshar, G., Gran, B., Eaton, J., Antel, J., Frank, J.A., et al. (2000). Encephalitogenic potential of the myelin basic protein

peptide (amino acids 83-99) in multiple sclerosis: results of a phase II clinical trial with an altered peptide ligand. *Nat. Med.* 6, 1167–1175.

Blair, P.A., Noreña, L.Y., Flores-Borja, F., Rawlings, D.J., Isenberg, D.A., Ehrenstein, M.R., and Mauri, C. (2010). CD19(+)CD24(hi)CD38(hi) B cells exhibit regulatory capacity in healthy individuals but are functionally impaired in systemic Lupus Erythematosus patients. *Immunity* 32, 129–140.

Ten Boekel, E., Melchers, F., and Rolink, A.G. (1998). Precursor B cells showing H chain allelic inclusion display allelic exclusion at the level of pre-B cell receptor surface expression. *Immunity* 8, 199–207.

Bolton, P.S., and Holland, C.T. (1998). An in vivo method for studying afferent fibre activity from cervical paravertebral tissue during vertebral motion in anaesthetised cats. *J. Neurosci. Methods* 85, 211–218.

Bongioanni, P., Fioretti, C., Vanacore, R., Bianchi, F., Lombardo, F., Ambrogi, F., and Meucci, G. (1996). Lymphocyte subsets in multiple sclerosis. A study with two-colour fluorescence analysis. *J. Neurol. Sci.* 139, 71–77.

Booss, J., Esiri, M.M., Tourtellotte, W.W., and Mason, D.Y. (1983). Immunohistological analysis of T lymphocyte subsets in the central nervous system in chronic progressive multiple sclerosis. *J. Neurol. Sci.* 62, 219–232.

BORNSTEIN, M.B., and APPEL, S.H. (1965). TISSUE CULTURE STUDIES OF DEMYELINATION. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 122, 280–286.

Borst, J., Jacobs, H., and Brouns, G. (1996). Composition and function of T-cell receptor and B-cell receptor complexes on precursor lymphocytes. *Curr. Opin. Immunol.* 8, 181–190.

Bossen, C., Cachero, T.G., Tardivel, A., Ingold, K., Willen, L., Dobles, M., Scott, M.L., Maquelin, A., Belnoue, E., Siegrist, C.-A., et al. (2008). TACI, unlike BAFF-R, is solely activated by oligomeric BAFF and APRIL to support survival of activated B cells and plasmablasts. *Blood* 111, 1004–1012.

Bouaziz, J.-D., Calbo, S., Maho-Vaillant, M., Saussine, A., Bagot, M., Bensussan, A., and Musette, P. (2010). IL-10 produced by activated human B cells regulates CD4(+) T-cell activation in vitro. *Eur. J. Immunol.* 40, 2686–2691.

Bouillet, P., Metcalf, D., Huang, D.C., Tarlinton, D.M., Kay, T.W., Köntgen, F., Adams, J.M., and Strasser, A. (1999). Proapoptotic Bcl-2 relative Bim required for certain apoptotic responses, leukocyte homeostasis, and to preclude autoimmunity. *Science* 286, 1735–1738.

Le Bourhis, L., Martin, E., Péguillet, I., Guihot, A., Froux, N., Coré, M., Lévy, E., Dusseaux, M., Meyssonier, V., Premel, V., et al. (2010). Antimicrobial activity of mucosal-associated invariant T cells. *Nat. Immunol.* 11, 701–708.

Bourke, E., Bosisio, D., Golay, J., Polentarutti, N., and Mantovani, A. (2003). The toll-like receptor repertoire of human B lymphocytes: inducible and selective expression of TLR9 and TLR10 in normal and transformed cells. *Blood* 102, 956–963.

- Breij, E.C.W., Brink, B.P., Veerhuis, R., van den Berg, C., Vloet, R., Yan, R., Dijkstra, C.D., van der Valk, P., and Bö, L. (2008). Homogeneity of active demyelinating lesions in established multiple sclerosis. *Ann. Neurol.* *63*, 16–25.
- Briles, D.E., Nahm, M., Schroer, K., Davie, J., Baker, P., Kearney, J., and Barletta, R. (1981). Antiphosphocholine antibodies found in normal mouse serum are protective against intravenous infection with type 3 streptococcus pneumoniae. *J. Exp. Med.* *153*, 694–705.
- Brokstad, K.A., Page, M., Nyland, H., and Haaheim, L.R. (1994). Autoantibodies to myelin basic protein are not present in the serum and CSF of MS patients. *Acta Neurol. Scand.* *89*, 407–411.
- 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.
- Von Bülow, G.U., and Bram, R.J. (1997). NF-AT activation induced by a CAML-interacting member of the tumor necrosis factor receptor superfamily. *Science* *278*, 138–141.
- Burger, D., Steck, A.J., Bernard, C.C., and Kerlero de Rosbo, N. (1993). Human myelin/oligodendrocyte glycoprotein: a new member of the L2/HNK-1 family. *J. Neurochem.* *61*, 1822–1827.
- Burgio, G.R., and Monafò, V. (1983). Infectious mononucleosis fifty years after the discovery of the Paul-Bunnell test. *Infection* *11*, 1–5.
- Calabresi, P.A., Pelfrey, C.M., Tranquill, L.R., Maloni, H., and McFarland, H.F. (1997). VLA-4 expression on peripheral blood lymphocytes is downregulated after treatment of multiple sclerosis with interferon beta. *Neurology* *49*, 1111–1116.
- Calame, K.L. (2001). Plasma cells: finding new light at the end of B cell development. *Nat. Immunol.* *2*, 1103–1108.
- Caligaris-Cappio, F., Gobbi, M., Bofill, M., and Janossy, G. (1982). Infrequent normal B lymphocytes express features of B-chronic lymphocytic leukemia. *J. Exp. Med.* *155*, 623–628.
- Cambier, J.C., Pleiman, C.M., and Clark, M.R. (1994). Signal transduction by the B cell antigen receptor and its coreceptors. *Annu. Rev. Immunol.* *12*, 457–486.
- Cambier, J.C., Gauld, S.B., Merrell, K.T., and Vilen, B.J. (2007). B-cell anergy: from transgenic models to naturally occurring anergic B cells? *Nat. Rev. Immunol.* *7*, 633–643.
- Cao, Y., Gordic, M., Kobold, S., Lajmi, N., Meyer, S., Bartels, K., Hildebrandt, Y., Luetkens, T., Ihloff, A.S., Kröger, N., et al. (2010). An optimized assay for the enumeration of antigen-specific memory B cells in different compartments of the human body. *J. Immunol. Methods* *358*, 56–65.
- Carlens, C., Hergens, M.-P., Grunewald, J., Ekbom, A., Eklund, A., Höglund, C.O., and Askling, J. (2010). Smoking, use of moist snuff, and risk of chronic inflammatory diseases. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *181*, 1217–1222.

- Carrasco, Y.R., and Batista, F.D. (2007). B cells acquire particulate antigen in a macrophage-rich area at the boundary between the follicle and the subcapsular sinus of the lymph node. *Immunity* 27, 160–171.
- Carrizosa, A.M., Nicholson, L.B., Farzan, M., Southwood, S., Sette, A., Sobel, R.A., and Kuchroo, V.K. (1998). Expansion by self antigen is necessary for the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis by T cells primed with a cross-reactive environmental antigen. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 161, 3307–3314.
- Carroll, M.C., and Fischer, M.B. (1997). Complement and the immune response. *Curr. Opin. Immunol.* 9, 64–69.
- Carsetti, R. (2000). The development of B cells in the bone marrow is controlled by the balance between cell-autonomous mechanisms and signals from the microenvironment. *J. Exp. Med.* 191, 5–8.
- Carsetti, R., Köhler, G., and Lamers, M.C. (1995). Transitional B cells are the target of negative selection in the B cell compartment. *J. Exp. Med.* 181, 2129–2140.
- Casali, P., Burastero, S.E., Nakamura, M., Inghirami, G., and Notkins, A.L. (1987). Human lymphocytes making rheumatoid factor and antibody to ssDNA belong to Leu-1+ B-cell subset. *Science* 236, 77–81.
- Casiraghi, C., Dorovini-Zis, K., and Horwitz, M.S. (2011). Epstein-Barr virus infection of human brain microvessel endothelial cells: a novel role in multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.* 230, 173–177.
- Castillo-Trivino, T., Braithwaite, D., Bacchetti, P., and Waubant, E. (2013). Rituximab in relapsing and progressive forms of multiple sclerosis: a systematic review. *PloS One* 8, e66308.
- 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 J. Neurol.* 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 J. Neurol.* 128, 1667–1676.
- Chan, O.T., Hannum, L.G., Haberman, A.M., Madaio, M.P., and Shlomchik, M.J. (1999). A novel mouse with B cells but lacking serum antibody reveals an antibody-independent role for B cells in murine lupus. *J. Exp. Med.* 189, 1639–1648.
- Lee-Chang, C., Lefranc, D., Salleron, J., Faveeuw, C., Allet, C., Vermersch, P., Oxombre, B., and Prin, L. (2011). Susceptibility to experimental autoimmune encephalomyelitis is associated with altered B-cell subsets distribution and decreased serum BAFF levels. *Immunol. Lett.* 135, 108–117.
- Charles A Janeway, J., Travers, P., Walport, M., and Shlomchik, M.J. (2001). Antigen receptor structure and signaling pathways.

- Choi, Y.S., Kageyama, R., Eto, D., Escobar, T.C., Johnston, R.J., Monticelli, L., Lao, C., and Crotty, S. (2011). ICOS receptor instructs T follicular helper cell versus effector cell differentiation via induction of the transcriptional repressor Bcl6. *Immunity* 34, 932–946.
- Chou, Y.K., Bourdette, D.N., Offner, H., Whitham, R., Wang, R.Y., Hashim, G.A., and Vandenberg, A.A. (1992). Frequency of T cells specific for myelin basic protein and myelin proteolipid protein in blood and cerebrospinal fluid in multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.* 38, 105–113.
- Chumley, M.J., Dal Porto, J.M., Kawaguchi, S., Cambier, J.C., Nemazee, D., and Hardy, R.R. (2000). A VH11V kappa 9 B cell antigen receptor drives generation of CD5+ B cells both in vivo and in vitro. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 164, 4586–4593.
- Chun, J., and Hartung, H.-P. (2010). Mechanism of action of oral fingolimod (FTY720) in multiple sclerosis. *Clin. Neuropharmacol.* 33, 91–101.
- Cinamon, G., Matloubian, M., Lesneski, M.J., Xu, Y., Low, C., Lu, T., Proia, R.L., and Cyster, J.G. (2004). Sphingosine 1-phosphate receptor 1 promotes B cell localization in the splenic marginal zone. *Nat. Immunol.* 5, 713–720.
- Cinamon, G., Zachariah, M.A., Lam, O.M., Foss, F.W., Jr, and Cyster, J.G. (2008). Follicular shuttling of marginal zone B cells facilitates antigen transport. *Nat. Immunol.* 9, 54–62.
- Compston, A., and Coles, A. (2008). Multiple sclerosis. *Lancet* 372, 1502–1517.
- Confavreux, C., and Vukusic, S. (2006). Natural history of multiple sclerosis: a unifying concept. *Brain J. Neurol.* 129, 606–616.
- Confavreux, C., Hutchinson, M., Hours, M.M., Cortinovis-Tourniaire, P., and Moreau, T. (1998). Rate of pregnancy-related relapse in multiple sclerosis. Pregnancy in Multiple Sclerosis Group. *N. Engl. J. Med.* 339, 285–291.
- Confavreux, C., Vukusic, S., Moreau, T., and Adeleine, P. (2000). Relapses and progression of disability in multiple sclerosis. *N. Engl. J. Med.* 343, 1430–1438.
- Confavreux, C., Vukusic, S., and Adeleine, P. (2003). Early clinical predictors and progression of irreversible disability in multiple sclerosis: an amnesic process. *Brain J. Neurol.* 126, 770–782.
- Conley, M.E., Parolini, O., Rohrer, J., and Campana, D. (1994). X-linked agammaglobulinemia: new approaches to old questions based on the identification of the defective gene. *Immunol. Rev.* 138, 5–21.
- 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.
- Cross, A.H., Stark, J.L., Lauber, J., Ramsbottom, M.J., and Lyons, J.-A. (2006). Rituximab reduces B cells and T cells in cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients. *J. Neuroimmunol.* 180, 63–70.

