

Université de Montréal

Rôles de DICAM et ALCAM dans la migration des lymphocytes vers le système nerveux central

Par

Camille Grasmuck

Département de Neurosciences, Faculté de Médecine

Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de Philosophiae doctor (Ph.D.)

en Neurosciences

Avril 2022

© Camille Grasmuck, 2022

Université de Montréal

Unité académique : département de neurosciences, Faculté de médecine

Cette thèse intitulée

Rôles de DICAM et ALCAM dans la migration des lymphocytes vers le système nerveux central

Présentée par

Camille Grasmuck

A été évaluée par un jury composé des personnes suivantes

Alex Parker

Président-rapporteur

Alexandre Prat

Directeur de recherche

Laure Michel

Codirecteur

Thierry Alquier

Membre du jury

Jasna Kriz

Examineur externe

Résumé

La perturbation de la barrière hémocéphalique et la migration des lymphocytes de la périphérie vers le système nerveux central (SNC) sont des événements précoces dans la formation des lésions cérébrales de sclérose en plaques (SEP). Dans ce contexte, les lymphocytes passent au travers des barrières hémocéphalique ou hémoméningée pour atteindre le SNC et sont des contributeurs importants dans l'inflammation et les dommages tissulaires. Pour migrer à travers les barrières du SNC, les lymphocytes pathogéniques expriment des molécules d'adhérence. Identifier les acteurs clés à la migration des lymphocytes pathogéniques en estimant la contribution des molécules d'adhérence dans ce processus est la prochaine étape pour le développement de thérapies pour traiter la SEP. L'objectif de ce projet est d'explorer le rôle de deux molécules d'adhérence que sont ALCAM (de l'anglais : *activated leukocytes cell adhesion molecule*) et DICAM (de l'anglais : *dual immunoglobulin domain containing cell adhesion molecule*) dans la migration des lymphocytes pathogéniques vers le SNC pendant la SEP. Notre objectif principal se subdivise en deux sous-objectifs. En premier, notre but est de caractériser le rôle d'ALCAM dans le passage des lymphocytes B à travers les barrières du SNC dans un contexte neuroinflammatoire. En second, nous explorons le rôle de DICAM dans la migration des lymphocytes T auxiliaires 17 (T_H17) vers le SNC en neuroinflammation. Nous faisons l'hypothèse qu'ALCAM contribue à la migration des lymphocytes B vers le SNC et que DICAM est impliqué dans la migration des lymphocytes T_H17 à travers la barrière hémocéphalique pendant la SEP. Ces molécules d'adhérence seraient alors impliquées dans la pathogenèse de la SEP et seraient de potentielles cibles thérapeutiques pour traiter cette maladie.

Nous avons d'abord utilisé une combinaison de spectrométrie de masse, PCR quantitative, cytométrie de flux et microscopie afin d'explorer l'expression de chacune de ses deux molécules d'adhérence sur les lymphocytes d'intérêt périphériques *ex vivo* ou différenciés *in vitro*. Des analyses en cytométrie en flux et microscopie nous ont permis de caractériser leur expression dans le sang périphérique et dans les lésions cérébrales de personnes atteintes de SEP. Ensuite, les expériences d'adhérence en flux et de migration *in vitro* effectuées en déplaçant la molécule

d'adhérence d'intérêt ont permis de mettre en évidence leur rôle dans différentes étapes de la migration des lymphocytes à travers les cellules endothéliales des barrières du SNC. Pour finir, le traitement de plusieurs modèles murins de SEP, appelés EAE (de l'anglais : *experimental autoimmune encephalomyelitis*), avec des anticorps bloquant anti-ALCAM ou anti-DICAM ont permis d'explorer le potentiel effet de tels traitements sur la sévérité de la maladie.

Dans la première étude, nos résultats montrent qu'ALCAM est préférentiellement exprimée par les lymphocytes B pro-inflammatoires, mémoires et effecteurs au potentiel pathogénique. En tant que molécule d'adhérence, ALCAM contribue à leur migration à travers les cellules endothéliales des barrières hémencéphalique et hémoméningée chez la souris et l'humain. De plus, nos expériences ont permis de montrer que la fréquence de lymphocytes B ALCAM⁺ est augmentée dans le sang périphérique des personnes atteintes de SEP et ces cellules sont aussi présentes dans les lésions et les infiltrats méningées en SEP. Finalement, bloquer ALCAM *in vivo* réduit la sévérité de la maladie EAE en diminuant l'infiltration des lymphocytes B au SNC.

Dans la seconde étude, nous avons montré que parmi les sous-types de lymphocytes T_H, DICAM est préférentiellement exprimée par les lymphocytes T_H17. Dans les lésions de SEP, DICAM et son ligand $\alpha_v\beta_3$ co-localisent avec des marqueurs de cellules endothéliales suggérant que ces deux molécules pourraient être présentées à la lumière des vaisseaux aux lymphocytes T_H17 circulants. Dans le sang périphérique, la fréquence de lymphocytes T CD4⁺ exprimant DICAM est augmentée chez les personnes atteintes de SEP et cette augmentation corrèle avec l'activité de la maladie. Nos expériences ont montré que DICAM est impliquée dans l'adhérence, l'arrêt et la diapédèse des lymphocytes T_H17 à travers les cellules endothéliales de la barrière hémencéphalique *in vitro* et *in vivo*. Finalement, le traitement de souris EAE avec un anticorps bloquant DICAM permet de réduire la sévérité de la maladie et diminue la migration des lymphocytes T_H17 vers le SNC.

Nos résultats indiquent un rôle d'ALCAM dans la migration des lymphocytes B et que DICAM, préférentiellement exprimé par les T_H17, médie leur migration vers le SNC. Bloquer ALCAM ou DICAM sont deux stratégies permettant de réduire l'accès au SNC de différents sous-types de cellules pathogéniques pendant la neuroinflammation. Ainsi, elles sont toutes deux de potentielles cibles thérapeutiques pour réduire la sévérité et la progression de la SEP.

Mots-clés : système nerveux central, barrière hémocéphalique, barrière hémoméningée, neuroinflammation, sclérose en plaques, migration cellulaire, molécule d'adhérence, ALCAM, DICAM.

Abstract

Disruption of the blood-brain barrier and migration of lymphocytes from the periphery to the central nervous system (CNS) are early events in lesion formation during multiple sclerosis (MS). Lymphocytes readily cross the blood-brain barrier (BBB) and the blood-meningeal barrier (BMB) to infiltrate the CNS and are important contributors to inflammation and tissue damage. To migrate through the brain barriers, pathogenic lymphocytes express adhesion molecules. Identifying key players in lymphocyte migration by understanding the role of adhesion molecules is the next step to develop novel therapies to treat MS. The objective of this project is to explore the role of two distinct adhesion molecules ALCAM (activated leukocytes cell adhesion molecule) and DICAM (dual immunoglobulin domain containing cell adhesion molecule) in pathogenic lymphocytes migration to the CNS during MS. This thesis subdivides in two main objectives. First, we aim to characterize ALCAM role in B lymphocyte migration to the CNS during neuroinflammation. Second, we aim to explore DICAM role in T helper 17 (T_H17) lymphocytes migration to the CNS in neuroinflammation. We hypothesized that ALCAM plays a role in B lymphocytes migration to the CNS during MS and that DICAM is involved in T_H17 lymphocytes migration through the blood-brain barrier during MS. Those adhesion molecules might be involved in MS pathogenesis and therefore could become new therapeutic targets to treat MS.

We first used mass spectrometry, quantitative PCR, flow cytometry and confocal microscopy to explore expression profiles of ALCAM and DICAM by peripheral lymphocytes subpopulations *ex vivo* and differentiated *in vitro*. Flow cytometry and confocal microscopy analysis also revealed how those adhesion molecules are expressed by lymphocytes in peripheral blood and brain lesions of people living with MS. Then, we performed flow adhesion and migration assay of lymphocytes depleted for the adhesion molecule of interest allowing us to address their role in multistep migration process through brain barriers endothelial cells. Finally, using five distinct murine experimental autoimmune encephalomyelitis models (EAE), we explored how blocking ALCAM or DICAM *in vivo* could affect lymphocytes migration to the SNC and disease severity.

In the first manuscript, we described that ALCAM is preferentially expressed by B lymphocytes with memory, pro-inflammatory and effector phenotypes. Functionally, ALCAM is involved in B lymphocyte migration through both the BBB and the BMB in mouse and human. Interestingly, we showed that ALCAM expressing B lymphocytes are increased in peripheral blood of people living with MS and they are recovered in meningeal and parenchymal MS lesions. Last, blocking ALCAM *in vivo* alleviates EAE severity by reducing B lymphocyte infiltration to the CNS.

In the second manuscript, we showed that T_H17 lymphocytes preferentially express DICAM and can adhere both to DICAM and its ligand $\alpha_v\beta_3$. Moreover, DICAM and $\alpha_v\beta_3$ are both overexpressed by inflamed brain endothelial cells. In MS lesions, we described that both molecules colocalize with endothelial cell markers suggesting that it could be presented to the vessel lumen to the circulating T_H17 lymphocytes. In peripheral blood, we showed that DICAM⁺ memory CD4⁺ T lymphocytes frequency is increased in people living with MS and it correlates with active form of the disease. Then, we described DICAM as a player in T_H17 lymphocyte adhesion, arrest and migration through BBB endothelial cells *in vitro* and *in vivo*. Last, we showed that treating mice with a neutralizing DICAM antibody in several distinct models of EAE, reduced disease severity and T_H17 cell migration to the SNC.

Our data provide evidence of the role of ALCAM in memory B lymphocyte migration and that DICAM is preferentially expressed by T_H17 cells and mediate their migration to the CNS during neuroinflammation. Collectively, our findings indicate that blocking ALCAM or DICAM are two ways to restrict different pathogenic cells access to the CNS during neuroinflammation and thus potentially to reduce the severity and worsening of a disease like MS.

Keywords: central nervous system, blood-brain barrier, blood-meningeal barrier, neuroinflammation, multiple sclerosis, cell migration, adhesion molecule, activated leukocyte cell adhesion molecule (ALCAM), dual immunoglobulin domain containing cell adhesion molecule (DICAM).