- Crotty, S., Kersh, E.N., Cannons, J., Schwartzberg, P.L., and Ahmed, R. (2003a). SAP is required for generating long-term humoral immunity. *Nature* 421, 282–287.
- Crotty, S., Felgner, P., Davies, H., Glidewell, J., Villarreal, L., and Ahmed, R. (2003b). Cutting edge: long-term B cell memory in humans after smallpox vaccination. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 171, 4969–4973.
- Crotty, S., Aubert, R.D., Glidewell, J., and Ahmed, R. (2004). Tracking human antigen-specific memory B cells: a sensitive and generalized ELISPOT system. *J. Immunol. Methods* 286, 111–122.
- Cua, D.J., Sherlock, J., Chen, Y., Murphy, C.A., Joyce, B., Seymour, B., Lucian, L., To, W., Kwan, S., Churakova, T., et al. (2003). Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature* 421, 744–748.
- Cyster, J.G. (2010). B cell follicles and antigen encounters of the third kind. *Nat. Immunol.* 11, 989–996.
- Cyster, J.G., and Goodnow, C.C. (1997). Tuning Antigen Receptor Signaling by CD22: Integrating Cues from Antigens and the Microenvironment. *Immunity* 6, 509–517.
- Cyster, J.G., Healy, J.I., Kishihara, K., Mak, T.W., Thomas, M.L., and Goodnow, C.C. (1996). Regulation of B-lymphocyte negative and positive selection by tyrosine phosphatase CD45. *Nature* 381, 325–328.
- Daniels, B.P., Cruz-Orengo, L., Pasiaka, T.J., Couraud, P.-O., Romero, I.A., Weksler, B., Cooper, J.A., Doering, T.L., and Klein, R.S. (2013). Immortalized human cerebral microvascular endothelial cells maintain the properties of primary cells in an in vitro model of immune migration across the blood brain barrier. *J. Neurosci. Methods* 212, 173–179.
- Darrasse-Jèze, G., Deroubaix, S., Mouquet, H., Victora, G.D., Eisenreich, T., Yao, K., Masilamani, R.F., Dustin, M.L., Rudensky, A., Liu, K., et al. (2009). Feedback control of regulatory T cell homeostasis by dendritic cells in vivo. *J. Exp. Med.* 206, 1853–1862.
- Dauphinée, M., Tovar, Z., and Talal, N. (1988). B cells expressing CD5 are increased in Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum.* 31, 642–647.
- Derfuss, T., Parikh, K., Velhin, S., Braun, M., Mathey, E., Krumbholz, M., Kümpfel, T., Moldenhauer, A., Rader, C., Sonderegger, P., et al. (2009). Contactin-2/TAG-1-directed autoimmunity is identified in multiple sclerosis patients and mediates gray matter pathology in animals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 8302–8307.
- Doster, A., Ziegler, S., Foermer, S., Rieker, R.J., Heeg, K., and Bekeredjian-Ding, I. (2013). Phosphorothioate-modified CpG oligodeoxynucleotides mimic autoantigens and reveal a potential role for Toll-like receptor 9 in receptor revision. *Immunology* 139, 166–178.
- Duddy, M., Niino, M., Adatia, F., Hebert, S., Freedman, M., Atkins, H., Kim, H.J., and Bar-Or, A. (2007). Distinct effector cytokine profiles of memory and naive human B cell subsets and implication in multiple sclerosis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 178, 6092–6099.
- Duddy, M.E., Alter, A., and Bar-Or, A. (2004). Distinct profiles of human B cell effector cytokines: a role in immune regulation? *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 172, 3422–3427.

- Dyment, D.A., Ebers, G.C., and Sadovnick, A.D. (2004). Genetics of multiple sclerosis. *Lancet Neurol.* 3, 104–110.
- Ebers, G.C., Sadovnick, A.D., and Risch, N.J. (1995). A genetic basis for familial aggregation in multiple sclerosis. Canadian Collaborative Study Group. *Nature* 377, 150–151.
- Edan, G., Miller, D., Clanet, M., Confavreux, C., Lyon-Caen, O., Lubetzki, C., Brochet, B., Berry, I., Rolland, Y., Froment, J.C., et al. (1997). Therapeutic effect of mitoxantrone combined with methylprednisolone in multiple sclerosis: a randomised multicentre study of active disease using MRI and clinical criteria. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 62, 112–118.
- Egawa, T., Kawabata, K., Kawamoto, H., Amada, K., Okamoto, R., Fujii, N., Kishimoto, T., Katsura, Y., and Nagasawa, T. (2001). The earliest stages of B cell development require a chemokine stromal cell-derived factor/pre-B cell growth-stimulating factor. *Immunity* 15, 323–334.
- Elong Ngonu, A., Pettré, S., Salou, M., Bahbouhi, B., Soulillou, J.-P., Brouard, S., and Laplaud, D.-A. (2012). Frequency of circulating autoreactive T cells committed to myelin determinants in relapsing-remitting multiple sclerosis patients. *Clin. Immunol. Orlando Fla* 144, 117–126.
- Enders, A., Bouillet, P., Puthalakath, H., Xu, Y., Tarlinton, D.M., and Strasser, A. (2003). Loss of the pro-apoptotic BH3-only Bcl-2 family member Bim inhibits BCR stimulation-induced apoptosis and deletion of autoreactive B cells. *J. Exp. Med.* 198, 1119–1126.
- Engelhardt, B., and Sorokin, L. (2009). The blood-brain and the blood-cerebrospinal fluid barriers: function and dysfunction. *Semin. Immunopathol.* 31, 497–511.
- Ercolini, A.M., and Miller, S.D. (2006). Mechanisms of immunopathology in murine models of central nervous system demyelinating disease. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 176, 3293–3298.
- Eriksson, M., Andersen, O., and Runmarker, B. (2003). Long-term follow up of patients with clinically isolated syndromes, relapsing-remitting and secondary progressive multiple sclerosis. *Mult. Scler. Houndmills Basingstoke Engl.* 9, 260–274.
- Esiri, M.M. (1977). Immunoglobulin-containing cells in multiple-sclerosis plaques. *Lancet* 2, 478.
- Eugster, H.P., Frei, K., Kopf, M., Lassmann, H., and Fontana, A. (1998). IL-6-deficient mice resist myelin oligodendrocyte glycoprotein-induced autoimmune encephalomyelitis. *Eur. J. Immunol.* 28, 2178–2187.
- Evans, J.G., Chavez-Rueda, K.A., Eddaoudi, A., Meyer-Bahlburg, A., Rawlings, D.J., Ehrenstein, M.R., and Mauri, C. (2007). Novel suppressive function of transitional 2 B cells in experimental arthritis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 178, 7868–7878.
- Fecteau, J.F., Côté, G., and Néron, S. (2006). A new memory CD27-IgG+ B cell population in peripheral blood expressing VH genes with low frequency of somatic mutation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 177, 3728–3736.

- Feger, U., Luther, C., Poeschel, S., Melms, A., Tolosa, E., and Wiendl, H. (2007). Increased frequency of CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells in the cerebrospinal fluid but not in the blood of multiple sclerosis patients. *Clin. Exp. Immunol.* *147*, 412–418.
- Ferrari-Lacraz, S., Tiercy, J.-M., and Villard, J. (2012). Detection of anti-HLA antibodies by solid-phase assay in kidney transplantation: friend or foe? *Tissue Antigens* *79*, 315–325.
- Fidler, J.M., DeJoy, S.Q., Smith, F.R., 3rd, and Gibbons, J.J., Jr (1986). Selective immunomodulation by the antineoplastic agent mitoxantrone. II. Nonspecific adherent suppressor cells derived from mitoxantrone-treated mice. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *136*, 2747–2754.
- Fillatreau, S., Sweenie, C.H., McGeachy, M.J., Gray, D., and Anderton, S.M. (2002). B cells regulate autoimmunity by provision of IL-10. *Nat. Immunol.* *3*, 944–950.
- Fillatreau, S., Gray, D., and Anderton, S.M. (2008). Not always the bad guys: B cells as regulators of autoimmune pathology. *Nat. Rev. Immunol.* *8*, 391–397.
- Flaswinkel, H., and Reth, M. (1994). Dual role of the tyrosine activation motif of the Ig-alpha protein during signal transduction via the B cell antigen receptor. *EMBO J.* *13*, 83–89.
- Fontenot, J.D., Gavin, M.A., and Rudensky, A.Y. (2003). Foxp3 programs the development and function of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *Nat. Immunol.* *4*, 330–336.
- Förster, R., Schubel, A., Breitfeld, D., Kremmer, E., Renner-Müller, I., Wolf, E., and Lipp, M. (1999). CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs. *Cell* *99*, 23–33.
- Franciotta, D., Salvetti, M., Lolli, F., Serafini, B., and Aloisi, F. (2008). B cells and multiple sclerosis. *Lancet Neurol.* *7*, 852–858.
- Franz, B., May, K.F., Jr, Dranoff, G., and Wucherpfennig, K. (2011). Ex vivo characterization and isolation of rare memory B cells with antigen tetramers. *Blood* *118*, 348–357.
- Fraser, K.B., Haire, M., Millar, J.H., and McCrea, S. (1979). Increased tendency to spontaneous in-vitro lymphocyte transformation in clinically active multiple sclerosis. *Lancet* *2*, 175–176.
- Freedman, M.S., Thompson, E.J., Deisenhammer, F., Giovannoni, G., Grimsley, G., Keir, G., Ohman, S., Racke, M.K., Sharief, M., Sindic, C.J.M., et al. (2005). Recommended standard of cerebrospinal fluid analysis in the diagnosis of multiple sclerosis: a consensus statement. *Arch. Neurol.* *62*, 865–870.
- Friese, M.A., and Fugger, L. (2009). Pathogenic CD8(+) T cells in multiple sclerosis. *Ann. Neurol.* *66*, 132–141.
- Fromont, A., Binquet, C., Sauleau, E.A., Fournel, I., Bellisario, A., Adnet, J., Weill, A., Vukusic, S., Confavreux, C., Debouverie, M., et al. (2010). Geographic variations of multiple sclerosis in France. *Brain J. Neurol.* *133*, 1889–1899.

- Fuentes-Pananá, E.M., Bannish, G., and Monroe, J.G. (2004). Basal B-cell receptor signaling in B lymphocytes: mechanisms of regulation and role in positive selection, differentiation, and peripheral survival. *Immunol. Rev.* 197, 26–40.
- Gay, D., Saunders, T., Camper, S., and Weigert, M. (1993). Receptor editing: an approach by autoreactive B cells to escape tolerance. *J. Exp. Med.* 177, 999–1008.
- Genain, C.P., Cannella, B., Hauser, S.L., and Raine, C.S. (1999). Identification of autoantibodies associated with myelin damage in multiple sclerosis. *Nat. Med.* 5, 170–175.
- 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.
- Gerritse, K., Deen, C., Fasbender, M., Ravid, R., Boersma, W., and Claassen, E. (1994). The involvement of specific anti myelin basic protein antibody-forming cells in multiple sclerosis immunopathology. *J. Neuroimmunol.* 49, 153–159.
- Gibb, D.R., El Shikh, M., Kang, D.-J., Rowe, W.J., El Sayed, R., Cichy, J., Yagita, H., Tew, J.G., Dempsey, P.J., Crawford, H.C., et al. (2010). ADAM10 is essential for Notch2-dependent marginal zone B cell development and CD23 cleavage in vivo. *J. Exp. Med.* 207, 623–635.
- Gibney, E.M., Cagle, L.R., Freed, B., Warnell, S.E., Chan, L., and Wiseman, A.C. (2006). Detection of donor-specific antibodies using HLA-coated microspheres: another tool for kidney transplant risk stratification. *Nephrol. Dial. Transplant. Off. Publ. Eur. Dial. Transpl. Assoc. - Eur. Ren. Assoc.* 21, 2625–2629.
- Goldmann E (1913) Vitalfärbung am zentral nerven system. Beitrag zur physiologie des plexus choroidus und der hirnhaut. Berlin
- Gong, S., and Nussenzweig, M.C. (1996). Regulation of an early developmental checkpoint in the B cell pathway by Ig beta. *Science* 272, 411–414.
- González-García, I., Ocaña, E., Jiménez-Gómez, G., Campos-Caro, A., and Brieva, J.A. (2006). Immunization-induced perturbation of human blood plasma cell pool: progressive maturation, IL-6 responsiveness, and high PRDI-BF1/BLIMP1 expression are critical distinctions between antigen-specific and nonspecific plasma cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 176, 4042–4050.
- Gorelik, L., Cutler, A.H., Thill, G., Miklasz, S.D., Shea, D.E., Ambrose, C., Bixler, S.A., Su, L., Scott, M.L., and Kalled, S.L. (2004). Cutting edge: BAFF regulates CD21/35 and CD23 expression independent of its B cell survival function. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 172, 762–766.
- Goverman, J. (2009). Autoimmune T cell responses in the central nervous system. *Nat. Rev. Immunol.* 9, 393–407.
- De Graaf, M.T., Smitt, P.A.E.S., Luitwieler, R.L., van Velzen, C., van den Broek, P.D.M., Kraan, J., and Gratama, J.W. (2011). Central memory CD4+ T cells dominate the normal cerebrospinal fluid. *Cytometry B Clin. Cytom.* 80, 43–50.

- Greter, M., Heppner, F.L., Lemos, M.P., Odermatt, B.M., Goebels, N., Laufer, T., Noelle, R.J., and Becher, B. (2005). Dendritic cells permit immune invasion of the CNS in an animal model of multiple sclerosis. *Nat. Med.* *11*, 328–334.
- Grieb, P., Forster, R.E., Strome, D., Goodwin, C.W., and Pape, P.C. (1985). O₂ exchange between blood and brain tissues studied with 18O₂ indicator-dilution technique. *J. Appl. Physiol.* Bethesda Md 1985 *58*, 1929–1941.
- Griffin, D.O., and Rothstein, T.L. (2011). A small CD11b(+) human B1 cell subpopulation stimulates T cells and is expanded in lupus. *J. Exp. Med.* *208*, 2591–2598.
- Griffin, D.O., and Rothstein, T.L. (2012). Human b1 cell frequency: isolation and analysis of human b1 cells. *Front. Immunol.* *3*, 122.
- Griffin, D.O., Holodick, N.E., and Rothstein, T.L. (2011). Human B1 cells in umbilical cord and adult peripheral blood express the novel phenotype CD20⁺ CD27⁺ CD43⁺ CD70⁻. *J. Exp. Med.* *208*, 67–80.
- Guo, B., Kato, R.M., Garcia-Lloret, M., Wahl, M.I., and Rawlings, D.J. (2000). Engagement of the human pre-B cell receptor generates a lipid raft-dependent calcium signaling complex. *Immunity* *13*, 243–253.
- Gutcher, I., and Becher, B. (2007). APC-derived cytokines and T cell polarization in autoimmune inflammation. *J. Clin. Invest.* *117*, 1119–1127.
- 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⁺CD25^{high} regulatory T cells on the T cell immune response against myelin oligodendrocyte glycoprotein in patients with multiple sclerosis. *Eur. J. Immunol.* *35*, 3343–3352.
- Hahne, M., Kataoka, T., Schröter, M., Hofmann, K., Irmeler, M., Bodmer, J.L., Schneider, P., Bornand, T., Holler, N., French, L.E., et al. (1998). APRIL, a new ligand of the tumor necrosis factor family, stimulates tumor cell growth. *J. Exp. Med.* *188*, 1185–1190.
- Haines, J.L., Terwedow, H.A., Burgess, K., Pericak-Vance, M.A., Rimmler, J.B., Martin, E.R., Oksenberg, J.R., Lincoln, R., Zhang, D.Y., Banatao, D.R., et al. (1998). Linkage of the MHC to familial multiple sclerosis suggests genetic heterogeneity. The Multiple Sclerosis Genetics Group. *Hum. Mol. Genet.* *7*, 1229–1234.
- Handel, A.E., Ebers, G.C., and Ramagopalan, S.V. (2010). Epigenetics: molecular mechanisms and implications for disease. *Trends Mol. Med.* *16*, 7–16.
- Hannum, L.G., Ni, D., Haberman, A.M., Weigert, M.G., and Shlomchik, M.J. (1996). A disease-related rheumatoid factor autoantibody is not tolerized in a normal mouse: implications for the origins of autoantibodies in autoimmune disease. *J. Exp. Med.* *184*, 1269–1278.
- Hardy, R.R., and Hayakawa, K. (2001). B cell development pathways. *Annu. Rev. Immunol.* *19*, 595–621.
- 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.

Hauser, S.L., and Oksenberg, J.R. (2006). The neurobiology of multiple sclerosis: genes, inflammation, and neurodegeneration. *Neuron* *52*, 61–76.

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.

Hayakawa, K., and Hardy, R.R. (2000). Development and function of B-1 cells. *Curr. Opin. Immunol.* *12*, 346–353.

Hayakawa, K., Hardy, R.R., Parks, D.R., and Herzenberg, L.A. (1983). The “Ly-1 B” cell subpopulation in normal immunodeficient, and autoimmune mice. *J. Exp. Med.* *157*, 202–218.

Hayakawa, K., Hardy, R.R., Honda, M., Herzenberg, L.A., Steinberg, A.D., and Herzenberg, L.A. (1984). Ly-1 B cells: functionally distinct lymphocytes that secrete IgM autoantibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *81*, 2494–2498.

Hayakawa, K., Hardy, R.R., Herzenberg, L.A., and Herzenberg, L.A. (1985). Progenitors for Ly-1 B cells are distinct from progenitors for other B cells. *J. Exp. Med.* *161*, 1554–1568.

Hayakawa, K., Hardy, R.R., Stall, A.M., Herzenberg, L.A., and Herzenberg, L.A. (1986). Immunoglobulin-bearing B cells reconstitute and maintain the murine Ly-1 B cell lineage. *Eur. J. Immunol.* *16*, 1313–1316.

He, B., Santamaria, R., Xu, W., Cols, M., Chen, K., Puga, I., Shan, M., Xiong, H., Bussell, J.B., Chiu, A., et al. (2010). The transmembrane activator TACI triggers immunoglobulin class switching by activating B cells through the adaptor MyD88. *Nat. Immunol.* *11*, 836–845.

Healy, B.C., Ali, E.N., Guttmann, C.R.G., Chitnis, T., Glanz, B.I., Buckle, G., Houtchens, M., Stazzone, L., Moodie, J., Berger, A.M., et al. (2009). Smoking and disease progression in multiple sclerosis. *Arch. Neurol.* *66*, 858–864.

Hellings, N., Barée, M., Verhoeven, C., D’hooghe, M.B., Medaer, R., Bernard, C.C., Raus, J., and Stinissen, P. (2001). T-cell reactivity to multiple myelin antigens in multiple sclerosis patients and healthy controls. *J. Neurosci. Res.* *63*, 290–302.

Hernán, M.A., Jick, S.S., Logroscino, G., Olek, M.J., Ascherio, A., and Jick, H. (2005). Cigarette smoking and the progression of multiple sclerosis. *Brain J. Neurol.* *128*, 1461–1465.

Hinson, S.R., Romero, M.F., Popescu, B.F.G., Lucchinetti, C.F., Fryer, J.P., Wolburg, H., Fallier-Becker, P., Noell, S., and Lennon, V.A. (2012). Molecular outcomes of neuromyelitis optica (NMO)-IgG binding to aquaporin-4 in astrocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *109*, 1245–1250.

- Hirotsani, M., Niino, M., Fukazawa, T., Kikuchi, S., Yabe, I., Hamada, S., Tajima, Y., and Sasaki, H. (2010). Decreased IL-10 production mediated by Toll-like receptor 9 in B cells in multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.* *221*, 95–100.
- Ho, W.Y., Cooke, M.P., Goodnow, C.C., and Davis, M.M. (1994). Resting and anergic B cells are defective in CD28-dependent costimulation of naive CD4+ T cells. *J. Exp. Med.* *179*, 1539–1549.
- Hofman, F.M., Hinton, D.R., Johnson, K., and Merrill, J.E. (1989). Tumor necrosis factor identified in multiple sclerosis brain. *J. Exp. Med.* *170*, 607–612.
- Hofstetter, H.H., Shive, C.L., and Forsthuber, T.G. (2002). Pertussis toxin modulates the immune response to neuroantigens injected in incomplete Freund's adjuvant: induction of Th1 cells and experimental autoimmune encephalomyelitis in the presence of high frequencies of Th2 cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *169*, 117–125.
- Hori, S., Nomura, T., and Sakaguchi, S. (2003). Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* *299*, 1057–1061.
- International Multiple Sclerosis Genetics Consortium, Hafler, D.A., Compston, A., Sawcer, S., Lander, E.S., Daly, M.J., De Jager, P.L., de Bakker, P.I.W., Gabriel, S.B., Mirel, D.B., et al. (2007). Risk alleles for multiple sclerosis identified by a genomewide study. *N. Engl. J. Med.* *357*, 851–862.
- Ishida, H., Muchamuel, T., Sakaguchi, S., Andrade, S., Menon, S., and Howard, M. (1994). Continuous administration of anti-interleukin 10 antibodies delays onset of autoimmunity in NZB/W F1 mice. *J. Exp. Med.* *179*, 305–310.
- Iskra, S., Kalla, M., Delecluse, H.-J., Hammerschmidt, W., and Moosmann, A. (2010). Toll-like receptor agonists synergistically increase proliferation and activation of B cells by Epstein-Barr virus. *J. Virol.* *84*, 3612–3623.
- Isnardi, I., Ng, Y.-S., Srdanovic, I., Motaghedi, R., Rudchenko, S., von Bernuth, H., Zhang, S.-Y., Puel, A., Jouanguy, E., Picard, C., et al. (2008). IRAK-4- and MyD88-dependent pathways are essential for the removal of developing autoreactive B cells in humans. *Immunity* *29*, 746–757.
- Itoyama, Y., and Webster, H.D. (1982). Immunocytochemical study of myelin-associated glycoprotein (MAG) and basic protein (BP) in acute experimental allergic encephalomyelitis (EAE). *J. Neuroimmunol.* *3*, 351–364.
- Iwata, Y., Matsushita, T., Horikawa, M., Dilillo, D.J., Yanaba, K., Venturi, G.M., Szabolcs, P.M., Bernstein, S.H., Magro, C.M., Williams, A.D., et al. (2011). Characterization of a rare IL-10-competent B-cell subset in humans that parallels mouse regulatory B10 cells. *Blood* *117*, 530–541.
- Jackson, S.M., Wilson, P.C., James, J.A., and Capra, J.D. (2008). Human B cell subsets. *Adv. Immunol.* *98*, 151–224.
- Jelinek, D.F., Splawski, J.B., and Lipsky, P.E. (1986). Human peripheral blood B lymphocyte subpopulations: functional and phenotypic analysis of surface IgD positive and negative subsets. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *136*, 83–92.

- Jeon, S.-B., Yoon, H.J., Park, S.-H., Kim, I.-H., and Park, E.J. (2008). Sulfatide, A Major Lipid Component of Myelin Sheath, Activates Inflammatory Responses As an Endogenous Stimulator in Brain-Resident Immune Cells. *J. Immunol.* *181*, 8077–8087.
- Jiang, W., Lederman, M.M., Harding, C.V., Rodriguez, B., Mohner, R.J., and Sieg, S.F. (2007). TLR9 stimulation drives naïve B cells to proliferate and to attain enhanced antigen presenting function. *Eur. J. Immunol.* *37*, 2205–2213.
- Jin, G., Hamaguchi, Y., Matsushita, T., Hasegawa, M., Le Huu, D., Ishiura, N., Naka, K., Hirao, A., Takehara, K., and Fujimoto, M. (2013). B-cell linker protein expression contributes to controlling allergic and autoimmune diseases by mediating IL-10 production in regulatory B cells. *J. Allergy Clin. Immunol.* *131*, 1674–1682.e9.
- Johns, T.G., and Bernard, C.C. (1997). Binding of complement component Clq to myelin oligodendrocyte glycoprotein: a novel mechanism for regulating CNS inflammation. *Mol. Immunol.* *34*, 33–38.
- Johns, T.G., and Bernard, C.C. (1999). The structure and function of myelin oligodendrocyte glycoprotein. *J. Neurochem.* *72*, 1–9.
- Johnson, K.P., Brooks, B.R., Cohen, J.A., Ford, C.C., Goldstein, J., Lisak, R.P., Myers, L.W., Panitch, H.S., Rose, J.W., and Schiffer, R.B. (1995). Copolymer 1 reduces relapse rate and improves disability in relapsing-remitting multiple sclerosis: results of a phase III multicenter, double-blind placebo-controlled trial. The Copolymer 1 Multiple Sclerosis Study Group. *Neurology* *45*, 1268–1276.
- Johnson, K.P., Brooks, B.R., Ford, C.C., Goodman, A., Guarnaccia, J., Lisak, R.P., Myers, L.W., Panitch, H.S., Pruitt, A., Rose, J.W., et al. (2000). Sustained clinical benefits of glatiramer acetate in relapsing multiple sclerosis patients observed for 6 years. Copolymer 1 Multiple Sclerosis Study Group. *Mult. Scler. Houndmills Basingstoke Engl.* *6*, 255–266.
- Joly, E., and Hudrisier, D. (2003). What is trogocytosis and what is its purpose? *Nat. Immunol.* *4*, 815.
- Jourdan, M., Caraux, A., De Vos, J., Fiol, G., Larroque, M., Cognot, C., Bret, C., Duperray, C., Hose, D., and Klein, B. (2009). An in vitro model of differentiation of memory B cells into plasmablasts and plasma cells including detailed phenotypic and molecular characterization. *Blood* *114*, 5173–5181.
- 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 J. Neurol.* *130*, 2789–2799.
- KABAT, E.A., GLUSMAN, M., and KNAUB, V. (1948). Quantitative estimation of the albumin and gamma globulin in normal and pathologic cerebrospinal fluid by immunochemical methods. *Am. J. Med.* *4*, 653–662.
- Kallies, A., Hasbold, J., Fairfax, K., Pridans, C., Emslie, D., McKenzie, B.S., Lew, A.M., Corcoran, L.M., Hodgkin, P.D., Tarlinton, D.M., et al. (2007). Initiation of plasma-cell differentiation is independent of the transcription factor Blimp-1. *Immunity* *26*, 555–566.

- Kamburova, E.G., Koenen, H.J.P.M., Boon, L., Hilbrands, L.B., and Joosten, I. (2012). In vitro effects of rituximab on the proliferation, activation and differentiation of human B cells. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* *12*, 341–350.
- Kamburova, E.G., Koenen, H.J.P.M., Borgman, K.J.E., ten Berge, I.J., Joosten, I., and Hilbrands, L.B. (2013). A Single Dose of Rituximab Does Not Deplete B Cells in Secondary Lymphoid Organs but Alters Phenotype and Function. *Am. J. Transplant.* *13*, 1503–1511.
- Kanter, J.L., Narayana, S., Ho, P.P., Catz, I., Warren, K.G., Sobel, R.A., Steinman, L., and Robinson, W.H. (2006). Lipid microarrays identify key mediators of autoimmune brain inflammation. *Nat. Med.* *12*, 138–143.
- Kappos, L., Radue, E.-W., O'Connor, P., Polman, C., Hohlfeld, R., Calabresi, P., Selmaj, K., Agoropoulou, C., Leyk, M., Zhang-Auberson, L., et al. (2010). A placebo-controlled trial of oral fingolimod in relapsing multiple sclerosis. *N. Engl. J. Med.* *362*, 387–401.
- Kawai, T., and Akira, S. (2007). TLR signaling. *Semin. Immunol.* *19*, 24–32.
- Kawai, T., and Akira, S. (2008). Toll-like receptor and RIG-I-like receptor signaling. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *1143*, 1–20.
- 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.
- Kennedy, M.K., Tan, L.J., Dal Canto, M.C., Tuohy, V.K., Lu, Z.J., Trotter, J.L., and Miller, S.D. (1990). Inhibition of murine relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis by immune tolerance to proteolipid protein and its encephalitogenic peptides. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *144*, 909–915.
- Khare, M., Mangalam, A., Rodriguez, M., and David, C.S. (2005). HLA DR and DQ interaction in myelin oligodendrocyte glycoprotein-induced experimental autoimmune encephalomyelitis in HLA class II transgenic mice. *J. Neuroimmunol.* *169*, 1–12.
- Kimball, S.M., Ursell, M.R., O'Connor, P., and Vieth, R. (2007). Safety of vitamin D3 in adults with multiple sclerosis. *Am. J. Clin. Nutr.* *86*, 645–651.
- Kinnunen, T., Chamberlain, N., Morbach, H., Cantaert, T., Lynch, M., Preston-Hurlburt, P., Herold, K.C., Hafler, D.A., O'Connor, K.C., and Meffre, E. (2013). Specific peripheral B cell tolerance defects in patients with multiple sclerosis. *J. Clin. Invest.* *123*, 2737–2741.
- Kinoshita, H., Takai, T., Le, T.A., Kamijo, S., Wang, X.L., Ushio, H., Hara, M., Kawasaki, J., Vu, A.T., Ogawa, T., et al. (2009). Cytokine milieu modulates release of thymic stromal lymphopoietin from human keratinocytes stimulated with double-stranded RNA. *J. Allergy Clin. Immunol.* *123*, 179–186.
- Kitamura, D., Kudo, A., Schaal, S., Müller, W., Melchers, F., and Rajewsky, K. (1992). A critical role of lambda 5 protein in B cell development. *Cell* *69*, 823–831.
- Klein, U., Rajewsky, K., and Küppers, R. (1998a). Human Immunoglobulin (Ig)M+IgD+ Peripheral Blood B Cells Expressing the CD27 Cell Surface Antigen Carry Somatic

Mutated Variable Region Genes: CD27 as a General Marker for Somatically Mutated (Memory) B Cells. *J. Exp. Med.* 188, 1679–1689.