Table des matières

Résumé.....	3
Abstract	6
Table des matières	8
Liste des tableaux	15
Liste des figures	16
Liste des sigles et abréviations	18
Remerciements	22
Chapitre 1 – Introduction	25
Vue d’ensemble du sujet de la thèse.....	25
Contexte spécifique.....	26
1. Les barrières du système nerveux central	26
1.2 La barrière hémato-encéphalique et hémato-méningée.....	28
1.2.1 Les cellules endothéliales	30
1.2.2 Les lames basales.....	31
1.2.3 Les péricytes	31
1.2.4 Les astrocytes	32
1.3 La migration des cellules immunitaires à travers les barrières endothéliales du SNC	32
1.4 Les barrières du SNC dans le cadre de la maladie.	36
2. La sclérose en plaques	37
2.1 Historique	38
2.2 Épidémiologie	39

2.3	Physiopathologie	40
2.3.1	Les formes de SEP	40
2.3.2	Symptômes	42
2.3.3	Lésions	42
2.3.4	Diagnostic	44
2.4	Les traitements	45
2.4.1	Les traitements modificateurs de la maladie pour la forme poussée-rémission.	46
2.4.2	Les traitements modificateurs de la maladie pour les formes progressives de SEP	48
2.4.3	Effets secondaires graves	48
2.5	L'encéphalite auto-immune expérimentale comme modèle animal de la SEP	49
2.5.1	L'EAE active	50
2.5.2	L'EAE passive	51
2.5.3	L'EAE spontanée	52
3.	Les populations lymphocytaires en SEP	54
3.1	Les lymphocytes T	54
3.1.1	Les lymphocytes T CD4 ⁺	55
3.1.2	Les lymphocytes T CD8 ⁺	61
3.2	Les lymphocytes B	63
3.2.1	Les anticorps et les cellules sécrétrices d'anticorps en SEP	64
3.2.2	Les lymphocytes B mémoires	66
4.	Les molécules d'adhérence dans le recrutement des leucocytes au SNC	68
4.1	ALCAM	69
4.1.1	Structure protéique et ligands	69

4.1.2 Fonctions	70
4.1.3 Implication d'ALCAM dans la SEP	71
4.2 DICAM.....	73
4.2.1 Structure protéique et ligands.....	73
4.2.2 Fonctions	73
4.2.3 Dans la maladie.....	74
Énoncé clair du problème.....	75
Hypothèse générale à tester	76
Objectifs spécifiques.....	77
Chapitre 2 – Manuscrit 1	78
Activated leukocyte cell adhesion molecule regulates B lymphocyte migration across central nervous system barriers	79
Abstract	80
Introduction.....	80
Results	82
ALCAM is primarily expressed on effector memory B lymphocytes.....	82
ALCAM on murine B lymphocytes correlates with EAE severity	83
ALCAM promotes the extravasation of murine B lymphocytes across BBB endothelium....	84
Blocking ALCAM hinders EAE progression and reduces the trafficking of B lymphocyte into the CNS	84
ALCAM mediates B lymphocyte migration across human CNS barriers.....	85
Peripheral and brain-infiltrating B lymphocytes up-regulate ALCAM in patients with MS ..	86
Discussion	87
Materials and methods	90

Study design	90
Statistical analysis.....	90
References and notes	103
Supplementary materials	115
Materials and Method.....	115
<i>Ex vivo</i> B lymphocytes isolation and culture.....	115
Flow cytometry.....	115
Immunostaining.....	116
Mice colonies.....	117
EAE induction, scoring and pathology	118
EAE sacrifice and B lymphocytes staining.....	118
Primary cultures of mouse BBB-endothelial cells (MBECs)	119
Flow assays	120
Intravital microscopy	121
Human BBB & BMB endothelial cells isolation & culture.....	121
Migration assays and blocking experiments.....	122
Patient Classification	122
Ultra-Fast Autopsy & Patient Classification.....	123
Supplementary figures	124
Chapitre 3 – Manuscrit 2	140
DICAM promotes T _H 17 lymphocyte trafficking across the blood-brain barrier during autoimmune neuroinflammation.....	141
Abstract	142
Introduction.....	142

Results	145
DICAM is a T _H 17-associated cell adhesion molecule	145
The expression of DICAM on circulating CD4 ⁺ T lymphocytes is up-regulated in patients with active RRMS and PMS.....	146
DICAM ligands are up-regulated on BBB endothelium under inflammatory conditions and in MS lesions.....	147
DICAM promotes the migration of T _H 17 lymphocytes across the BBB during neuroinflammation.....	148
Blocking DICAM with a monoclonal antibody alleviates relapsing-remitting and progressive symptoms in multiple EAE models	149
Discussion	151
Materials and methods	155
Study design	155
Statistical analysis.....	156
References and notes	171
Supplementary materials	182
Materials and Methods	182
Human Cell Isolation and Culture	182
Proteomic Analysis	183
Classification of Patients with Multiple Sclerosis	184
RNA Isolation and Real Time Quantitative Polymerase Chain Reaction (PCR)	184
Anti-Dual Immunoglobulin domain containing Cell Adhesion Molecule (DICAM) Antibody Generation and Purification	184
Flow Cytometry	185
Immunostaining.....	186

<i>In Vitro</i> Adhesion to Plate-Bound Ligands	188
<i>In Vitro</i> Flow Adhesion on Murine Blood-Brain Barrier Endothelial Cells.....	188
Intravital Two-Photon Laser Scanning Microscopy	188
<i>In Vitro</i> Adhesion on Human Blood-Brain Barrier Endothelial Cells	189
<i>In Vitro</i> Migration Across Human Blood-Brain Barrier Endothelial Cells	189
Experimental Autoimmune Encephalomyelitis	190
Supplementary figures	192
Chapitre 4 – Discussion	198
Le rôle d'ALCAM dans la migration des lymphocytes B vers le SNC en SEP	199
ALCAM est exprimée par des lymphocytes B au profil pathogénique	200
ALCAM est surexprimée par les lymphocytes B périphériques de patients atteints de SEP	202
ALCAM participe à la migration des lymphocytes B à travers les barrières du SNC.....	203
Bloquer ALCAM <i>in vivo</i> réduit l'infiltration au SNC des lymphocytes B et la sévérité de la maladie chez les souris EAE.	205
Le rôle de DICAM dans la migration des lymphocytes T _H 17.....	207
DICAM est préférentiellement exprimée par les lymphocytes T _H 17	209
DICAM est surexprimée par les lymphocytes T CD4 ⁺ mémoires périphériques de patients atteints de SEP actives.....	210
DICAM et son ligand $\alpha_v\beta_3$ sont surexprimés par les cellules endothéliales de la barrière hémocéphalique dans un contexte inflammatoire.....	211
DICAM participe à la migration des lymphocytes T _H 17 à travers les cellules endothéliales de la barrière hémocéphalique	212
Bloquer DICAM <i>in vivo</i> entraîne une réduction de la sévérité de l'EAE progressive et cyclique	213

Chapitre 5 – Conclusion.....	215
Références bibliographiques	217

Liste des tableaux

Table S1. Associations between DICAM frequency on memory CD4 ⁺ T lymphocytes and disease activity in patients with different forms of MS.....	197
--	-----

Liste des figures

Fig. i1. Les barrières hémo-encéphalique et h�mo-méningée.....	29
Fig. i2. Les étapes de la migration des leucocytes à travers les barrières endothéliales du SNC. 35	
Fig. i3. Les formes de SEP.....	41
Fig. 1. ALCAM identifies populations of pathogenic human B lymphocytes.....	91
Fig. 2. ALCAM on B lymphocytes correlates with rhMOG-EAE severity.....	93
Fig. 3. ALCAM mediates the rolling and adhesion of murine B lymphocytes on BBB endothelium.	95
Fig. 4. ALCAM contributes to pathogenic B lymphocyte infiltration in EAE.....	97
Fig. 5. ALCAM mediates the migration of human B lymphocytes across human CNS barriers. 99	
Fig. 6. ALCAM is expressed by B lymphocytes in patients with MS.	101
Fig. S1. Activated B lymphocytes up-regulate ALCAM upon both BCR- and TLR-dependent activation.....	124
Fig. S2. ALCAM expression on peripheral and CNS-infiltrating B lymphocytes is increased during the course of MOG ₃₅₋₅₅ -EAE.....	125
Fig. S3. ALCAM ⁺ B lymphocytes are preferentially localized in meningeal infiltrates in EAE.	126
Fig. S4. Few immune cells and B lymphocytes are isolated from the CNS of naïve WT mice. 127	
Fig. S5. CNS-infiltrating B lymphocytes do not coexpress cell adhesion molecules in EAE...	128
Fig. S6. Immune cells infiltrate CNS of ALCAM KO and WT mice during the chronic phase of the disease.....	129
Fig. S7. Absolute numbers of B lymphocytes are similar in lymphoid organs of ALCAM KO and WT mice in the presymptomatic phase.....	130
Fig. S8. Non-B lymphocyte immune cell migration into the CNS is not affected by ALCAM blockade in B lymphocyte-dependent rhMOG EAE model.....	132

Fig. S9. ALCAM promotes the migration of human B lymphocytes across CNS barriers and is up-regulated in relapsing patients with MS.	133
Fig. S10. ALCAM mediates the adhesion of human B lymphocytes on BBB endothelium. ...	134
Fig. S11. Cell adhesion molecules are coexpressed on <i>ex vivo</i> B lymphocytes from PBMCs of patients with MS.	135
Fig. S12. Most CD20 ⁺ cells in MS brain immune infiltrates are not CD3 ⁺ cells.	136
Fig. S13. Cell adhesion molecules are coexpressed on B lymphocytes in MS lesions.	138
Fig. 1. DICAM is a cell adhesion molecule that is strongly associated with the human T _H 17 phenotype	157
Fig. 2. DICAM is preferentially expressed on circulating IL-17 ⁺ memory CD4 ⁺ T lymphocytes.	159
Fig. 3. DICAM expression on memory CD4 ⁺ T lymphocytes in the peripheral blood of patients with MS is correlated with active disease courses.	161
Fig. 4. The expression of DICAM ligands on blood-brain barrier endothelial cells is up-regulated under inflammatory conditions and in MS lesions.	163
Fig. 5. DICAM mediates the trafficking of T _H 17 lymphocytes across BBB-ECs in EAE and MS.	165
Fig. 6. Therapeutically blocking DICAM reduces EAE disease severity and T _H 17 infiltration into the CNS.	167
Fig. 7. Pharmacologically targeting DICAM with clinically relevant antibody dosage alleviates relapsing-remitting and progressive EAE symptoms.	169
Fig. S1. T _H 17 and T _H 1 cells adhere to DICAM and $\alpha_v\beta_3$ <i>in vitro</i>	192
Fig. S2. Validation of anti-DICAM monoclonal antibody.	193
Fig. S3. Anti-DICAM 9E9 clone blocks the adhesion and migration of T _H 17 lymphocytes. ...	195
Fig. S4. Prophylactically and therapeutically blocking DICAM alleviates EAE disease severity.	196