Klein, U., Goossens, T., Fischer, M., Kanzler, H., Braeuninger, A., Rajewsky, K., and Küppers, R. (1998b). Somatic hypermutation in normal and transformed human B cells. *Immunol. Rev.* 162, 261–280.

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.

Koch, M., van Harten, A., Uyttenboogaart, M., and De Keyser, J. (2007). Cigarette smoking and progression in multiple sclerosis. *Neurology* 69, 1515–1520.

Koelsch, K., Zheng, N.-Y., Zhang, Q., Duty, A., Helms, C., Mathias, M.D., Jared, M., Smith, K., Capra, J.D., and Wilson, P.C. (2007). Mature B cells class switched to IgD are autoreactive in healthy individuals. *J. Clin. Invest.* 117, 1558–1565.

Kofuji, P., Ceelen, P., Zahs, K.R., Surbeck, L.W., Lester, H.A., and Newman, E.A. (2000). Genetic inactivation of an inwardly rectifying potassium channel (Kir4.1 subunit) in mice: phenotypic impact in retina. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 20, 5733–5740.

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. Baltim. Md 1950* 169, 4712–4716.

Kolar, G.R., Mehta, D., Pelayo, R., and Capra, J.D. (2007). A novel human B cell subpopulation representing the initial germinal center population to express AID. *Blood* 109, 2545–2552.

Komiyama, Y., Nakae, S., Matsuki, T., Nambu, A., Ishigame, H., Kakuta, S., Sudo, K., and Iwakura, Y. (2006). IL-17 plays an important role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 177, 566–573.

Korn, T., Bettelli, E., Oukka, M., and Kuchroo, V.K. (2009). IL-17 and Th17 Cells. *Annu. Rev. Immunol.* 27, 485–517.

Kremenutzky, M., Rice, G.P.A., Baskerville, J., Wingerchuk, D.M., and Ebers, G.C. (2006). The natural history of multiple sclerosis: a geographically based study 9: observations on the progressive phase of the disease. *Brain J. Neurol.* 129, 584–594.

Krishnamoorthy, G., Lassmann, H., Wekerle, H., and Holz, A. (2006). Spontaneous opticospinal encephalomyelitis in a double-transgenic mouse model of autoimmune T cell/B cell cooperation. *J. Clin. Invest.* 116, 2385–2392.

Kroese, F.G., Butcher, E.C., Stall, A.M., Lalor, P.A., Adams, S., and Herzenberg, L.A. (1989). Many of the IgA producing plasma cells in murine gut are derived from self-replenishing precursors in the peritoneal cavity. *Int. Immunol.* 1, 75–84.

- Kruetzmann, S., Rosado, M.M., Weber, H., Germing, U., Tournilhac, O., Peter, H.-H., Berner, R., Peters, A., Boehm, T., Plebani, A., et al. (2003). Human immunoglobulin M memory B cells controlling *Streptococcus pneumoniae* infections are generated in the spleen. *J. Exp. Med.* *197*, 939–945.
- Krumbholz, M., Theil, D., Derfuss, T., Rosenwald, A., Schrader, F., Monoranu, C.-M., Kalled, S.L., Hess, D.M., Serafini, B., Aloisi, F., et al. (2005). BAFF is produced by astrocytes and up-regulated in multiple sclerosis lesions and primary central nervous system lymphoma. *J. Exp. Med.* *201*, 195–200.
- 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 J. Neurol.* *129*, 200–211.
- 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.
- 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. *J. Neuroimmunol.* *180*, 178–184.
- Kurtzke, J.F. (1975). A reassessment of the distribution of multiple sclerosis. Part one. *Acta Neurol. Scand.* *51*, 110–136.
- Lafaille, J.J., Nagashima, K., Katsuki, M., and Tonegawa, S. (1994). High incidence of spontaneous autoimmune encephalomyelitis in immunodeficient anti-myelin basic protein T cell receptor transgenic mice. *Cell* *78*, 399–408.
- Lampropoulou, V., Hoehlig, K., Roch, T., Neves, P., Calderón Gómez, E., Sweenie, C.H., Hao, Y., Freitas, A.A., Steinhoff, U., Anderton, S.M., et al. (2008). TLR-activated B cells suppress T cell-mediated autoimmunity. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *180*, 4763–4773.
- 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.
- Lanzavecchia, A. (1985). Antigen-specific interaction between T and B cells. *Nature* *314*, 537–539.
- Larochelle, C., Alvarez, J.I., and Prat, A. (2011). How do immune cells overcome the blood-brain barrier in multiple sclerosis? *FEBS Lett.* *585*, 3770–3780.
- Law, D.A., Chan, V.W., Datta, S.K., and DeFranco, A.L. (1993). B-cell antigen receptor motifs have redundant signalling capabilities and bind the tyrosine kinases PTK72, Lyn and Fyn. *Curr. Biol. CB* *3*, 645–657.
- Lazorchak, A.S., Schlissel, M.S., and Zhuang, Y. (2006). E2A and IRF-4/Pip promote chromatin modification and transcription of the immunoglobulin kappa locus in pre-B cells. *Mol. Cell. Biol.* *26*, 810–821.

- Lebar, R., Boutry, J.M., Vincent, C., Robineaux, R., and Voisin, G.A. (1976). Studies on autoimmune encephalomyelitis in the guinea pig. II. An in vitro investigation on the nature, properties, and specificity of the serum-demyelinating factor. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 *116*, 1439–1446.
- Lee, D.-H., and Linker, R.A. (2012). The role of myelin oligodendrocyte glycoprotein in autoimmune demyelination: a target for multiple sclerosis therapy? *Expert Opin. Ther. Targets*.
- Lennon, V.A., Kryzer, T.J., Pittock, S.J., Verkman, A.S., and Hinson, S.R. (2005). IgG marker of optic-spinal multiple sclerosis binds to the aquaporin-4 water channel. *J. Exp. Med.* *202*, 473–477.
- Lesley, R., Xu, Y., Kalled, S.L., Hess, D.M., Schwab, S.R., Shu, H.-B., and Cyster, J.G. (2004). Reduced competitiveness of autoantigen-engaged B cells due to increased dependence on BAFF. *Immunity* *20*, 441–453.
- Levin, L.I., Munger, K.L., Rubertone, M.V., Peck, C.A., Lennette, E.T., Spiegelman, D., and Ascherio, A. (2005). Temporal relationship between elevation of epstein-barr virus antibody titers and initial onset of neurological symptoms in multiple sclerosis. *JAMA J. Am. Med. Assoc.* *293*, 2496–2500.
- Leyendeckers, H., Odendahl, M., Löhndorf, A., Irsch, J., Spangfort, M., Miltenyi, S., Hunzelmann, N., Assenmacher, M., Radbruch, A., and Schmitz, J. (1999). Correlation analysis between frequencies of circulating antigen-specific IgG-bearing memory B cells and serum titers of antigen-specific IgG. *Eur. J. Immunol.* *29*, 1406–1417.
- Leyendeckers, H., Voth, E., Schicha, H., Hunzelmann, N., Banga, P., and Schmitz, J. (2002). Frequent detection of thyroid peroxidase-specific IgG⁺ memory B cells in blood of patients with autoimmune thyroid disease. *Eur. J. Immunol.* *32*, 3126–3132.
- Li, G., Crang, A.J., Rundle, J.L., and Blakemore, W.F. (2002a). Oligodendrocyte progenitor cells in the adult rat CNS express myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG). *Brain Pathol. Zurich Switz.* *12*, 463–471.
- Li, L., Head, V., and Timpe, L.C. (2001). Identification of an inward rectifier potassium channel gene expressed in mouse cortical astrocytes. *Glia* *33*, 57–71.
- Li, Y., Li, H., and Weigert, M. (2002b). Autoreactive B cells in the marginal zone that express dual receptors. *J. Exp. Med.* *195*, 181–188.
- Linington, C., Bradl, M., Lassmann, H., Brunner, C., and Vass, K. (1988). Augmentation of demyelination in rat acute allergic encephalomyelitis by circulating mouse monoclonal antibodies directed against a myelin/oligodendrocyte glycoprotein. *Am. J. Pathol.* *130*, 443–454.
- Linington, C., Berger, T., Perry, L., Weerth, S., Hinze-Selch, D., Zhang, Y., Lu, H.C., Lassmann, H., and Wekerle, H. (1993). T cells specific for the myelin oligodendrocyte glycoprotein mediate an unusual autoimmune inflammatory response in the central nervous system. *Eur. J. Immunol.* *23*, 1364–1372.

- Litzenburger, T., Fässler, R., Bauer, J., Lassmann, H., Linington, C., Wekerle, H., and Iglesias, A. (1998). B lymphocytes producing demyelinating autoantibodies: development and function in gene-targeted transgenic mice. *J. Exp. Med.* *188*, 169–180.
- Liu, S., Velez, M.-G., Humann, J., Rowland, S., Conrad, F.J., Halverson, R., Torres, R.M., and Pelanda, R. (2005). Receptor Editing Can Lead to Allelic Inclusion and Development of B Cells That Retain Antibodies Reacting with High Avidity Autoantigens. *J. Immunol.* *175*, 5067–5076.
- Liu, W., Putnam, A.L., Xu-Yu, Z., Szot, G.L., Lee, M.R., Zhu, S., Gottlieb, P.A., Kapranov, P., Gingeras, T.R., Fazekas de St Groth, B., et al. (2006). CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4⁺ T reg cells. *J. Exp. Med.* *203*, 1701–1711.
- Liu, Y.J., Barthélémy, C., de Bouteiller, O., Arpin, C., Durand, I., and Banchereau, J. (1995). Memory B cells from human tonsils colonize mucosal epithelium and directly present antigen to T cells by rapid up-regulation of B7-1 and B7-2. *Immunity* *2*, 239–248.
- Lou, J., Chofflon, M., Juillard, C., Donati, Y., Mili, N., Siegrist, C.A., and Grau, G.E. (1997). Brain microvascular endothelial cells and leukocytes derived from patients with multiple sclerosis exhibit increased adhesion capacity. *Neuroreport* *8*, 629–633.
- Lublin, F.D., and Reingold, S.C. (1996). Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey. National Multiple Sclerosis Society (USA) Advisory Committee on Clinical Trials of New Agents in Multiple Sclerosis. *Neurology* *46*, 907–911.
- 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., Brück, W., Rodriguez, M., and Lassmann, H. (1996). Distinct patterns of multiple sclerosis pathology indicates heterogeneity on pathogenesis. *Brain Pathol. Zurich Switz.* *6*, 259–274.
- Lünemann, J.D., Jelčić, I., Roberts, S., Lutterotti, A., Tackenberg, B., Martin, R., and Münz, C. (2008). EBNA1-specific T cells from patients with multiple sclerosis cross react with myelin antigens and co-produce IFN- γ and IL-2. *J. Exp. Med.* *205*, 1763–1773.
- Lund, F.E., and Randall, T.D. (2010). Effector and regulatory B cells: modulators of CD4⁺ T cell immunity. *Nat. Rev. Immunol.* *10*, 236–247.
- Lyons, J.A., San, M., Happ, M.P., and Cross, A.H. (1999). B cells are critical to induction of experimental allergic encephalomyelitis by protein but not by a short encephalitogenic peptide. *Eur. J. Immunol.* *29*, 3432–3439.
- Lyons, J.-A., Ramsbottom, M.J., and Cross, A.H. (2002). Critical role of antigen-specific antibody in experimental autoimmune encephalomyelitis induced by recombinant myelin oligodendrocyte glycoprotein. *Eur. J. Immunol.* *32*, 1905–1913.
- Mackay, F., and Leung, H. (2006). The role of the BAFF/APRIL system on T cell function. *Semin. Immunol.* *18*, 284–289.

- Mackay, F., Schneider, P., Rennert, P., and Browning, J. (2003). BAFF AND APRIL: a tutorial on B cell survival. *Annu. Rev. Immunol.* 21, 231–264.
- Madsen, L.S., Andersson, E.C., Jansson, L., krogsgaard, M., Andersen, C.B., Engberg, J., Strominger, J.L., Svejgaard, A., Hjorth, J.P., Holmdahl, R., et al. (1999). A humanized model for multiple sclerosis using HLA-DR2 and a human T-cell receptor. *Nat. Genet.* 23, 343–347.
- 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 J. Neurol.* 130, 1089–1104.
- Mandik-Nayak, L., Ridge, N., Fields, M., Park, A.Y., and Erikson, J. (2008). Role of B cells in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Curr. Opin. Immunol.* 20, 639–645.
- Markovic, M., Trajkovic, V., Drulovic, J., Mesaros, S., Stojsavljevic, N., Dujmovic, I., and Mostarica Stojkovic, M. (2003). Antibodies against myelin oligodendrocyte glycoprotein in the cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients. *J. Neurol. Sci.* 211, 67–73.
- Marriott, J.J., Miyasaki, J.M., Gronseth, G., O'Connor, P.W., and Therapeutics and Technology Assessment Subcommittee of the American Academy of Neurology (2010). Evidence Report: The efficacy and safety of mitoxantrone (Novantrone) in the treatment of multiple sclerosis: Report of the Therapeutics and Technology Assessment Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology* 74, 1463–1470.
- Mathey, E.K., Derfuss, T., Storch, M.K., Williams, K.R., Hales, K., Woolley, D.R., Al-Hayani, A., Davies, S.N., Rasband, M.N., Olsson, T., et al. (2007). Neurofascin as a novel target for autoantibody-mediated axonal injury. *J. Exp. Med.* 204, 2363–2372.
- Matsushita, T., Horikawa, M., Iwata, Y., and Tedder, T.F. (2010). Regulatory B cells (B10 cells) and regulatory T cells have independent roles in controlling experimental autoimmune encephalomyelitis initiation and late-phase immunopathogenesis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 185, 2240–2252.
- Matthias, P., and Rolink, A.G. (2005). Transcriptional networks in developing and mature B cells. *Nat. Rev. Immunol.* 5, 497–508.
- Matusevicius, D., Kivisäkk, P., He, B., Kostulas, N., Ozenci, V., Fredrikson, S., and Link, H. (1999). Interleukin-17 mRNA expression in blood and CSF mononuclear cells is augmented in multiple sclerosis. *Mult. Scler. Houndmills Basingstoke Engl.* 5, 101–104.
- Mauri, C., and Bosma, A. (2012). Immune regulatory function of B cells. *Annu. Rev. Immunol.* 30, 221–241.
- 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. Baltim. Md 1950* 175, 3025–3032.
- McKean, D., Huppi, K., Bell, M., Staudt, L., Gerhard, W., and Weigert, M. (1984). Generation of antibody diversity in the immune response of BALB/c mice to influenza virus hemagglutinin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 81, 3180–3184.

- McLaughlin, K.A., Chitnis, T., Newcombe, J., Franz, B., Kennedy, J., McArdel, S., Kuhle, J., Kappos, L., Rostasy, K., Pohl, D., et al. (2009). Age-dependent B cell autoimmunity to a myelin surface antigen in pediatric multiple sclerosis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *183*, 4067–4076.
- Medina, F., Segundo, C., Campos-Caro, A., González-García, I., and Brieva, J.A. (2002). The heterogeneity shown by human plasma cells from tonsil, blood, and bone marrow reveals graded stages of increasing maturity, but local profiles of adhesion molecule expression. *Blood* *99*, 2154–2161.
- Meffre, E., and Wardemann, H. (2008a). B-cell tolerance checkpoints in health and autoimmunity. *Curr. Opin. Immunol.* *20*, 632–638.
- Meffre, E., and Wardemann, H. (2008b). B-cell tolerance checkpoints in health and autoimmunity. *Curr. Opin. Immunol.* *20*, 632–638.
- Meinl, E., Krumbholz, M., and Hohlfeld, R. (2006). B lineage cells in the inflammatory central nervous system environment: migration, maintenance, local antibody production, and therapeutic modulation. *Ann. Neurol.* *59*, 880–892.
- Melchers, F. (2005). The pre-B-cell receptor: selector of fitting immunoglobulin heavy chains for the B-cell repertoire. *Nat. Rev. Immunol.* *5*, 578–584.
- Mendel, I., Katz, A., Kozak, N., Ben-Nun, A., and Revel, M. (1998). Interleukin-6 functions in autoimmune encephalomyelitis: a study in gene-targeted mice. *Eur. J. Immunol.* *28*, 1727–1737.
- Michel, L., Berthelot, L., Pettré, S., Wiertlewski, S., Lefrère, F., Braudeau, C., Brouard, S., Soulillou, 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.
- Mix, E., Olsson, T., Correale, J., Baig, S., Kostulas, V., Olsson, O., and Link, H. (1990). B cells expressing CD5 are increased in cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis. *Clin. Exp. Immunol.* *79*, 21–27.
- Miyazaki, Y., Miyake, S., Chiba, A., Lantz, O., and Yamamura, T. (2011). Mucosal-associated invariant T cells regulate Th1 response in multiple sclerosis. *Int. Immunol.* *23*, 529–535.
- Mocarski, E.S., Jr (2004). Immune escape and exploitation strategies of cytomegaloviruses: impact on and imitation of the major histocompatibility system. *Cell. Microbiol.* *6*, 707–717.
- Monson, N.L., Cravens, P.D., Frohman, E.M., Hawker, K., and Racke, M.K. (2005). Effect of rituximab on the peripheral blood and cerebrospinal fluid B cells in patients with primary progressive multiple sclerosis. *Arch. Neurol.* *62*, 258–264.
- Morabito, F., Damle, R.N., Deaglio, S., Keating, M., Ferrarini, M., and Chiorazzi, N. (2006). The CD38 ectoenzyme family: advances in basic science and clinical practice. *Mol. Med. Camb. Mass* *12*, 342–344.

- Munger, K.L., Levin, L.I., Hollis, B.W., Howard, N.S., and Ascherio, A. (2006). Serum 25-hydroxyvitamin D levels and risk of multiple sclerosis. *JAMA J. Am. Med. Assoc.* 296, 2832–2838.
- Munoz, J.J., Bernard, C.C., and Mackay, I.R. (1984). Elicitation of experimental allergic encephalomyelitis (EAE) in mice with the aid of pertussigen. *Cell. Immunol.* 83, 92–100.
- Murray, T.J. (2009). The history of multiple sclerosis: the changing frame of the disease over the centuries. *J. Neurol. Sci.* 277 *Suppl 1*, S3–8.
- Nagasawa, T. (2006). Microenvironmental niches in the bone marrow required for B-cell development. *Nat. Rev. Immunol.* 6, 107–116.
- Nagumo, H., and Agematsu, K. (1998). Synergistic augmentative effect of interleukin-10 and CD27/CD70 interactions on B-cell immunoglobulin synthesis. *Immunology* 94, 388–394.
- Nemazee, D.A., and Bürki, K. (1989). Clonal deletion of B lymphocytes in a transgenic mouse bearing anti-MHC class I antibody genes. *Nature* 337, 562–566.
- Neuhaus, O., Farina, C., Wekerle, H., and Hohlfeld, R. (2001). Mechanisms of action of glatiramer acetate in multiple sclerosis. *Neurology* 56, 702–708.
- Neumann, H., Medana, I.M., Bauer, J., and Lassmann, H. (2002). Cytotoxic T lymphocytes in autoimmune and degenerative CNS diseases. *Trends Neurosci.* 25, 313–319.
- Neusch, C., Rozengurt, N., Jacobs, R.E., Lester, H.A., and Kofuji, P. (2001). Kir4.1 Potassium Channel Subunit Is Crucial for Oligodendrocyte Development and In Vivo Myelination. *J. Neurosci.* 21, 5429–5438.
- Newell, M.K., Tobin, R.P., Cabrera, J.H., Sorensen, M.B., Huckstep, A., Villalobos-Menuy, E.M., Burnett, M., McCrea, E., Harvey, C.P., Buddiga, A., et al. (2010). TLR-mediated B cell activation results in ectopic CLIP expression that promotes B cell-dependent inflammation. *J. Leukoc. Biol.* 88, 779–789.
- Niino, M., Hirotsu, M., Miyazaki, Y., and Sasaki, H. (2009). Memory and naïve B-cell subsets in patients with multiple sclerosis. *Neurosci. Lett.* 464, 74–78.
- Niino, M., Fukazawa, T., Minami, N., Amino, I., Tashiro, J., Fujiki, N., Doi, S., and Kikuchi, S. (2012). CD5-positive B cell subsets in secondary progressive multiple sclerosis. *Neurosci. Lett.* 523, 56–61.
- Nishizumi, H., Horikawa, K., Mlinaric-Rascan, I., and Yamamoto, T. (1998). A double-edged kinase Lyn: a positive and negative regulator for antigen receptor-mediated signals. *J. Exp. Med.* 187, 1343–1348.
- Norton, W.T., and Poduslo, S.E. (1973). Myelination in rat brain: method of myelin isolation. *J. Neurochem.* 21, 749–757.
- Nossal, G.J., and Pike, B.L. (1980). Clonal anergy: persistence in tolerant mice of antigen-binding B lymphocytes incapable of responding to antigen or mitogen. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 77, 1602–1606.

- Ben-Nun, A., Wekerle, H., and Cohen, I.R. (1981a). Vaccination against autoimmune encephalomyelitis with T-lymphocyte line cells reactive against myelin basic protein. *Nature* *292*, 60–61.
- Ben-Nun, A., Wekerle, H., and Cohen, I.R. (1981b). Vaccination against autoimmune encephalomyelitis with T-lymphocyte line cells reactive against myelin basic protein. *Nature* *292*, 60–61.
- Nutt, S.L., Urbánek, P., Rolink, A., and Busslinger, M. (1997). Essential functions of Pax5 (BSAP) in pro-B cell development: difference between fetal and adult B lymphopoiesis and reduced V-to-DJ recombination at the IgH locus. *Genes Dev.* *11*, 476–491.
- Nutt, S.L., Morrison, A.M., Dörfler, P., Rolink, A., and Busslinger, M. (1998). Identification of BSAP (Pax-5) target genes in early B-cell development by loss- and gain-of-function experiments. *EMBO J.* *17*, 2319–2333.
- Nylander, A., and Hafler, D.A. (2012). Multiple sclerosis. *J. Clin. Invest.* *122*, 1180–1188.
- O'Connor, B.P., Raman, V.S., Erickson, L.D., Cook, W.J., Weaver, L.K., Ahonen, C., Lin, L.-L., Mantchev, G.T., Bram, R.J., and Noelle, R.J. (2004). BCMA is essential for the survival of long-lived bone marrow plasma cells. *J. Exp. Med.* *199*, 91–98.
- O'Connor, K.C., Appel, H., Bregoli, L., Call, M.E., Catz, I., Chan, J.A., Moore, N.H., Warren, K.G., Wong, S.J., Hafler, D.A., et al. (2005). Antibodies from inflamed central nervous system tissue recognize myelin oligodendrocyte glycoprotein. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *175*, 1974–1982.
- 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.
- Oksenberg, J.R., Baranzini, S.E., Sawcer, S., and Hauser, S.L. (2008). The genetics of multiple sclerosis: SNPs to pathways to pathogenesis. *Nat. Rev. Genet.* *9*, 516–526.
- Oliver, A.M., Martin, F., and Kearney, J.F. (1999). IgM^{high}CD21^{high} lymphocytes enriched in the splenic marginal zone generate effector cells more rapidly than the bulk of follicular B cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *162*, 7198–7207.
- Oliver, A.R., Lyon, G.M., and Ruddle, N.H. (2003). Rat and human myelin oligodendrocyte glycoproteins induce experimental autoimmune encephalomyelitis by different mechanisms in C57BL/6 mice. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *171*, 462–468.
- Olsson, T. (1992). Cytokines in neuroinflammatory disease: role of myelin autoreactive T cell production of interferon-gamma. *J. Neuroimmunol.* *40*, 211–218.
- Optic Neuritis Study Group (2008). Multiple sclerosis risk after optic neuritis: final optic neuritis treatment trial follow-up. *Arch. Neurol.* *65*, 727–732.
- Bar-Or, A., Oliveira, E.M., Anderson, D.E., Krieger, J.I., Duddy, M., O'Connor, K.C., and Hafler, D.A. (2001). Immunological memory: contribution of memory B cells expressing costimulatory molecules in the resting state. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *167*, 5669–5677.