Liste des sigles et abréviations

ADAM17 : *a disintegrin and metalloprotease17*

ALCAM : *activated leukocyte cell adhesion molecule*

AVC : accident vasculaire cérébral

ARN : acide ribonucléiques messagers

BCR : *B cell receptor* (récepteur des lymphocytes B)

CCR : récepteur de chimiokines C-C

CMH-I : complexe majeur d'histocompatibilité de classe I

CMH-II : complexe majeur d'histocompatibilité de classe II

CpG : motifs bactériens communs d'ADN non méthylés (dinucléotide cytosine-phosphate-guanine)

CXCR : récepteur de chimiokines C-X-C

DICAM : *dual immunoglobulin domain containing cell adhesion molecule*

EAE : encéphalomyélite auto-immune expérimentale

ELISA : *enzyme-linked immunosorbent assay*

EDSS : *extended disability status score*

FoxP3 : *forhead box P3*

G-CSF : *granulocyte colony-stimulating factor*

GM-CSF : *granulocyte-macrophage colony stimulating factor*

HLA : *human leukocyte antigen*

HUVEC : *human umbilical vein endothelial cells*

ICAM-1 : *intercellular adhesion molecule-1*

IFN- γ : interféron- γ

Ig : immunoglobuline

IL : interleukine

IL-1R : récepteur à l'interleukine-1

IL-12R : récepteur à l'interleukine-12

IL-22R : récepteur à l'interleukine-22
IP-10 : *interferon- γ inducible protein-10*
IRM : imagerie à résonance magnétique
JAM : *junctional adhesion molecules*
JC : John Cunningham
KO : *knockout*
LFA-1 : *lymphocyte function-associated antigen-1*
LMP : leucoencéphalopathie multifocale progressive
LCR : liquide céphalo-rachidien
LT- α : lymphotoxine- α
MAdCAM-1 : *mucosal addressin cell adhesion molecule-1*
MBP : *myelin basic protein* (protéine basique de la myéline)
MCAM : *melanoma cell adhesion molecule*
MOG : *myelin oligodendrocyte glycoprotein* (glycoprotéine oligodendrocyte de la myéline)
MOGAD : *MOG antibody-associated diseases* (maladies associées à des anticorps anti-MOG)
NEDA : *No evidence of disease activity*
Ninjurin-1 : *Nerve injury-induced protein-1*
NK : *natural killer*
PECAM-1 : *Platelet-endothelial cell adhesion molecule-1*
PKC α : protéine kinase C α
PLP : protéine protéolipide
RCPG : récepteur couplé aux protéines G
ROR γ t : *retinoic-acid-receptor-related orphan receptor γ t*
SEP : sclérose en plaques
SNC : système nerveux central
T-bet : *T-box expressed in T cells*
Tc : lymphocyte T cytotoxique
TCR : *T cell receptor* (récepteur des lymphocytes T)
TGF- β : *transforming growth factor- β*

T_H : *T helper* (lymphocyte T auxiliaire)

TLR : *toll-like receptor* (récepteur de type Toll)

TNF- α : *tumor necrosis factor- α*

T_{reg} : lymphocyte T régulateur

VCAM-1 : *vascular cell adhesion molecule-1*

VE-Cadhérine : *vascular endothelial cadherin*

VLA-4 : *very late antigen-4*

WT : *wild-type*

ZO : *zona occludens*

À mams, papounet, Maud, Claire et Baptiste

Remerciements

Pour commencer, j'aimerais remercier Alex d'avoir cru en moi et de m'avoir donné l'opportunité de faire mon doctorat dans son laboratoire. À travers les années dans le laboratoire, tu m'as offert la chance de me développer scientifiquement mais aussi personnellement dans un environnement dynamique où l'entraide et le travail d'équipe sont d'or.

J'aimerais aussi remercier Laure pour ton accueil, et pour m'avoir transmis toutes les connaissances et outils qui m'ont permis de m'épanouir dans le laboratoire. Merci de m'avoir fait confiance. Je tiens aussi à te remercier pour toute l'aide que tu m'as fournie à travers les années malgré la distance.

J'aimerais remercier Catherine Larochelle et Réjean Lapointe d'avoir accepté d'être les membres de mon comité de parrainage. Merci pour vos conseils qui ont été précieux dans mon cheminement de doctorat. Merci aussi à Nathalie Arbour pour ta disponibilité et d'avoir à cœur notre implication et épanouissement dans la communauté scientifique de la recherche sur la sclérose en plaques.

J'aimerais remercier Dominique Gauchat et Aurélie Cleret-Buhot pour votre gentillesse ainsi que votre dévouement et disponibilité à toute épreuve sur les plateformes de cytométrie de flux et de microscopie.

Merci à Lyne, la mam du lab dévouée jusqu'à passer des nuits à travailler avec nous. Tu m'as appris tellement de choses bien au-delà des affaires de laboratoire. Je ne me tannerais pas de jaser avec toi.

Merci à Sandra, pour nos heures passées au biphoton et toutes les autres occasions où tu m'as transmis ce que tu savais. Et pour les jasettes aussi...

Merci à Stephanie, pour nos discussions de science et de vie, et sur une autre note, pour nos séances d'escalade à rallonge depuis mon arrivée à Montréal.

J'aimerai aussi remercier tous les membres des laboratoires de Nathalie Arbour et Catherine Larochelle qui ont été de belles rencontres scientifiques et personnelles.

Je remercie aussi tous les membres du laboratoire présents : Bettina, Elaine, Fiona, Karine, Oumayma, Skander et Wendy; et les anciens : Ali, Antoine, Boaz, Camille, Chloé, Elizabeth, Evelyn, Florian, Hania, Jean-Philippe, Jennifer, Marc, Marc-André, Marion, Olivier, Tess, Soufiane.

Parmi eux, je tiens à remercier tout particulièrement mes amies Catherine, Laurence, Paula, Rose-Marie et Yousra que j'ai eu la chance de rencontrer au laboratoire. Vous avez été tellement importantes pour moi.

Merci à Rose-Marie pour ta passion, ton soutien et tes pep talks suprêmes, pour les discussions scientifiques, personnelles, culturelles, et j'en passe...

Merci à Yousra, pour toutes ses années où tu as été mon soutien de vie. Merci de m'avoir motivée, soutenue et aimée.

Je tiens à remercier Marionnette, avec qui je suis arrivée au Québec et qui est une amie en or. Je remercie aussi Elsa KKto, amie de feu, avec qui j'ai commencé l'université à Toulouse. Merci à Clémentine, amie inconditionnelle.

Merci à Anne-Sophie, ma plus belle rencontre et à sa famille, généreuse et chaleureuse.

Pour finir, je voudrais remercier ma famille, à qui je dédie cette thèse, Anne et Jean-Pierre mes petits parents, ainsi que mes frères et sœurs, Baptiste, Claire et Maud. Merci à vous pour votre soutien et amour inconditionnel. Vous êtes ma source d'inspiration.

Chapitre 1 – Introduction

Vue d'ensemble du sujet de la thèse

La sclérose en plaques (SEP) est une maladie historiquement connue pour sa complexité et l'incompréhension qui l'entoure. En 1976, Dr François Lhermitte, chef de service de neurologie à l'hôpital de la Salpêtrière à Paris révélait lors d'une interview son espoir : « Ce serait merveilleux d'avoir découvert le virus de la sclérose en plaques parce que au moins, on disposerait, en laboratoire, de la particule vivante responsable de la maladie ». Aujourd'hui, nous avons compris que la SEP ne résulte pas seulement d'une infection par un virus, mais plutôt d'une interaction de facteurs de risques. La complexité de ses interactions, encore floues, nous amène à penser que la recherche est encore à l'aube des découvertes qui permettront de lutter décisivement contre la maladie.

Au cours des trente dernières années, les avancées biotechnologiques, biochimiques, bio-informatiques et d'imagerie médicale ont permis un bond des traitements modificateurs de la maladie pour la SEP. Pourtant, beaucoup de questions persistent sur son étiologie et sa physiopathologie. L'objet de cette thèse de doctorat est parti intégrante des défis qu'impose la maladie de la SEP au monde de la recherche. La SEP est une maladie inflammatoire démyélinisante qui touche le système nerveux central (SNC). L'infiltration des cellules immunitaires du sang périphérique vers le SNC est une étape clef de la formation des plaques démyélinisantes. La barrière hémato-encéphalique étant normalement la gardienne de l'immunoprivilège du SNC, est alors le lieu de passage des cellules immunitaires potentiellement encéphalitogéniques de la périphérie vers le parenchyme cérébral. Ce mécanisme fut notamment découvert avec le développement des médicaments modificateurs de la maladie à travers l'histoire, tous concernant le système immunitaire. Allant de la première génération de thérapies immunomodulatrices des années 90 (interféron- β 1a, interféron- β 1b et acétate de glatiramère) qui réduisent l'inflammation, jusqu'à la génération actuelle des thérapies immunosuppressives (ex. teriflunomide, alemtuzumab, rituximab, ocrelizumab) qui inhibent voire déplètent des sous-populations du système immunitaire (Ransohoff et al., 2015). Au tournant de notre

compréhension de la physiopathologie de la SEP, se trouve le natalizumab. Cette thérapie, développée au début des années 2000, cause une forte inhibition de l'inflammation au sein du SNC en SEP en réduisant de plus de 90% le nombre de nouvelles lésions détectées en imagerie à résonance magnétique (IRM)(Polman et al., 2006; Rudick et al., 2006). Cela en fait, à ce jour, l'une des thérapies les plus efficaces pour lutter contre la SEP. L'un des mécanismes visés par cette thérapie est le passage des cellules immunitaires vers le SNC. Ce mécanisme est médié par l'interaction de molécules d'adhérences exprimées par les cellules immunitaires et à la paroi de vaisseaux sanguins constitutifs de la barrière hémato-encéphalique. Le natalizumab est un anticorps monoclonal dirigé contre l'intégrine VLA-4 (de l'anglais : *very late antigen-4*) et bloque ainsi son interaction avec VCAM-1 (de l'anglais : *vascular cell adhesion molecule-1*), une molécule d'adhérence exprimée par les cellules endothéliales de la barrière hémato-encéphalique. Ainsi, cette thérapie limite l'infiltration des leucocytes encéphalitogéniques dans le SNC, mais limite aussi le passage des leucocytes responsables de l'immunosurveillance, rendant le SNC plus vulnérable aux infections opportunistes parfois mortelles. Cela fait du natalizumab une thérapie d'une très grande efficacité mais associée à un risque de complications majeures.

C'est pourquoi, dans la lignée de cette thérapie, il est essentiel de développer un traitement d'une efficacité comparable tout en étant associé à de moindres risques. C'est dans ce contexte scientifique que cette thèse de doctorat s'inscrit. Dans l'espoir qu'elle contribue aux connaissances scientifiques qui mèneront à des avancées significatives dans la lutte contre la SEP.

Contexte spécifique

1. Les barrières du système nerveux central

La fonction première du SNC est le traitement de l'information par la transmission du message nerveux. Les messages nerveux sont une combinaison de signaux chimiques et électriques qui se propagent le long des axones et au niveau des synapses neuronales. Afin d'assurer la bonne transmission des messages nerveux, l'environnement moléculaire et chimique du SNC doit être stable et par conséquent, être isolé des menaces extérieures (Abbott et al., 2010).

Jouant ce rôle, les barrières du SNC sont le lieu d'échange avec la circulation périphérique (Daneman, 2012; Daneman & Engelhardt, 2017; Engelhardt et al., 2017; Zlokovic, 2008). Elles régissent la sélection stricte des cellules et composés pouvant atteindre le parenchyme cérébral et permettent l'évacuation du dioxyde de carbone et des déchets métaboliques du tissu. Il en existe trois majeures : la barrière hémocéphalique présente au niveau des capillaires du parenchyme cérébral, la barrière hémoméningée et la barrière sang-liquide céphalo-rachidien (LCR) au niveau des plexus choroïde.

Les barrières du SNC sont composées de plusieurs types cellulaires qui collaborent pour la préservation et l'isolement du parenchyme cérébral. Elles contrôlent ainsi l'homéostasie tissulaire par une perméabilité stricte et sélective des ions, molécules et cellules du flux sanguin. Les différentes barrières du SNC se distinguent les unes des autres par leur localisation anatomique ainsi que leur composition cellulaire. Les cellules endothéliales des microvaisseaux et des vaisseaux leptoméningés du SNC constituent la barrière hémocéphalique et hémoméningées respectivement et isolent ainsi le parenchyme cérébral et le LCR du sang périphérique. Les cellules épithéliales arachnoïdiennes constituent une barrière qui filtre les ions et composés entre le sang et le LCR au niveau de la membrane de l'arachnoïde. Pour finir, les cellules épithéliales des plexus choroïdes forment une barrière sang-LCR.

1.1 Les barrières sang-LCR arachnoïdienne et des plexus choroïdes.

La barrière arachnoïdienne est l'une des trois couches constituant les méninges cérébrales, l'arachnoïde. Localisée entre la dure-mère et la pie-mère, autres couches méningées, la barrière arachnoïdienne sépare la dure-mère où est présent un réseau de vaisseaux lymphatiques (Louveau et al., 2015) et sanguins fenestrés (perméables), de l'espace sous-arachnoïdien rempli de LCR. C'est une barrière physique constituée de cellules épithéliales liées les unes aux autres par des jonctions serrées. Elle est imperméable aux fluides mais contrôle tout de même le passage de petites molécules par l'intermédiaire de protéines de transport exprimées à sa surface (Engelhardt et al., 2017).

Aussi constituée de cellules épithéliales, la barrière sang-LCR des plexus choroïdes régit la composition du LCR. Initialement responsables de la production de LCR, les plexus choroïdes peuvent être le lieu de passage de cellules immunitaires périphériques vers le LCR.

1.2 La barrière hémocéphalique et hémoméningée

La barrière hémocéphalique des capillaires et veinules du parenchyme et la barrière hémoméningée partagent de nombreuses caractéristiques (Fig. i1). Toutes deux sont constituées de cellules endothéliales spécialisées, de péricytes, d'astrocytes et de deux lames basales qui seront décrits en détail ici. La barrière hémoméningée se situe au niveau des vaisseaux leptoméningés de l'espace sous-arachnoïdien qui lui-même se trouve entre la dure-mère, l'arachnoïde et la pie-mère. Elle se distingue de la barrière hémocéphalique par la présence d'une barrière physique supplémentaire qu'est la pie-mère, constituée de cellules de type fibroblaste (Mastorakos & McGavern, 2019). Afin de mieux comprendre le fonctionnement de ces barrières, les cellules et lames basales qui les constituent seront décrites ici.

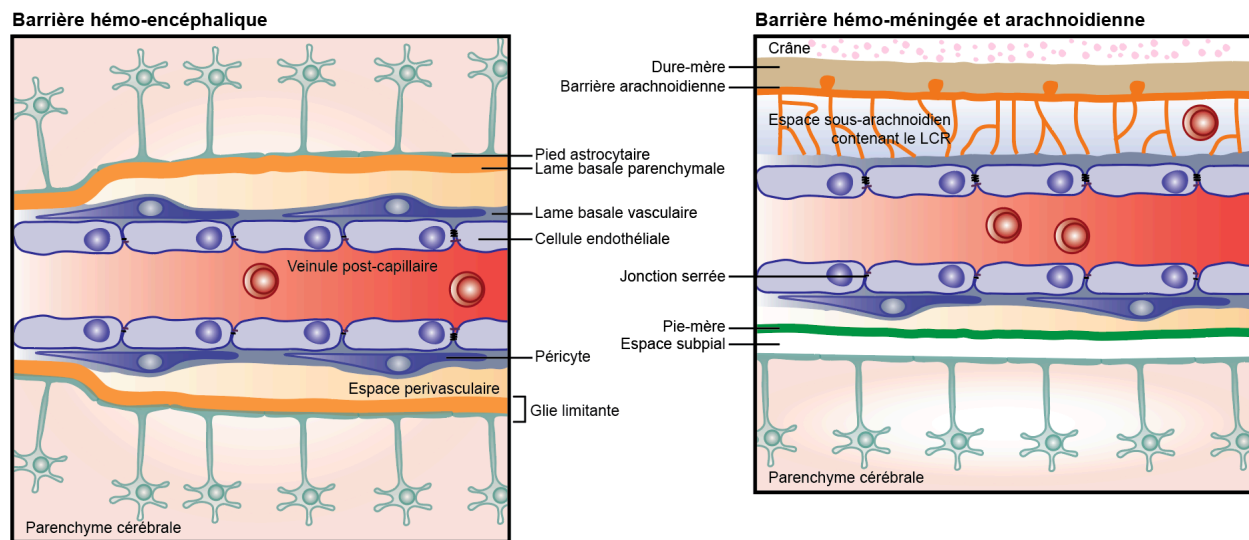


Fig. i1. Les barrières hémocéphalique et hémoméningée.

(A) La barrière hémocéphalique et (B) la barrière hémoméningée contrôlent le passage des cellules et solutés du système sanguin périphérique vers le parenchyme cérébral. Exposées à la lumière des vaisseaux, les cellules endothéliales sont les primes gardiennes de ces deux barrières. Elles sont soutenues par les péricytes, eux-mêmes intégrés dans la lame basale vasculaire. (A) La glie limitante englobe les microvaisseaux du SNC. Elle est constituée de la lame basale parenchymateuse et des pieds astrocytaires. Au niveau des capillaires parenchymateux, lames basales vasculaire et parenchymateuse sont étroitement liées alors qu'un espace périvasculaire les sépare au niveau des veinules post-capillaires. Les veinules post-capillaires sont le lieu préférentiel de migration des cellules immunitaires vers le SNC et celles-ci peuvent transiter par l'espace périvasculaire. (B) La barrière hémoméningée est spécifique par sa localisation et sa composition. Elle est constituée des mêmes acteurs cellulaires que la barrière hémocéphalique : cellules endothéliales spécialisées, cellules péricytes englobées dans la lame basale vasculaire et pieds astrocytaires constituant la glie limitante à la surface du parenchyme cérébral. La pie mère, couche intégrante des méninges, s'ajoute aux éléments constituant la barrière hémoméningée.