- 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.
- Owens, G.P., Kraus, H., Burgoon, M.P., Smith-Jensen, T., Devlin, M.E., and Gilden, D.H. (1998). Restricted use of VH4 germline segments in an acute multiple sclerosis brain. *Ann. Neurol.* *43*, 236–243.
- Padler-Karavani, V., Yu, H., Cao, H., Chokhawala, H., Karp, F., Varki, N., Chen, X., and Varki, A. (2008). Diversity in specificity, abundance, and composition of anti-Neu5Gc antibodies in normal humans: potential implications for disease. *Glycobiology* *18*, 818–830.
- Pakpoor, J., Pakpoor, J., Disanto, G., Giovannoni, G., and Ramagopalan, S.V. (2013). Cytomegalovirus and multiple sclerosis risk. *J. Neurol.* *260*, 1658–1660.
- Pallier, A., Hillion, S., Danger, R., Giral, M., Racapé, M., Degauque, N., Dugast, E., Ashton-Chess, J., Petré, S., Lozano, J.J., et al. (2010). Patients with drug-free long-term graft function display increased numbers of peripheral B cells with a memory and inhibitory phenotype. *Kidney Int.* *78*, 503–513.
- Panitch, H.S., and Bever, C.T., Jr (1993). Clinical trials of interferons in multiple sclerosis. What have we learned? *J. Neuroimmunol.* *46*, 155–164.
- Pape, K.A., Taylor, J.J., Maul, R.W., Gearhart, P.J., and Jenkins, M.K. (2011). Different B cell populations mediate early and late memory during an endogenous immune response. *Science* *331*, 1203–1207.
- Paramithiotis, E., and Cooper, M.D. (1997). Memory B lymphocytes migrate to bone marrow in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *94*, 208–212.
- Pascual, V., Liu, Y.J., Magalski, A., de Bouteiller, O., Banchereau, J., and Capra, J.D. (1994). Analysis of somatic mutation in five B cell subsets of human tonsil. *J. Exp. Med.* *180*, 329–339.
- Di Pauli, F., Reindl, M., Ehling, R., Schautzer, F., Gneiss, C., Lutterotti, A., O'Reilly, E., Munger, K., Deisenhammer, F., Ascherio, A., et al. (2008). Smoking is a risk factor for early conversion to clinically definite multiple sclerosis. *Mult. Scler. Houndmills Basingstoke Engl.* *14*, 1026–1030.
- Pelanda, R., and Torres, R.M. (2006). Receptor editing for better or for worse. *Curr. Opin. Immunol.* *18*, 184–190.
- Pender, M.P. (2003). Infection of autoreactive B lymphocytes with EBV, causing chronic autoimmune diseases. *Trends Immunol.* *24*, 584–588.
- Pender, M.P. (2011). The essential role of Epstein-Barr virus in the pathogenesis of multiple sclerosis. *Neurosci. Rev. J. Bringing Neurobiol. Neurol. Psychiatry* *17*, 351–367.
- Pender, M.P., Csurhes, P.A., Greer, J.M., Mowat, P.D., Henderson, R.D., Cameron, K.D., Purdie, D.M., McCombe, P.A., and Good, M.F. (2000). Surges of increased T cell reactivity to an encephalitogenic region of myelin proteolipid protein occur more often in patients with multiple sclerosis than in healthy subjects. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *165*, 5322–5331.

- Pender, M.P., Csurhes, P.A., Pfluger, C.M.M., and Burrows, S.R. (2012). CD8⁺ T cells far predominate over CD4⁺ T cells in healthy immune response to Epstein-Barr virus infected lymphoblastoid cell lines. *Blood* *120*, 5085–5087.
- Pers, J.O., Jamin, C., Predine-Hug, F., Lydyard, P., and Youinou, P. (1999). The role of CD5-expressing B cells in health and disease (review). *Int. J. Mol. Med.* *3*, 239–245.
- Pettinelli, C.B., and McFarlin, D.E. (1981). Adoptive transfer of experimental allergic encephalomyelitis in SJL/J mice after in vitro activation of lymph node cells by myelin basic protein: requirement for Lyt 1+ 2- T lymphocytes. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *127*, 1420–1423.
- Pham, T., Gregg, C.J., Karp, F., Chow, R., Padler-Karavani, V., Cao, H., Chen, X., Witztum, J.L., Varki, N.M., and Varki, A. (2009). Evidence for a novel human-specific xeno-auto-antibody response against vascular endothelium. *Blood* *114*, 5225–5235.
- Phan, T.G., Gray, E.E., and Cyster, J.G. (2009). The microanatomy of B cell activation. *Curr. Opin. Immunol.* *21*, 258–265.
- Pillai, S., and Cariappa, A. (2009). The follicular versus marginal zone B lymphocyte cell fate decision. *Nat. Rev. Immunol.* *9*, 767–777.
- Pillai, S., Cariappa, A., and Moran, S.T. (2005). Marginal zone B cells. *Annu. Rev. Immunol.* *23*, 161–196.
- Pillai, S., Mattoo, H., and Cariappa, A. (2011). B cells and autoimmunity. *Curr. Opin. Immunol.* *23*, 721–731.
- Pirko, I., Cardin, R., Chen, Y., Lohrey, A.K., Lindquist, D.M., Dunn, R.S., Zivadinov, R., and Johnson, A.J. (2012). CMV infection attenuates the disease course in a murine model of multiple sclerosis. *PloS One* *7*, e32767.
- Pittas, F., Ponsonby, A.-L., van der Mei, I.A.F., Taylor, B.V., Blizzard, L., Groom, P., Ukoumunne, O.C., and Dwyer, T. (2009). Smoking is associated with progressive disease course and increased progression in clinical disability in a prospective cohort of people with multiple sclerosis. *J. Neurol.* *256*, 577–585.
- Pöllinger, B., Krishnamoorthy, G., Berer, K., Lassmann, H., Bösl, M.R., Dunn, R., Domingues, H.S., Holz, A., Kurschus, F.C., and Wekerle, H. (2009). Spontaneous relapsing-remitting EAE in the SJL/J mouse: MOG-reactive transgenic T cells recruit endogenous MOG-specific B cells. *J. Exp. Med.* *206*, 1303–1316.
- Polman, C.H., Reingold, S.C., Edan, G., Filippi, M., Hartung, H.-P., Kappos, L., Lublin, F.D., Metz, L.M., McFarland, H.F., O'Connor, P.W., et al. (2005). Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2005 revisions to the “McDonald Criteria.” *Ann. Neurol.* *58*, 840–846.
- Prineas, J.W., and Graham, J.S. (1981). Multiple sclerosis: capping of surface immunoglobulin G on macrophages engaged in myelin breakdown. *Ann. Neurol.* *10*, 149–158.

- Prineas, J.W., and Wright, R.G. (1978). Macrophages, lymphocytes, and plasma cells in the perivascular compartment in chronic multiple sclerosis. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* 38, 409–421.
- Qi, H., Cannons, J.L., Klauschen, F., Schwartzberg, P.L., and Germain, R.N. (2008). SAP-controlled T-B cell interactions underlie germinal centre formation. *Nature* 455, 764–769.
- Quarles, R.H. (1997). Glycoproteins of myelin sheaths. *J. Mol. Neurosci.* MN 8, 1–12.
- Quintana, F.J., Farez, M.F., Viglietta, V., Iglesias, A.H., Merbl, Y., Izquierdo, G., Lucas, M., Basso, A.S., Khoury, S.J., Lucchinetti, C.F., et al. (2008). Antigen microarrays identify unique serum autoantibody signatures in clinical and pathologic subtypes of multiple sclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 18889–18894.
- Raghuwanshi, A., Joshi, S.S., and Christakos, S. (2008). Vitamin D and multiple sclerosis. *J. Cell. Biochem.* 105, 338–343.
- Rahman, Z.S.M., Rao, S.P., Kalled, S.L., and Manser, T. (2003). Normal induction but attenuated progression of germinal center responses in BAFF and BAFF-R signaling-deficient mice. *J. Exp. Med.* 198, 1157–1169.
- Ransohoff, R.M. (2007). Natalizumab for multiple sclerosis. *N. Engl. J. Med.* 356, 2622–2629.
- Ransohoff, R.M., Kivisäkk, P., and Kidd, G. (2003). Three or more routes for leukocyte migration into the central nervous system. *Nat. Rev. Immunol.* 3, 569–581.
- Ray, S.K., Putterman, C., and Diamond, B. (1996). Pathogenic autoantibodies are routinely generated during the response to foreign antigen: a paradigm for autoimmune disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 2019–2024.
- Reese, T.S., and Karnovsky, M.J. (1967). Fine structural localization of a blood-brain barrier to exogenous peroxidase. *J. Cell Biol.* 34, 207–217.
- Reff, M.E., Carner, K., Chambers, K.S., Chinn, P.C., Leonard, J.E., Raab, R., Newman, R.A., Hanna, N., and Anderson, D.R. (1994). Depletion of B cells in vivo by a chimeric mouse human monoclonal antibody to CD20. *Blood* 83, 435–445.
- Reif, K., Ekland, E.H., Ohl, L., Nakano, H., Lipp, M., Förster, R., and Cyster, J.G. (2002). Balanced responsiveness to chemoattractants from adjacent zones determines B-cell position. *Nature* 416, 94–99.
- Reindl, M., Di Pauli, F., Rostásy, K., and Berger, T. (2013). The spectrum of MOG autoantibody-associated demyelinating diseases. *Nat. Rev. Neurol.* 9, 455–461.
- Revy, P., Muto, T., Levy, Y., Geissmann, F., Plebani, A., Sanal, O., Catalan, N., Forveille, M., Dufourcq-Lagelouse, R., Gennery, A., et al. (2000). Activation-Induced Cytidine Deaminase (AID) Deficiency Causes the Autosomal Recessive Form of the Hyper-IgM Syndrome (HIGM2). *Cell* 102, 565–575.
- Reynaud, C.-A., Aoufouchi, S., Faili, A., and Weill, J.-C. (2003). What role for AID: mutator, or assembler of the immunoglobulin mutasome? *Nat. Immunol.* 4, 631–638.

- Rivers, T.M., Sprunt, D.H., and Berry, G.P. (1933). OBSERVATIONS ON ATTEMPTS TO PRODUCE ACUTE DISSEMINATED ENCEPHALOMYELITIS IN MONKEYS. *J. Exp. Med.* 58, 39–53.
- Rolink, A.G., Andersson, J., and Melchers, F. (1998). Characterization of immature B cells by a novel monoclonal antibody, by turnover and by mitogen reactivity. *Eur. J. Immunol.* 28, 3738–3748.
- Royal, W., 3rd, Mia, Y., Li, H., and Naunton, K. (2009). Peripheral blood regulatory T cell measurements correlate with serum vitamin D levels in patients with multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.* 213, 135–141.
- Rubin, L.L., and Staddon, J.M. (1999). The cell biology of the blood-brain barrier. *Annu. Rev. Neurosci.* 22, 11–28.
- Rudick, R.A., Ransohoff, R.M., Pepler, R., VanderBrug Medendorp, S., Lehmann, P., and Alam, J. (1996). Interferon beta induces interleukin-10 expression: relevance to multiple sclerosis. *Ann. Neurol.* 40, 618–627.
- Runmarker, B., and Andersen, O. (1995). Pregnancy is associated with a lower risk of onset and a better prognosis in multiple sclerosis. *Brain J. Neurol.* 118 (Pt 1), 253–261.
- Ruprecht, C.R., and Lanzavecchia, A. (2006). Toll-like receptor stimulation as a third signal required for activation of human naive B cells. *Eur. J. Immunol.* 36, 810–816.
- Saito, T., Chiba, S., Ichikawa, M., Kunisato, A., Asai, T., Shimizu, K., Yamaguchi, T., Yamamoto, G., Seo, S., Kumano, K., et al. (2003). Notch2 is preferentially expressed in mature B cells and indispensable for marginal zone B lineage development. *Immunity* 18, 675–685.
- Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M., and Toda, M. (1995). Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 155, 1151–1164.
- Salou, M., Elong Ngono, A., Garcia, A., Michel, L., and Laplaud, D.-A. (2013). [Adaptative immunity and pathophysiology of multiple sclerosis]. *Rev. Médecine Interne Fondée Par Société Natl. Francaise Médecine Interne* 34, 479–486.
- Saraiva, M., and O’Garra, A. (2010). The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nat. Rev. Immunol.* 10, 170–181.
- Sato, T., Ishikawa, S., Akadegawa, K., Ito, T., Yurino, H., Kitabatake, M., Yoneyama, H., and Matsushima, K. (2004). Aberrant B1 cell migration into the thymus results in activation of CD4 T cells through its potent antigen-presenting activity in the development of murine lupus. *Eur. J. Immunol.* 34, 3346–3358.
- Scalfari, A., Neuhaus, A., Degenhardt, A., Rice, G.P., Muraro, P.A., Daumer, M., and Ebers, G.C. (2010). The natural history of multiple sclerosis: a geographically based study 10: relapses and long-term disability. *Brain J. Neurol.* 133, 1914–1929.

- Schluesener, H.J., and Wekerle, H. (1985). Autoaggressive T lymphocyte lines recognizing the encephalitogenic region of myelin basic protein: in vitro selection from unprimed rat T lymphocyte populations. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *135*, 3128–3133.
- Schluesener, H.J., Sobel, R.A., Linington, C., and Weiner, H.L. (1987). A monoclonal antibody against a myelin oligodendrocyte glycoprotein induces relapses and demyelination in central nervous system autoimmune disease. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *139*, 4016–4021.
- Schroeter, M., Stoll, G., Weissert, R., Hartung, H.-P., Lassmann, H., and Jander, S. (2003). CD8+ phagocyte recruitment in rat experimental autoimmune encephalomyelitis: association with inflammatory tissue destruction. *Am. J. Pathol.* *163*, 1517–1524.
- Schwab, S.R., and Cyster, J.G. (2007). Finding a way out: lymphocyte egress from lymphoid organs. *Nat. Immunol.* *8*, 1295–1301.
- Scolding, N.J., Frith, S., Linington, C., Morgan, B.P., Campbell, A.K., and Compston, D.A. (1989). Myelin-oligodendrocyte glycoprotein (MOG) is a surface marker of oligodendrocyte maturation. *J. Neuroimmunol.* *22*, 169–176.
- Sechel, A.C. van, Bajramović, J.J., Stipdonk, M.J.B. van, Persoon-Deen, C., Geutskens, S.B., and Noort, J.M. van (1999). EBV-Induced Expression and HLA-DR-Restricted Presentation by Human B Cells of α B-Crystallin, a Candidate Autoantigen in Multiple Sclerosis. *J. Immunol.* *162*, 129–135.
- Segal, B.M., and Shevach, E.M. (1996). IL-12 unmasks latent autoimmune disease in resistant mice. *J. Exp. Med.* *184*, 771–775.
- Seidi, O.A., Semra, Y.K., and Sharief, M.K. (2002). Expression of CD5 on B lymphocytes correlates with disease activity in patients with multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.* *133*, 205–210.
- Sellebjerg, F., Jensen, J., Jensen, C.V., and Wiik, A. (2002). Expansion of CD5 - B cells in multiple sclerosis correlates with CD80 (B7-1) expression. *Scand. J. Immunol.* *56*, 101–107.
- Serafini, B., Rosicarelli, B., Franciotta, D., Magliozzi, R., Reynolds, R., Cinque, P., Andreoni, L., Trivedi, P., Salvetti, M., Faggioni, A., et al. (2007). Dysregulated Epstein-Barr virus infection in the multiple sclerosis brain. *J. Exp. Med.* *204*, 2899–2912.
- Shi, Y., Agematsu, K., Ochs, H.D., and Sugane, K. (2003). Functional analysis of human memory B-cell subpopulations: IgD+CD27+ B cells are crucial in secondary immune response by producing high affinity IgM. *Clin. Immunol. Orlando Fla* *108*, 128–137.
- Shlomchik, M.J. (2008). Sites and stages of autoreactive B cell activation and regulation. *Immunity* *28*, 18–28.
- Shlomchik, M., Mascelli, M., Shan, H., Radic, M.Z., Pisetsky, D., Marshak-Rothstein, A., and Weigert, M. (1990). Anti-DNA antibodies from autoimmune mice arise by clonal expansion and somatic mutation. *J. Exp. Med.* *171*, 265–292.