1.2.1 Les cellules endothéliales

Exposées à la lumière des vaisseaux, les cellules endothéliales sont les actrices principales dans la sélection des composés sanguins pouvant atteindre le parenchyme alors que les astrocytes et les péricytes sont des cellules de soutien et de sélection secondaire. Afin de créer une paroi vasculaire, les cellules endothéliales des capillaires non fenêtrés sont étroitement liées les unes aux autres par les jonctions adhérentes et les jonctions serrées spécialisées (Abbott et al., 2010). Les jonctions adhérentes, composées notamment de VE-cadhérine (de l'anglais : *Vascular endothelial cadherin*) et PECAM-1 (de l'anglais : *Platelet-endothelial cell adhesion molecule-1*) qui interagissent de façon homotypique, sont un élément structural indispensable à la formation des jonctions serrées. Celles-ci permettent de limiter drastiquement la transmigration paracellulaire des composés et des cellules circulantes (Brightman & Reese, 1969; Reese & Karnovsky, 1967; Westergaard & Brightman, 1973) à l'exception de certaines petites molécules lipidiques solubles (<500 Da) pouvant franchir la barrière par simple diffusion (Pardridge, 2017). Plusieurs molécules clés sont impliquées dans la structure des jonctions serrées. Parmi celles-ci sont Claudin-3, Claudin-5, Occludin, les molécules de la famille JAM (de l'anglais : *Junctional Adhesion Molecules*; JAM-A, -B et -C) ainsi que les protéines intracellulaires ZO-1, ZO-2 et ZO-3 (de l'anglais : *Zona Occludens*)(décrites dans Castro Dias et al., 2019). Les caractéristiques de perméabilité très restrictives résultant des jonctions serrées induisent une polarisation de la membrane des cellules endothéliales. On distingue la partie luminale exposée au flux sanguin de la partie abluminale du côté du parenchyme. Cette polarisation permet aussi une haute régulation de la migration transcellulaire et de la diffusion des composés solubles par l'expression de pompes et canaux transmembranaires. Bien que les cellules endothéliales qui constituent les barrières du SNC soient particulièrement fines (jusqu'à 0,25 micron), la migration transcellulaire des cellules y est très limitée en comparaison avec les cellules endothéliales d'autres tissus (Coomber & Stewart, 1985). Aussi, le nombre de vésicules de pinocytoses régissant le passage de micromolécules et de solutés à travers la cellule endothéliale y est sept fois moins élevé que pour les cellules endothéliales musculaires (Coomber & Stewart, 1985). L'ensemble des caractéristiques uniques et spécialisées des cellules endothéliales des vaisseaux cérébraux et méningés que sont l'absence de fenestration, la présence de jonctions adhérentes et serrées, une faible migration transcellulaire

et peu de vésicules de pinocytoses font du SNC un organe particulièrement isolé de la périphérie. L'infiltration de cellules immunitaires y est très limitée et c'est notamment une des raisons pour lesquelles le SNC est considéré comme « immuno-privilegié ».

1.2.2 Les lames basales

Deux lames basales de matrice extracellulaire agissent pour le maintien des barrières hémocéphalique et hémoméningée. La lame basale vasculaire est constituée de molécules sécrétées par les cellules endothéliales et les péricytes. Elle englobe les péricytes tout en étant en contact avec la face abluminale des cellules endothéliales. La lame basale parenchymateuse quant à elle, est située au niveau des pieds astrocytaires et est constituée essentiellement de molécules sécrétées par ces mêmes cellules. Ces deux lames basales sont séparées par un espace périvasculaire au niveau des veinules post-capillaires alors qu'elles sont en contact étroit au niveau des capillaires cérébraux. Leur composition est différente bien que toutes deux soient essentiellement composées de glycoprotéines, collagène IV, laminines et de fibronectines (Mastorakos & McGavern, 2019). Elles sont impliquées dans l'ancrage et le soutien structurel des cellules endothéliales, mais aussi dans la transduction du signal et l'adhérence d'autres cellules. Elles ont été montrées comme jouant un rôle dans le maintien de l'intégrité de la barrière notamment dans un contexte inflammatoire (Weiss et al., 2009).

1.2.3 Les péricytes

Les péricytes sont des cellules murales multifonctionnelles qui entourent les capillaires sanguins de l'organisme. Elles sont particulièrement connues pour leur présence en grand nombre dans le SNC et leur rôle important dans les barrières hémocéphalique et hémoméningée. Elles y constituent un soutien physique des cellules endothéliales et de leurs jonctions serrées. Ces cellules de l'espace périvasculaire sont incorporées dans la lame basale vasculaire et possèdent plusieurs points de contact avec les cellules endothéliales sur leur surface abluminale (Sims, 1986). Par leur communication avec les cellules endothéliales, elles sont actrices de la régulation du flux sanguin, de l'angiogenèse et de l'infiltration des cellules immunitaires (Bell et al., 2010;

Ben-Zvi et al., 2014; Daneman & Prat, 2015; Winkler et al., 2010). Leur rôle dans le SNC semble d'autant plus important qu'elles y sont plus nombreuses (haut ratio de péricyte/cellule endothéliale) que dans les autres tissus.

1.2.4 Les astrocytes

Les astrocytes sont des cellules gliales du SNC connues pour leur forme étoilée. C'est par la régulation du milieu extracellulaire cérébral que ces cellules assurent un rôle de soutien et facilitent la transmission de l'influx nerveux aux synapses. À la surface du parenchyme cérébral et autour des capillaires, les pieds astrocytaires forment la glie limitante. Cette dernière est une structure qui fait office de barrière en combinaison avec la lame basale parenchymateuse, elle-même produite par les astrocytes.

Englobant les vaisseaux sanguins du SNC, les astrocytes sont situés entre les neurones, les péricytes et les cellules endothéliales et elles sont impliquées dans la différenciation et le maintien de la barrière hémato-encéphalique (Zlokovic, 2008). Elles interagissent avec les cellules endothéliales par leurs pieds astrocytaires et sont capables de sécréter des facteurs solubles. C'est ainsi qu'elles sont déterminantes dans le développement des caractéristiques uniques des cellules endothéliales. En effet, la culture de cellules endothéliales en contact étroit avec les astrocytes ou leur milieu de culture, a permis de comprendre leur rôle primordial dans la formation des jonctions serrées (Janzer & Raff, 1987; Tao-Cheng et al., 1987) et dans l'induction d'une résistance transendothéliale élevée (Neuhaus et al., 1991).

1.3 La migration des cellules immunitaires à travers les barrières endothéliales du SNC

Bien qu'elles soient présentes dans le LCR dans un contexte sain, les cellules immunitaires périphériques sont rares dans le parenchyme cérébral. La migration des cellules immunitaires vers le SNC dans un contexte sain est donc un événement rare, faisant du SNC un organe immunoprivilégié. Dans un contexte neuroinflammatoire, le passage des leucocytes périphériques à travers les barrières du SNC est un mécanisme complexe et hautement régulé

(Ransohoff et al., 2003). Au niveau des vaisseaux leptoméningés et des vaisseaux post-capillaires parenchymateux, la migration des cellules se découpe en plusieurs étapes clés de sélection : l'adhérence, l'activation, l'arrêt, le rampement et la transmigration (Fig. i2). Elles sont décrites plus en détail ici :

(1) En premier lieu, pour ralentir et contrer le flux sanguin, la cellule immunitaire engage une première interaction faible et transitoire avec la surface vasculaire des cellules endothéliales. Ce premier contact défini comme étape d'**adhérence/capture** est médié par des sélectines (sélectines P et E) et leurs ligands (PSGL-1, CD44, ESL-1) (Lawrence & Springer, 1991).

(2) Rapidement, la cellule immunitaire ralentie reconnaît par ses récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) les chimiokines présentes à proximité de la zone luminale des cellules endothéliales (Alon & Shulman, 2011). L'accumulation de ses interactions moléculaires permet l'**activation** des cellules endothéliales notamment par des stimuli inflammatoires comme l'histamine ou des cytokines telles que l'interleukine (IL)-1 β et TNF- α (de l'anglais : *tumor necrosis factor- α*). L'activation des cellules endothéliales résulte de l'induction de la transcription de molécules chemoattractantes, de sélectines et de récepteurs aux intégrines, tous impliqués dans la migration des leucocytes (Nourshargh & Alon, 2014). L'un des acteurs clé dans l'activation des intégrines à la membrane des cellules endothéliales est talin. C'est une molécule intracellulaire qui permet d'induire, de façon dépendante aux chimiokines, des changements conformationnels des intégrines. Les chimiokines reconnues par les cellules entraînent ainsi un dépliement des intégrines allant jusqu'à 25 nm de la surface cellulaire (Alon & Shulman, 2011).

(3) Cette activation entraîne une adhérence plus ferme et l'**arrêt** de la cellule immunitaire sur les cellules endothéliales via le recrutement à la membrane des intégrines cytoplasmiques (ex. LFA-1/ $\alpha_L\beta_2$, Mac-1/ $\alpha_M\beta_2$, VLA-4/ $\alpha_4\beta_1$) et de leurs ligands endothéliaux, des molécules d'adhérence de la famille des immunoglobulines (ex. VCAM-1, ICAM-1). Ceci crée alors des changements morphologiques cellulaires par la modulation du cytosquelette d'actine, un regroupement local des intégrines et une augmentation de leur avidité et de leur affinité (Montresor et al., 2012).

(4) Suite à l'arrêt et malgré les forces du flux sanguin, la cellule immunitaire **rampe** sur la paroi endothéliale intravasculaire dans le sens contraire du flux. L'interaction de la cellule avec des

chimiokines et des molécules lipidiques chimioattractantes permet alors de la guider vers la zone qui sera favorable à sa diapédèse (Alon & Shulman, 2011).

(5) La cellule immunitaire **migre** ensuite de façon transcellulaire, à travers le corps cellulaire d'une cellule endothéliale ou de façon paracellulaire, au niveau d'une jonction serrée (Nourshargh & Alon, 2014). En contexte neuroinflammatoire, il a d'ailleurs été montré que c'est la migration transcellulaire qui est favorisée dans le SNC étant donnée la nature exceptionnelle des jonctions serrées (Lossinsky et al., 1991; Wolburg et al., 2005).

(6) Enfin, le franchissement de la lame basale vasculaire englobant les péricytes est un obstacle de plus dans la sélection de la cellule atteignant finalement le LCR, l'espace périvasculaire ou le parenchyme cérébral. Les péricytes expriment selon les circonstances, des molécules d'adhérences (ex. ICAM-1, VCAM-1), des chimiokines (ex. CXCL1, CXCL8) et des récepteurs de molécules pro-inflammatoires (ex. TNFR1, TNFR2, IL-1R, TLRs) (Pober & Tellides, 2012; Stark et al., 2013; Voisin & Nourshargh, 2013). Elles agissent grâce à des interactions directes cellule-cellule ou à la sécrétion de cytokines et jouent alors un rôle dans la mobilité et la transmigration de la cellule immunitaire vers le LCR et le parenchyme cérébral.