- Shlomchik, M.J., Zharhary, D., Saunders, T., Camper, S.A., and Weigert, M.G. (1993). A rheumatoid factor transgenic mouse model of autoantibody regulation. *Int. Immunol.* *5*, 1329–1341.
- Sicotte, N.L., Liva, S.M., Klutch, R., Pfeiffer, P., Bouvier, S., Odesa, S., Wu, T.C.J., and Voskuhl, R.R. (2002). Treatment of multiple sclerosis with the pregnancy hormone estriol. *Ann. Neurol.* *52*, 421–428.
- Simpson, J.E., Newcombe, J., Cuzner, M.L., and Woodroffe, M.N. (2000). Expression of the interferon-gamma-inducible chemokines IP-10 and Mig and their receptor, CXCR3, in multiple sclerosis lesions. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* *26*, 133–142.
- Sims, G.P., Ettinger, R., Shirota, Y., Yarboro, C.H., Illei, G.G., and Lipsky, P.E. (2005). Identification and characterization of circulating human transitional B cells. *Blood* *105*, 4390–4398.
- Sindic, C.J., Monteyne, P., and Laterre, E.C. (1994). The intrathecal synthesis of virus-specific oligoclonal IgG in multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.* *54*, 75–80.
- Slifka, M.K., and Ahmed, R. (1996). Limiting dilution analysis of virus-specific memory B cells by an ELISPOT assay. *J. Immunol. Methods* *199*, 37–46.
- Slifka, M.K., and Ahmed, R. (1998). Long-lived plasma cells: a mechanism for maintaining persistent antibody production. *Curr. Opin. Immunol.* *10*, 252–258.
- Slifka, M.K., Antia, R., Whitmire, J.K., and Ahmed, R. (1998). Humoral immunity due to long-lived plasma cells. *Immunity* *8*, 363–372.
- Smolders, J., Thewissen, M., Peelen, E., Menheere, P., Tervaert, J.W.C., Damoiseaux, J., and Hupperts, R. (2009). Vitamin D status is positively correlated with regulatory T cell function in patients with multiple sclerosis. *PloS One* *4*, e6635.
- Soldan, S.S., and Jacobson, S. (2001). Role of viruses in etiology and pathogenesis of multiple sclerosis. *Adv. Virus Res.* *56*, 517–555.
- Sørensen, T.L., Tani, M., Jensen, J., Pierce, V., Lucchinetti, C., Folcik, V.A., Qin, S., Rottman, J., Sellebjerg, F., Strieter, R.M., et al. (1999). Expression of specific chemokines and chemokine receptors in the central nervous system of multiple sclerosis patients. *J. Clin. Invest.* *103*, 807–815.
- Sørensen, T.L., Roed, H., and Sellebjerg, F. (2002). Chemokine receptor expression on B cells and effect of interferon-beta in multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.* *122*, 125–131.
- Sospedra, M., and Martin, R. (2005). Immunology of multiple sclerosis. *Annu. Rev. Immunol.* *23*, 683–747.
- Soulillou, J.-P. (2013). Missing links in multiple sclerosis etiology. A working connecting hypothesis. *Med. Hypotheses* *80*, 509–516.
- Speake, T., Freeman, L.J., and Brown, P.D. (2003). Expression of aquaporin 1 and aquaporin 4 water channels in rat choroid plexus. *Biochim. Biophys. Acta* *1609*, 80–86.

- 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.
- Steinman, L. (2007). A brief history of T(H)17, the first major revision in the T(H)1/T(H)2 hypothesis of T cell-mediated tissue damage. *Nat. Med.* *13*, 139–145.
- Storch, M.K., Stefferl, A., Brehm, U., Weissert, R., Wallström, E., Kerschensteiner, M., Olsson, T., Linington, C., and Lassmann, H. (1998). Autoimmunity to myelin oligodendrocyte glycoprotein in rats mimics the spectrum of multiple sclerosis pathology. *Brain Pathol. Zurich Switz.* *8*, 681–694.
- Su, T.T., Guo, B., Wei, B., Braun, J., and Rawlings, D.J. (2004). Signaling in transitional type 2 B cells is critical for peripheral B-cell development. *Immunol. Rev.* *197*, 161–178.
- Sun, J., Link, H., Olsson, T., Xiao, B.G., Andersson, G., Ekre, H.P., Linington, C., and Diener, P. (1991). T and B cell responses to myelin-oligodendrocyte glycoprotein in multiple sclerosis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *146*, 1490–1495.
- Sundström, P., and Nyström, L. (2008). Smoking worsens the prognosis in multiple sclerosis. *Mult. Scler. Houndmills Basingstoke Engl.* *14*, 1031–1035.
- Sundvall, M., Jirholt, J., Yang, H.T., Jansson, L., Engström, A., Pettersson, U., and Holmdahl, R. (1995). Identification of murine loci associated with susceptibility to chronic experimental autoimmune encephalomyelitis. *Nat. Genet.* *10*, 313–317.
- Surolia, I., Pirnie, S.P., Chellappa, V., Taylor, K.N., Cariappa, A., Moya, J., Liu, H., Bell, D.W., Driscoll, D.R., Diederichs, S., et al. (2010). Functionally defective germline variants of sialic acid acetyltransferase in autoimmunity. *Nature* *466*, 243–247.
- Suryani, S., Fulcher, D.A., Santner-Nanan, B., Nanan, R., Wong, M., Shaw, P.J., Gibson, J., Williams, A., and Tangye, S.G. (2010). Differential expression of CD21 identifies developmentally and functionally distinct subsets of human transitional B cells. *Blood* *115*, 519–529.
- Suzuki, K., Grigorova, I., Phan, T.G., Kelly, L.M., and Cyster, J.G. (2009). Visualizing B cell capture of cognate antigen from follicular dendritic cells. *J. Exp. Med.* *206*, 1485–1493.
- Takahashi, Y., Ohta, H., and Takemori, T. (2001). Fas is required for clonal selection in germinal centers and the subsequent establishment of the memory B cell repertoire. *Immunity* *14*, 181–192.
- Takumi, T., Ishii, T., Horio, Y., Morishige, K., Takahashi, N., Yamada, M., Yamashita, T., Kiyama, H., Sohmiya, K., and Nakanishi, S. (1995). A novel ATP-dependent inward rectifier potassium channel expressed predominantly in glial cells. *J. Biol. Chem.* *270*, 16339–16346.
- Tan, J.B., Xu, K., Cretegnny, K., Visan, I., Yuan, J.S., Egan, S.E., and Guidos, C.J. (2009). Lunatic and manic fringe cooperatively enhance marginal zone B cell precursor competition for delta-like 1 in splenic endothelial niches. *Immunity* *30*, 254–263.
- Tangye, S.G., and Good, K.L. (2007). Human IgM⁺CD27⁺ B cells: memory B cells or “memory” B cells? *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *179*, 13–19.

- Tarlinton, D. (2008). Sheepish B cells: evidence for antigen-independent antibody diversification in humans and mice. *J. Exp. Med.* *205*, 1251–1254.
- Tarlinton, D., Radbruch, A., Hiepe, F., and Dörner, T. (2008). Plasma cell differentiation and survival. *Curr. Opin. Immunol.* *20*, 162–169.
- Taylor, J.J., Martinez, R.J., Titcombe, P.J., Barsness, L.O., Thomas, S.R., Zhang, N., Katzman, S.D., Jenkins, M.K., and Mueller, D.L. (2012). Deletion and anergy of polyclonal B cells specific for ubiquitous membrane-bound self-antigen. *J. Exp. Med.* *209*, 2065–2077.
- Teitelbaum, D., Meshorer, A., Hirshfeld, T., Arnon, R., and Sela, M. (1971). Suppression of experimental allergic encephalomyelitis by a synthetic polypeptide. *Eur. J. Immunol.* *1*, 242–248.
- Theiler, M. (1934). SPONTANEOUS ENCEPHALOMYELITIS OF MICE--A NEW VIRUS DISEASE. *Science* *80*, 122.
- Thien, M., Phan, T.G., Gardam, S., Amesbury, M., Basten, A., Mackay, F., and Brink, R. (2004). Excess BAFF rescues self-reactive B cells from peripheral deletion and allows them to enter forbidden follicular and marginal zone niches. *Immunity* *20*, 785–798.
- Thompson, J.S., Schneider, P., Kalled, S.L., Wang, L., Lefevre, E.A., Cachero, T.G., MacKay, F., Bixler, S.A., Zafari, M., Liu, Z.Y., et al. (2000). BAFF binds to the tumor necrosis factor receptor-like molecule B cell maturation antigen and is important for maintaining the peripheral B cell population. *J. Exp. Med.* *192*, 129–135.
- Thorogood, M., and Hannaford, P.C. (1998). The influence of oral contraceptives on the risk of multiple sclerosis. *Br. J. Obstet. Gynaecol.* *105*, 1296–1299.
- Thoua, N.M., van Noort, J.M., Baker, D., Bose, A., van Sechel, A.C., van Stipdonk, M.J., Travers, P.J., and Amor, S. (2000). Encephalitogenic and immunogenic potential of the stress protein alphaB-crystallin in Biozzi ABH (H-2A(g7)) mice. *J. Neuroimmunol.* *104*, 47–57.
- Tiegs, S.L., Russell, D.M., and Nemazee, D. (1993). Receptor editing in self-reactive bone marrow B cells. *J. Exp. Med.* *177*, 1009–1020.
- Tiller, T., Tsuiji, M., Yurasov, S., Velinzon, K., Nussenzweig, M.C., and Wardemann, H. (2007). Autoreactivity in human IgG⁺ memory B cells. *Immunity* *26*, 205–213.
- Tiller, T., Meffre, E., Yurasov, S., Tsuiji, M., Nussenzweig, M.C., and Wardemann, H. (2008). Efficient generation of monoclonal antibodies from single human B cells by single cell RT-PCR and expression vector cloning. *J. Immunol. Methods* *329*, 112–124.
- Tonegawa, S. (1983). Somatic generation of antibody diversity. *Nature* *302*, 575–581.
- Torres, R.M., Flaswinkel, H., Reth, M., and Rajewsky, K. (1996). Aberrant B cell development and immune response in mice with a compromised BCR complex. *Science* *272*, 1804–1808.
- Tørring, C., Petersen, C.C., Bjerg, L., Kofod-Olsen, E., Petersen, T., and Höllsberg, P. (2013). The B1-cell subpopulation is diminished in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.*

- Tsuiji, M., Yurasov, S., Velinzon, K., Thomas, S., Nussenzweig, M.C., and Wardemann, H. (2006). A checkpoint for autoreactivity in human IgM⁺ memory B cell development. *J. Exp. Med.* *203*, 393–400.
- Tumang, J.R., Hastings, W.D., Bai, C., and Rothstein, T.L. (2004). Peritoneal and splenic B-1 cells are separable by phenotypic, functional, and transcriptomic characteristics. *Eur. J. Immunol.* *34*, 2158–2167.
- Turner, M., Mee, P.J., Costello, P.S., Williams, O., Price, A.A., Duddy, L.P., Furlong, M.T., Geahlen, R.L., and Tybulewicz, V.L. (1995). Perinatal lethality and blocked B-cell development in mice lacking the tyrosine kinase Syk. *Nature* *378*, 298–302.
- 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.
- Van der Aa, A., Hellings, N., Bernard, C.C.A., Raus, J., and Stinissen, P. (2003). Functional properties of myelin oligodendrocyte glycoprotein-reactive T cells in multiple sclerosis patients and controls. *J. Neuroimmunol.* *137*, 164–176.
- Veldhoen, M., Hocking, R.J., Atkins, C.J., Locksley, R.M., and Stockinger, B. (2006). TGFβ in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity* *24*, 179–189.
- Venkataraman, K., Lee, Y.-M., Michaud, J., Thangada, S., Ai, Y., Bonkovsky, H.L., Parikh, N.S., Habrukowich, C., and Hla, T. (2008). Vascular endothelium as a contributor of plasma sphingosine 1-phosphate. *Circ. Res.* *102*, 669–676.
- Venken, K., Hellings, N., Thewissen, M., Somers, V., Hensen, K., Rummens, J.-L., Medaer, R., Hupperts, R., and Stinissen, P. (2008). Compromised CD4⁺ CD25^(high) regulatory T-cell function in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis is correlated with a reduced frequency of FOXP3-positive cells and reduced FOXP3 expression at the single-cell level. *Immunology* *123*, 79–89.
- Venkitaraman, A.R., Williams, G.T., Dariavach, P., and Neuberger, M.S. (1991). The B-cell antigen receptor of the five immunoglobulin classes. *Nature* *352*, 777–781.
- 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., Espiño, M., Roldán, E., Marín, N., Costa-Frossard, L., Muriel, A., and Alvarez-Cermeño, J.C. (2011). Increased peripheral blood CD5⁺ B cells predict earlier conversion to MS in high-risk clinically isolated syndromes. *Mult. Scler. Houndmills Basingstoke Engl.* *17*, 690–694.
- Villard-Mackintosh, L., and Vessey, M.P. (1993). Oral contraceptives and reproductive factors in multiple sclerosis incidence. *Contraception* *47*, 161–168.
- Vinuesa, C.G., Tangye, S.G., Moser, B., and Mackay, C.R. (2005). Follicular B helper T cells in antibody responses and autoimmunity. *Nat. Rev. Immunol.* *5*, 853–865.