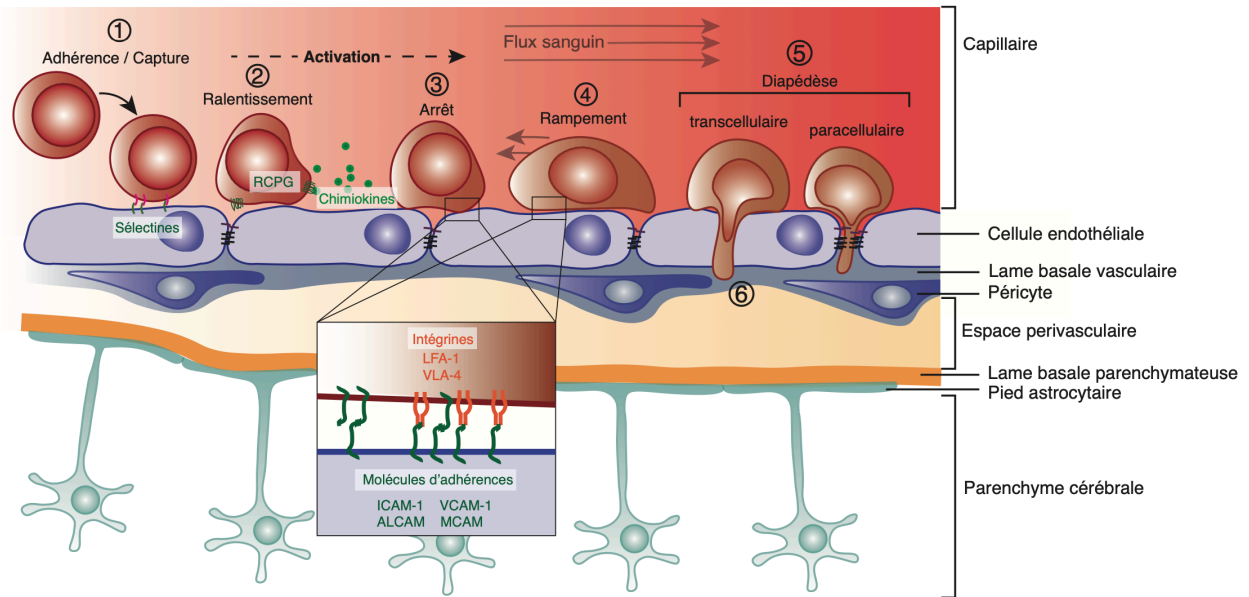


Fig. i2. Les étapes de la migration des leucocytes à travers les barrières endothéliales du SNC.

Le passage des leucocytes à travers la barrière héméo-encéphalique et héméo-méningée se découpe en cinq étapes principales décrites ici. Ces étapes étant identiques dans les deux contextes, elles sont schématisées dans le cadre des vaisseaux post-capillaires cérébraux, mais s'appliquent aussi au contexte des veinules leptoméningées. (1) La première étape de capture de la cellule immunitaire dans le flux sanguin est médiée par l'interaction des sélectines endothéliales et de leurs ligands. Ensuite, la cellule immunitaire rentre dans une phase d'activation à la suite de l'interaction des RCPG et des récepteurs de cytokines avec leurs ligands solubles, menant au (2) ralentissement et (3) à l'arrêt de la cellule sur la paroi luminale des cellules endothéliales. Ensuite, la cellule immunitaire (4) rampe préférentiellement dans le sens inverse au flux sanguin pour atteindre la zone de (5) diapédèse qui lui sera favorable. Celle-ci peut s'effectuer de façon transcellulaire ou paracellulaire entre deux cellules endothéliales. En dernier, (6) la cellule passe à travers la lame basale vasculaire pour atteindre l'espace périvasculaire.

1.4 Les barrières du SNC dans le cadre de la maladie.

Les barrières sang-parenchyme et sang-LCR peuvent être sujettes à des perturbations importantes dans le cadre de pathologies. Lorsque la barrière ou les cellules qui la composent sont dérégulées, les changements physiologiques peuvent s'accumuler. En effet, dans certaines pathologies, on fait face à des changements de perméabilité et de flux sanguins, ainsi que des défauts d'approvisionnement du SNC ou de clairance des déchets toxiques s'accumulant dans le parenchyme. Ultimement, ces perturbations peuvent mener à la modification du milieu extracellulaire intraparenchymateux et la perturbation de la transmission du message nerveux. Parmi les nombreuses maladies ayant des manifestations au niveau des barrières du SNC, quelques-unes seront décrites ici, de manière non exhaustive.

Parmi ces pathologies, **l'accident vasculaire cérébral (AVC)** est typiquement accompagné d'une perturbation de la barrière hémocéphalique. Dans les heures suivant l'AVC, la perte d'intégrité et l'augmentation de la perméabilité de la barrière apparaissent et sont considérées comme des événements aggravants dans le développement de l'œdème cérébral, des dommages tissulaires et de la neuroinflammation (Yang & Rosenberg, 2011).

La perturbation de la barrière hémocéphalique est aussi associée au développement de **la maladie d'Alzheimer** (Yamazaki & Kanekiyo, 2017). Dans un modèle de souris pour cette maladie, il a été décrit que la perturbation de la barrière et l'augmentation de sa perméabilité sont des événements précoces, présents même avant l'apparition de dépôts d'amyloïde β et d'autres caractéristiques pathophysiologiques typiques de la maladie (Ujii et al., 2003). Ces résultats furent corroborés chez les personnes atteintes de la maladie d'Alzheimer dans des stades précoces (van de Haar et al., 2017). Un autre élément important semble être le rôle joué par la barrière dans la clairance de l'amyloïde β , qui semble alors non fonctionnelle (de Oliveira et al., 2021). Cela souligne le rôle crucial de clairance des déchets que jouent les barrières du SNC.

Ancré dans l'actualité, l'implication de la barrière hémocéphalique fut grandement étudiée dans l'apparition de symptômes neurologiques chez les patients atteints de la maladie à coronavirus 2019 (**COVID-19**). Maladie infectieuse due au virus SARS-CoV-2, elle entraîne des atteintes neurologiques où l'hypothèse actuelle suggère que SARS-CoV-2 présente une haute

affinité pour un récepteur (ACE2) le menant à son interaction avec la barrière hémato-encéphalique au niveau des capillaires cérébraux, y provoquant des dommages (Baig et al., 2020; Wierzbicka-Bobrowicz et al., 2021).

L'une des maladies dans le cadre desquelles les barrières du SNC sont hautement étudiées est la **SEP**. Cette maladie neuroinflammatoire dont les causes sont encore floues, implique une augmentation de la perméabilité des barrières hémato-encéphalique et hémato-méningée accompagnée de l'infiltration de cellules immunitaires autoréactives à l'origine de lésions cérébrales. De nombreuses études ont montré que les cellules immunitaires pathogéniques migrent à travers les barrières hémato-encéphalique, hémato-méningée et des plexus choroïdes (Engelhardt & Ransohoff, 2005, 2012; Ransohoff et al., 2003). Favorisant la migration des cellules vers le parenchyme cérébral, les molécules d'adhérences telles que ICAM-1 (de l'anglais : *intercellular adhesion molecule-1*), VCAM-1, ALCAM (de l'anglais : *activated leukocyte cell adhesion molecule*) ou MCAM (de l'anglais : *melanoma cell adhesion molecule*) sont surexprimées par les cellules endothéliales dans un contexte neuroinflammatoire. Ainsi, les interactions médiées par les molécules d'adhérences (ex. LFA-1/ICAM-1, VLA-4/VCAM-1, ALCAM/ALCAM) entre cellules immunitaires et cellules endothéliales jouent un rôle important dans la formation des lésions de SEP. Étant l'objet de cette thèse, la physiopathologie de la SEP sera discutée plus en détail dans le paragraphe assigné à ce sujet.

2. La sclérose en plaques

La SEP est une maladie inflammatoire, chronique, démyélinisante, neurodégénérative du SNC. C'est la maladie neurologique handicapante chronique la plus répandue chez les jeunes adultes. Mais encore aujourd'hui, aucun traitement curatif n'existe. De nombreuses thérapies modificatrices de la maladie sont cependant apparues dans les 30 dernières années, permettant de réduire la fréquence et la sévérité des poussées démyélinisantes et ainsi ralentir l'apparition de handicap chez les patients atteints. La SEP est un sujet de recherche complexe par la diversité de présentations cliniques chez les patients ainsi que pour son aspect auto-immun, inflammatoire, et multifocal.

2.1 Historique

À ce jour, le premier cas soupçonné de SEP décrit dans la littérature est celui de la Néerlandaise Lidwina of Schiedam (1380-1433) et remonte au XIV^e siècle (Medaer, 1979). La documentation écrite au sujet de sa condition fut en 1979 réexaminée par R Medaer. À sa grande surprise, les descriptions figurant dans les documentations concernant les symptômes de Lidwina correspondaient aux critères cliniques qui menaient vers un diagnostic de SEP : parésie du bras droit, douleurs sporadiques, cécité partielle, hypersensibilité à la lumière d'un œil, difficultés à marcher croissantes, récupération partielle, etc. Elle est donc aujourd'hui souvent considérée comme le plus ancien cas de SEP documenté. Il faudra cependant attendre le XIX^e siècle pour qu'une description clinique précise et qu'un lien entre anatomopathologie et symptômes cliniques soient effectués par Cruveilhier, Carswell, Charcot et Vulpian. C'est alors à ce moment-ci que l'étymologie clinique de « Sclérose en Plaques » fut adoptée.

Ce n'est qu'en 1935, 5 siècles après le premier cas de SEP connu, que Russel Brain écrit une revue spécifiant le rôle central de l'infiltration périvasculaire lymphocytaire dans le développement des lésions, l'auto-immunité, la réaction astrogliale, la dégradation de la myéline par phagocytose et la perte axonale (Brain, 1935). Le système immunitaire étant dorénavant l'acteur principal de la SEP, sont développés des traitements immunosuppresseurs et immunomodulateurs dont les premières prescriptions datent des années 90.

Aujourd'hui, l'avancement des connaissances et des outils n'a pas encore résolu toutes les inconnues liées à la SEP. Illustrant cette méconnaissance, le diagnostic de SEP s'effectue à l'exclusion du diagnostic d'autres maladies, par la combinaison d'observations cliniques, à l'IRM, et dans la composition du LCR. Bien que l'avancement dans les traitements de la SEP fût immense dans les 30 dernières années, nous échouons encore à traiter efficacement et sans effet secondaire la SEP, de même que nous en ignorons encore aujourd'hui sa/ses cause(s).