- Vinuesa, C.G., Sanz, I., and Cook, M.C. (2009). Dysregulation of germinal centres in autoimmune disease. *Nat. Rev. Immunol.* 9, 845–857.
- Virtanen, J., Wohler, J., Fenton, K., Reich, D., and Jacobson, S. (2013). Oligoclonal bands in multiple sclerosis reactive against two herpesviruses and association with magnetic resonance imaging findings. *Mult. Scler.* Houndmills Basingstoke Engl.
- Von Büdingen, H-Christian, Tracy C Kuo, Marina Sirota, Christopher J van Belle, Leonard Apeltsin, Jacob Glanville, Bruce A Cree, et al. 2012. “B Cell Exchange Across the Blood-brain Barrier in Multiple Sclerosis.” *The Journal of Clinical Investigation* 122 (12) (December 3): 4533–4543. doi:10.1172/JCI63842.
- Wardemann, H., and Nussenzweig, M.C. (2007). B-cell self-tolerance in humans. *Adv. Immunol.* 95, 83–110.
- Wardemann, H., Yurasov, S., Schaefer, A., Young, J.W., Meffre, E., and Nussenzweig, M.C. (2003). Predominant Autoantibody Production by Early Human B Cell Precursors. *Science* 301, 1374–1377.
- Warren, K.G., and Catz, I. (1993). Autoantibodies to myelin basic protein within multiple sclerosis central nervous system tissue. *J. Neurol. Sci.* 115, 169–176.
- Warrington, A.E., Asakura, K., Bieber, A.J., Ciric, B., Van Keulen, V., Kaveri, S.V., Kyle, R.A., Pease, L.R., and Rodriguez, M. (2000). Human monoclonal antibodies reactive to oligodendrocytes promote remyelination in a model of multiple sclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 6820–6825.
- Weber, M.S., Hemmer, B., and Cepok, S. (2011). The role of antibodies in multiple sclerosis. *Biochim. Biophys. Acta* 1812, 239–245.
- Wei, C., Anolik, J., Cappione, A., Zheng, B., Pugh-Bernard, A., Brooks, J., Lee, E.-H., Milner, E.C.B., and Sanz, I. (2007). A new population of cells lacking expression of CD27 represents a notable component of the B cell memory compartment in systemic lupus erythematosus. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 178, 6624–6633.
- Weill, J.-C., Weller, S., and Reynaud, C.-A. (2009). Human marginal zone B cells. *Annu. Rev. Immunol.* 27, 267–285.
- Wekerle, H. (2008). Lessons from multiple sclerosis: models, concepts, observations. *Ann. Rheum. Dis.* 67 Suppl 3, iii56–60.
- Weller, S., Faili, A., Garcia, C., Braun, M.C., Le Deist F, F., de Saint Basile G, G., Hermine, O., Fischer, A., Reynaud, C.A., and Weill, J.C. (2001). CD40-CD40L independent Ig gene hypermutation suggests a second B cell diversification pathway in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 1166–1170.
- Weller, S., Braun, M.C., Tan, B.K., Rosenwald, A., Cordier, C., Conley, M.E., Plebani, A., Kumararatne, D.S., Bonnet, D., Tournilhac, O., et al. (2004). Human blood IgM “memory” B cells are circulating splenic marginal zone B cells harboring a prediversified immunoglobulin repertoire. *Blood* 104, 3647–3654.

- Weller, S., Bonnet, M., Delagrèverie, H., Israel, L., Chrabieh, M., Maródi, L., Rodriguez-Gallego, C., Garty, B.-Z., Roifman, C., Issekutz, A.C., et al. (2012). IgM+IgD+CD27+ B cells are markedly reduced in IRAK-4-, MyD88-, and TIRAP- but not UNC-93B-deficient patients. *Blood* 120, 4992–5001.
- Van Weyenbergh, J., Lipinski, P., Abadie, A., Chabas, D., Blank, U., Liblau, R., and Wietzerbin, J. (1998). Antagonistic action of IFN-beta and IFN-gamma on high affinity Fc gamma receptor expression in healthy controls and multiple sclerosis patients. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 161, 1568–1574.
- White, C.A., Nguyen, K.B., and Pender, M.P. (2000). B cell apoptosis in the central nervous system in experimental autoimmune encephalomyelitis: roles of B cell CD95, CD95L and Bcl-2 expression. *J. Autoimmun.* 14, 195–204.
- William, J., Euler, C., Christensen, S., and Shlomchik, M.J. (2002). Evolution of autoantibody responses via somatic hypermutation outside of germinal centers. *Science* 297, 2066–2070.
- Wingerchuk, D.M., Lesaux, J., Rice, G.P.A., Kremenchutzky, M., and Ebers, G.C. (2005). A pilot study of oral calcitriol (1,25-dihydroxyvitamin D3) for relapsing-remitting multiple sclerosis. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 76, 1294–1296.
- Wolburg, H., Wolburg-Buchholz, K., Liebner, S., and Engelhardt, B. (2001). Claudin-1, claudin-2 and claudin-11 are present in tight junctions of choroid plexus epithelium of the mouse. *Neurosci. Lett.* 307, 77–80.
- Wyss-Coray, T., Borrow, P., Brooker, M.J., and Mucke, L. (1997). Astroglial overproduction of TGF-beta 1 enhances inflammatory central nervous system disease in transgenic mice. *J. Neuroimmunol.* 77, 45–50.
- Yanaba, K., Bouaziz, J.-D., Haas, K.M., Poe, J.C., Fujimoto, M., and Tedder, T.F. (2008). A regulatory B cell subset with a unique CD1dhiCD5+ phenotype controls T cell-dependent inflammatory responses. *Immunity* 28, 639–650.
- Yang, M., Hase, H., Legarda-Addison, D., Varughese, L., Seed, B., and Ting, A.T. (2005). B cell maturation antigen, the receptor for a proliferation-inducing ligand and B cell-activating factor of the TNF family, induces antigen presentation in B cells. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 175, 2814–2824.
- Yankee, T.M., and Clark, E.A. (2004). B-Cell Antigen Receptor. In *Encyclopedia of Biological Chemistry*, Editors-in-Chief: William J. Lennarz, and M. Daniel Lane, eds. (New York: Elsevier), pp. 155–158.
- Yao, X.R., Flaswinkel, H., Reth, M., and Scott, D.W. (1995). Immunoreceptor tyrosine-based activation motif is required to signal pathways of receptor-mediated growth arrest and apoptosis in murine B lymphoma cells. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 155, 652–661.
- Yednock, T.A., Cannon, C., Fritz, L.C., Sanchez-Madrid, F., Steinman, L., and Karin, N. (1992). Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis by antibodies against alpha 4 beta 1 integrin. *Nature* 356, 63–66.
- Young, I.R., Hall, A.S., Pallis, C.A., Legg, N.J., Bydder, G.M., and Steiner, R.E. (1981). Nuclear magnetic resonance imaging of the brain in multiple sclerosis. *Lancet* 2, 1063–1066.

Yousry, T.A., Major, E.O., Ryschkewitsch, C., Fahle, G., Fischer, S., Hou, J., Curfman, B., Miszkiel, K., Mueller-Lenke, N., Sanchez, E., et al. (2006). Evaluation of patients treated with natalizumab for progressive multifocal leukoencephalopathy. *N. Engl. J. Med.* *354*, 924–933.

Yu, X., Tsibane, T., McGraw, P.A., House, F.S., Keefer, C.J., Hicar, M.D., Tumpey, T.M., Pappas, C., Perrone, L.A., Martinez, O., et al. (2008). Neutralizing antibodies derived from the B cells of 1918 influenza pandemic survivors. *Nature* *455*, 532–536.

Yurasov, S., Wardemann, H., Hammersen, J., Tsuiji, M., Meffre, E., Pascual, V., and Nussenzweig, M.C. (2005). Defective B cell tolerance checkpoints in systemic lupus erythematosus. *J. Exp. Med.* *201*, 703–711.

Zandvoort, A., and Timens, W. (2002). The dual function of the splenic marginal zone: essential for initiation of anti-TI-2 responses but also vital in the general first-line defense against blood-borne antigens. *Clin. Exp. Immunol.* *130*, 4–11.

Zhang, J., Markovic-Plese, S., Lacet, B., Raus, J., Weiner, H.L., and Hafler, D.A. (1994). Increased frequency of interleukin 2-responsive T cells specific for myelin basic protein and proteolipid protein in peripheral blood and cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis. *J. Exp. Med.* *179*, 973–984.

Zhang, X., Koldzic, D.N., Izikson, L., Reddy, J., Nazareno, R.F., Sakaguchi, S., Kuchroo, V.K., and Weiner, H.L. (2004). IL-10 is involved in the suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by CD25+CD4+ regulatory T cells. *Int. Immunol.* *16*, 249–256.

Zheng, N.-Y., Wilson, K., Wang, X., Boston, A., Kolar, G., Jackson, S.M., Liu, Y.-J., Pascual, V., Capra, J.D., and Wilson, P.C. (2004). Human immunoglobulin selection associated with class switch and possible tolerogenic origins for C delta class-switched B cells. *J. Clin. Invest.* *113*, 1188–1201.

Zhong, X., Gao, W., Degauque, N., Bai, C., Lu, Y., Kenny, J., Oukka, M., Strom, T.B., and Rothstein, T.L. (2007). Reciprocal generation of Th1/Th17 and T(reg) cells by B1 and B2 B cells. *Eur. J. Immunol.* *37*, 2400–2404.

Zivadinov, R., Nasuelli, D., Tommasi, M.A., Serafin, M., Bratina, A., Ukmar, M., Pirko, I., Johnson, A.J., Furlan, C., Pozzi-Mucelli, R.S., et al. (2006). Positivity of cytomegalovirus antibodies predicts a better clinical and radiological outcome in multiple sclerosis patients. *Neurol. Res.* *28*, 262–269.

Caractérisation des lymphocytes B reconnaissant la MOG dans la Sclérose en plaques

La Sclérose En Plaques (SEP) est une maladie inflammatoire et chronique du Système Nerveux Central (SNe), caractérisée par un infiltrat leucocytaire et une démyélinisation au sein de la substance blanche. L'étiologie de la SEP reste inconnue bien que des facteurs génétiques et environnementaux ont été mis en cause. La maladie déclarée présente une composante auto-immune importante avec la présence des Lymphocytes T et des anticorps spécifiques d'antigène de la myéline tout au long de la maladie. Les études se sont beaucoup focalisées sur l'implication des anticorps dans la maladie mais de récentes données suggèrent que les LB sont impliqués dans la SEP par d'autres mécanismes que la production d'anticorps. En effet, l'administration d'anticorps monoclonaux anti-CD20, qui déplètent et modifient les fonctions du LB mais pas la concentration d'anticorps circulants, réduit les lésions inflammatoires. Une nouvelle approche est donc fondamentale pour comprendre l'implication des LB dans la SEP. Bien que les LB spécifiques d'un antigène donné soient en faible quantité en périphérie, nous avons développé une méthode permettant d'analyser la fréquence des LB circulants spécifiques de la MOG en utilisant la MOG couplée à des billes fluorescentes. Nous observons une proportion élevée de LB spécifiques de la MOG chez les patients atteints de SEP et chez les témoins sains. Cependant, cette proportion est diminuée chez les patients SEP comparé aux témoins. Différentes hypothèses ont été testées pour étudier ce résultat inattendu dont l'apoptose des B spécifiques de la MOG chez les patients, leur migration dans le SNe.

Mots-clés: SEP-MOG-Lymphocytes B

Characterization of MOG-specific B cells in Multiple Sclerosis

Multiple Sclerosis is a chronic inflammatory demyelinating disease of the Central Nervous System (CNS), characterized by leukocyte infiltration and white matter demyelination. MS etiology remains elusive although genetic and environmental factors have been implicated. Overt disease is considered to have a major autoimmune component and both T cells and antibodies (Ab) specific to myelin are present during the course of the disease. Studies have focused on anti-myelin Ab, but recent data highlighted a possible implication of B cells, regardless their capacity to produce Ab. Indeed, treatment with the anti-CD20 monoclonal Ab, which both deplete and modify B cell functions but not circulating titers of Ab, reduces the disease inflammation. A new approach is thus fundamental to study the implication of B cells in MS. Although the study of specific B cells for a given antigen was a challenge in periphery, we developed a bead-based method to analyze circulating MOG-specific B cell frequency in MS. A substantial fraction of B cells bound to MOG-coated beads was characterized in the blood of both Healthy Individuals (HI) and MS patients. Unexpectedly, the frequency of MOG-specific B cells in MS patients was lower compared to the circulating frequency in HI. To explain this result, several hypotheses as the apoptosis and the migration of MOG-specific B cells into CNS have been explored.

Key words: MS-MOG- B cells

ELONG NGONO Annie INSERM UMRI064 - Equipe 4
Jean-Paul Soullou Directeur de thèse