2.2 Épidémiologie

Les personnes de sexe féminin sont deux fois plus à risque de développer la SEP par rapport aux personnes de sexe masculin. Les dernières analyses épidémiologiques soulignent même que le ratio de sexe femme/homme s'élève jusqu'à 4:1 dans certains pays (Walton et al., 2020). Les personnes de sexe féminin ont tendance à développer la SEP plus tôt dans leur vie alors que les personnes de sexe masculin, bien que moins susceptibles de développer la SEP, accumulent plus rapidement des handicaps et possèdent de moins bon pronostics (Confavreux et al., 2003).

Les premières manifestations de la maladie peuvent avoir lieu dès l'enfance ou l'adolescence, mais de manière générale, le diagnostic se fait chez les jeunes de 20 à 40 ans. En 2020, on estime à 2,8 millions le nombre de personnes atteintes de SEP à travers le monde (35,9 pour 100 000 personnes) (Walton et al., 2020). Une personne est diagnostiquée avec la SEP toutes les 5 minutes. Mais, sa prévalence varie selon les régions du monde. Elle touche essentiellement les descendant.e.s de personnes européennes (> 140 pour 100 000 personnes), là où les personnes asiatiques et autochtones sont plus rarement touchées (Walton et al., 2020). Sa répartition géographique hétérogène semble être le résultat d'un changement de latitude. En effet, la prévalence et l'incidence de la maladie sont corrélées positivement avec des latitudes plus hautes (Koch-Henriksen & Sorensen, 2010). Associé à la latitude, un faible niveau de vitamine D découlant d'une faible exposition au soleil est un facteur de risque environnemental hautement suspecté par la communauté scientifique.

Parmi les autres facteurs de risques environnementaux et de manière non exhaustive, l'obésité à l'adolescence, l'exposition active ou passive à la fumée du tabac, le travail de nuit, une forte consommation de café ou d'alcool, une faible exposition au soleil sont tous associés à un risque plus élevé de développer la SEP (discuté dans Filippi et al., 2018). Depuis longtemps soupçonnée, une étude récente a révélé que l'infection au virus Epstein-Barr est une condition quasi obligatoire pour développer la SEP (Bjornevik et al., 2022). Autres facteurs de risques, plus de 200 variants génétiques ont été identifiés (Baranzini & Oksenberg, 2017; International Multiple Sclerosis Genetics et al., 2013). La majorité des polymorphismes identifiés touchent les régions régulatrices de gènes impliqués dans l'immunité. Parmi eux, des polymorphismes pour des gènes HLA (de l'anglais : *human leukocyte antigen*) de classe I et II, IL2RA, IL7RA, CLEC16A, IRF8

(International Multiple Sclerosis Genetics et al., 2007). Objets de cette thèse, certains variants des gènes codants pour la protéine d'adhérence ALCAM et de son ligand CD6 sont des facteurs génétiques associés avec un plus haut risque de développement et de progression de SEP (Wagner et al., 2014; Wagner et al., 2013). CD6 est une protéine co-stimulatrice impliquée dans la formation de la synapse immunologique entre lymphocytes et cellules présentatrices d'antigène (Patel et al., 1995; Zimmerman et al., 2006). ALCAM quant à elle, est impliquée dans le contact cellule-cellule. Elle est introduite plus amplement dans le chapitre qui lui est dédié plus loin dans cette introduction.

2.3 Physiopathologie

2.3.1 *Les formes de SEP*

La SEP est une maladie avec une grande hétérogénéité clinique. Elle se manifeste sous plusieurs formes. La plus courante nommée forme **poussée-rémission** ou **cyclique** se manifeste sous forme de poussées, périodes de plusieurs jours ou semaines durant laquelle la personne présente des déficits neurologiques. Cette période de poussée est suivie par une rémission pouvant être totale ou partielle (Fig. i3). Avec le temps, les personnes atteintes peuvent garder des séquelles au long terme, voire subir une augmentation progressive des symptômes dans le temps, connue sous le nom de forme **secondaire progressive**. Plus rarement, la SEP peut se manifester sous la forme **primaire progressive**, impliquant, comme son nom l'indique, une aggravation progressive des déficits dès le début de la maladie.

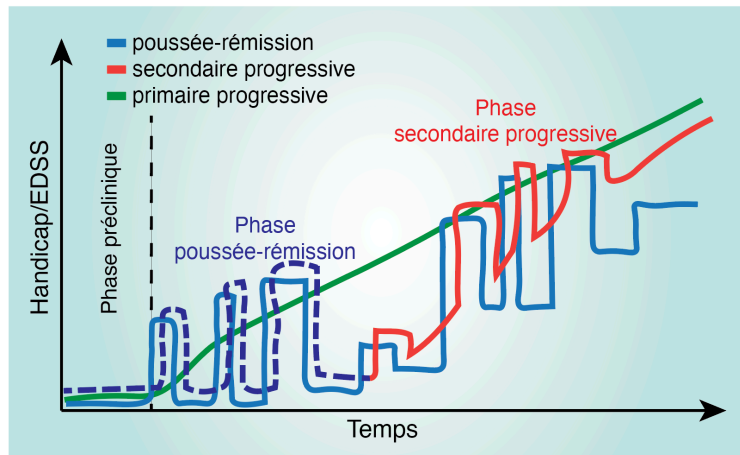


Fig. i3. Les formes de SEP

La SEP peut se présenter sous plusieurs formes. Selon les patients, elle commence par une phase de poussée-rémission (en bleu) caractérisée par l'apparition des symptômes sur une courte durée suivie d'un retour à la normale parfois partiel. Dans certains cas, la maladie évolue dans une phase de progression secondaire (en rouge) des symptômes de façon continue. Enfin, certaines personnes atteintes de SEP accumulent continuellement dès le début de la maladie des symptômes et cette forme de la maladie est alors dénommée primaire progressive (en vert).

2.3.2 Symptômes

Le début de la SEP est souvent caractérisé par un premier épisode de démyélinisation nommé syndrome clinique isolé, touchant souvent le nerf optique (névrite optique), la moelle épinière (myélite) ou le tronc cérébral. À ce stade, des manifestations corticales sont possibles, mais moins courantes. Pour environ 25 % des patients, la névrite optique est le premier épisode symptomatique (Optic Neuritis Study, 2008). La démyélinisation du nerf optique entraîne une cécité totale ou partielle d'un œil, une vision des couleurs altérée (dyschromatopsie), une tache noire au milieu de champ visuel (scotome) et des douleurs orbitales. Par la suite, les manifestations peuvent être diverses selon la localisation et l'ampleur des lésions. En voici quelques exemples : perte de sensibilité, sensibilité à la chaleur, vision double (diplopie), faiblesse des membres, fatigue, ataxie, vertiges. Les manifestations cliniques de la SEP sont multiples et peuvent être similaires à d'autres maladies comme la neuromyérite optique et c'est notamment une des raisons pour lesquelles le diagnostic de SEP est difficile.

2.3.3 Lésions

Les lésions démyélinisantes dont découle le nom de « sclérose en plaques », sont la signature pathologique de la maladie. Ce sont des zones focales de démyélinisation souvent situées autour des vaisseaux post-capillaires du SNC. Elles sont caractérisées par une déstabilisation de la barrière hémato-encéphalique et l'infiltration à travers celle-ci de cellules immunitaires considérées auto-immunes, qui favoriseront l'inflammation, la démyélinisation, la gliose astrocytaire et la dégénérescence axonale (Skulina et al., 2004; Stern et al., 2014; Zlokovic, 2008). Grâce aux études histologiques, on a possibilité de caractériser les lésions en fonction des différentes étapes de leur formation (Kuhlmann et al., 2017).

En premier lieu, des leucocytes activés parmi lesquels les lymphocytes B, T et les macrophages sont retrouvés dans les **infiltrats périvasculaires** et méningés (Hayashi et al., 1988; Machado-Santos et al., 2018; Pikor et al., 2015; van Nierop et al., 2017). Ensuite, avec l'inflammation, les cellules immunitaires pénètrent le parenchyme cérébral. C'est à ce stade que la démyélinisation médiée par les leucocytes se produit (**lésion active**) et les microglies et macrophages phagocytent

les produits de dégradation de la myéline (Kuhlmann et al., 2017). Ceci est accompagné d'une perte axonale des neurones, de la mort cellulaire d'oligodendrocytes et d'une gliose astrocytaire. Suivant la démyélinisation, les leucocytes quittent la zone endommagée (**lésion chronique inactive**) ou continuent d'envahir et d'agir en bordure des lésions (**lésions chroniques actives** ou **mix active/inactive**). Dans certains cas, la **remyélinisation** de la zone affectée est observée (Lubetzki et al., 2020; Schultz et al., 2017).

En parallèle, il fut décrit que chez les patients atteints de SEP, plus particulièrement avec une forme progressive, les leucocytes peuvent se retrouver au sein **d'infiltrats méningés** sous-arachnoïdiens. Leur présence est corrélée avec la présence de lésions corticales et de perte neuronale (Ahmed et al., 2022; Church et al., 2021; Howell et al., 2011; Lucchinetti et al., 2011; Magliozzi et al., 2007; Magliozzi et al., 2010; Reali et al., 2020; Serafini et al., 2004). Dans certains cas, ces infiltrats cellulaires se structurent comme des « organes lymphoïdes tertiaires » (ou organes lymphoïdes ectopiques) et c'est la terminaison qui est couramment utilisée pour les dénommer. Mais au-delà de leur structure, ces infiltrats cellulaires méningés n'ont pas été montrés comme incarnant toutes les caractéristiques typiques des organes lymphoïdes tertiaires. C'est pour cette raison que cette terminologie est sujet de débat dans la communauté scientifique et que certains préfèrent les nommer des structures de type lymphoïdes. D'un point de vue fonctionnel, ce sont des structures où se produisent des échanges et des interactions entre les différents acteurs leucocytaires de la SEP. On y retrouve des cellules réticulaires participant à leur structure, des cellules dendritiques folliculaires et des lymphocytes B capables de présentation d'antigène, ainsi que des lymphocytes T, des plasmocytes et des monocytes/macrophages (discuté dans Pikor et al., 2015). Aussi, les lymphocytes T peuvent y interagir avec des cellules présentatrices d'antigène (Kivisakk et al., 2009). La composition cellulaire de ces organes et leur proximité avec les lésions corticales en font des éléments d'un grand intérêt scientifique dans la compréhension de la SEP. On soupçonne qu'ils jouent un rôle dans la propagation de l'inflammation et des dommages cérébraux chez les patients atteints de SEP progressives.

2.3.4 Diagnostic

La SEP est une maladie dont les manifestations cliniques varient d'une personne à l'autre. Ceci rend son diagnostic difficile. Tout d'abord, le diagnostic de SEP est un diagnostic d'exclusion, c.-à-d. que les autres maladies aux manifestations cliniques similaires doivent être exclues afin de pouvoir retenir le diagnostic de SEP. Ceci nécessite dans certains cas des examens cliniques complémentaires. Le diagnostic de la SEP repose sur la présence d'attaque clinique compatible avec un épisode de démyélinisation et la mise en évidence de la dissémination de la maladie dans le temps et dans l'espace basée sur la clinique et les tests paracliniques (Thompson et al., 2018). L'IRM, développée à la fin du XXe siècle, est un outil performant pour la détection des lésions démyélinisantes chez les patients. Aussi, l'analyse du LCR peut contribuer au diagnostic de SEP grâce à la détection de bandes oligoclonales (Thompson et al., 2018). Elle confirme notamment la nature inflammatoire de la maladie et sa dissémination dans le temps. Les critères actuels de diagnostic sont les critères de Mc Donald 2017 (Thompson et al., 2018). Depuis leur publication originale il y a 20 ans, ces critères furent révisés à trois reprises tant l'évolution de la compréhension de la SEP et des outils de diagnostic est grande (McDonald et al., 2001; Polman et al., 2011; Polman et al., 2005; Thompson et al., 2018).

Afin d'effectuer une mesure des atteintes liées à la maladie de façon standardisée, le score clinique EDSS (de l'anglais : *extended disability status score*) est utilisé (Kurtzke, 1983). Ce score est basé sur la sévérité des déficits dans plusieurs sphères neurologiques telles que la vision, le contrôle moteur et le contrôle sphinctérien. Ce système de score entre 0 (examen neurologique normal) et 10 (mort due à la maladie) permet de suivre l'évolution clinique de la maladie dans le temps et il est souvent utilisé dans le cadre d'essais cliniques. Autre mesure, le nombre de poussées par année donne de l'information sur l'activité de la maladie.

Chaque sous-type de SEP peut être catégorisé comme active ou inactive selon des critères cliniques (ex. fréquence des poussées, augmentation de l'invalidité/du handicap décrit par la mesure de l'EDSS) ou l'apparition de lésions observées par IRM avec gadolinium pour caractériser l'inflammation de la lésion ou sur une mesure T2-densité de proton. Lorsqu'une personne est atteinte de la forme cyclique de la SEP, elle peut être dans une phase inactive qu'on décrit comme suit : « aucun indice d'activité de la maladie » (NEDA, de l'anglais : *no evidence of disease activity*).

Ceci réfère à la non-progression du score clinique EDSS, l'absence de nouvelles poussées, l'absence de signe d'activité à l'IRM et l'absence d'accumulation de la chaîne légère de neurofilament dans le LCR sur une certaine période.

2.4 Les traitements

L'amélioration des connaissances physiopathologiques et le développement d'outils tels que l'IRM ont permis le développement de nombreux traitements pour la SEP. La première catégorie de traitements disponibles est à visée symptomatique, et permet de réduire à court terme certains symptômes provoqués par les lésions. Ce sont souvent des médications non spécifiques à la SEP, traitant notamment la douleur, les difficultés à dormir, à marcher, la fatigue et la spasticité. Bien que ce ne soit pas des solutions sur le long terme, ces traitements sont un élément important dans l'amélioration de la qualité de vie des personnes atteintes de SEP.

La seconde catégorie sont les traitements à plus longue portée. Ils modifient le cours de la maladie par leur action sur l'inflammation via diverses fonctions du système immunitaire. Ce sont les thérapies modificatrices de la maladie. Même si aucun d'entre eux ne permet une guérison, ils permettent une réduction de l'activité de la maladie et éventuellement un retardement de sa progression. Plusieurs sous-catégories existent, les traitements de première ligne assurant un faible risque d'effets secondaires, mais une efficacité clinique plus modérée; et les traitements de seconde et troisième ligne, dont l'efficacité est plus grande, mais ayant un profil d'effet secondaire plus important.

Les traitements immunomodulateurs comme l'interféron bêta, l'acétate de glatimère et le teriflunomide sont des traitements de première ligne. Ils sont de premier recourt car sont associés à de faibles probabilités d'effets secondaires sévères, mais leur efficacité clinique reste modérée. Ayant un autre mode d'action, les traitements immunosuppresseurs et immunomodulateurs majoritairement développés et approuvés dans les 20 dernières années présentent une meilleure efficacité dans le traitement de la SEP (Hauser & Cree, 2020). Il en existe de seconde et de troisième ligne. La sélection des cas de SEP pouvant recevoir ces traitements est alors liée aux

résultats des analyses risque-bénéfice de ces médicaments. De façon non exhaustive, certains de ces traitements de seconde et troisième ligne seront décrits ici.

2.4.1 Les traitements modificateurs de la maladie pour la forme poussée-rémission

Le **fumarate de diméthyle** est un traitement avec prise orale qui, pris deux fois par jour, réduit la fréquence des poussées et la progression du score EDSS des personnes traitées (Fox et al., 2012; Gold et al., 2012). Ses effets sont aujourd'hui attribués à la fois à des qualités neuroprotectrices et des effets immunomodulateurs. Le fumarate de diméthyle change la composition et le phénotype des cellules immunitaires ainsi que l'infiltration des cellules vers le SNC (revue dans Yadav et al., 2019). Il réduit le nombre de lymphocytes B CD19⁺ et T CD4⁺ et CD8⁺ dans le sang périphérique sans affecter les autres populations de cellules immunitaires (Spencer et al., 2015). Notamment, les lymphocytes T auxiliaires T_H17 (de l'anglais : *T_{Helper}*) considérés comme cellules effectrices pathogéniques dans la SEP (Kebir et al., 2009; Kebir et al., 2007), sont diminuées à la suite du traitement au fumarate de diméthyle (Montes Diaz et al., 2018; Wu et al., 2017). De plus, il a été montré que le fumarate de monométhyle, métabolite du diméthyle de fumarate, réduit le potentiel migratoire des lymphocytes T *in vitro* (Dehmel et al., 2014), suggérant le rôle éventuel de cette thérapie dans la réduction de l'infiltration immunitaire vers le SNC.

Le **fingolimod** , agissant comme agoniste inverse des récepteurs au sphingosine 1-phosphate, est une thérapie qui semble avoir comme principal mécanisme d'action le blocage des lymphocytes dans les ganglions lymphatiques (Cohen & Chun, 2011). Son administration empêche alors les lymphocytes pathogéniques d'atteindre le SNC et réduit le nombre de poussées démyélinisantes, l'activité lésionnelle observée à l'IRM et la progression des handicaps (Kappos et al., 2006; Kappos et al., 2010). Le fingolimod cible essentiellement les lymphocytes B et de façon encore plus marqué, les lymphocytes T. Dans cette population, les lymphocytes T CD4⁺ sont plus affectés que les lymphocytes T CD8⁺, et tout particulièrement les lymphocytes T CD4⁺ producteurs d'IL-17 (lymphocytes T_H17) (Bohler et al., 2004; Mehling et al., 2010).

Le **natalizumab** fut le premier anticorps monoclonal à être approuvé en 2004 pour traiter la SEP cyclique. Traitement d'une haute efficacité, c'est un anticorps humanisé dirigé contre la chaîne

$\alpha 4$ (CD49d) de la molécule VLA-4. Son administration chez les personnes atteintes de SEP cyclique permet une diminution du nombre de poussées annuelles et de l'activité lésionnelle à l'IRM (Polman et al., 2006; Rudick et al., 2006). Cette avancée significative dans les traitements pour la SEP, nous la devons notamment aux travaux de Yednock et al. sur un modèle animal de SEP. Leurs travaux ont montré l'effet bénéfique d'anticorps dirigés contre VLA-4 ($\alpha 4\beta 1$) pour réduire l'accumulation de leucocytes dans le SNC et la réduction de la sévérité de la maladie chez ces animaux (Yednock et al., 1992). Aujourd'hui, nous savons que chez les personnes traitées avec le natalizumab, on observe une réduction du nombre de lymphocytes infiltrant le LCR, plus particulièrement les lymphocytes T CD4⁺ et lymphocytes B (Villar et al., 2012; Warnke et al., 2015). Les lymphocytes B sont les cellules les plus altérées. Leur proportion est augmentée en périphérie et elles tendent vers un phénotype mémoire et pro-inflammatoire (Traub et al., 2019). Plus récemment, une étude a montré que le traitement au natalizumab, bien qu'efficace, ne permet pas de bloquer complètement l'infiltration des lymphocytes T et B vers le parenchyme cérébral des patients atteints de SEP (Hausler et al., 2021).

L'**ocrelizumab** est un anticorps recombinant monoclonal dirigé contre la molécule CD20 exprimée par les lymphocytes B. Ce traitement entraîne une déplétion rapide des lymphocytes B chez les personnes traitées. À la surprise de la communauté scientifique, son efficacité dans le traitement de la SEP cyclique et primaire progressive fut démontrée (Hauser et al., 2017; Montalban et al., 2017). Premier traitement approuvé pour la forme primaire progressive, son administration est associée à une diminution de la progression clinique et à l'IRM chez les personnes atteintes (Montalban et al., 2017). L'efficacité de la déplétion des cellules CD20⁺ est telle que plusieurs anticorps monoclonaux anti-CD20 furent développés pour le traitement de la SEP (ex. le **rituximab** et l'**ofatumumab**).

Deux thérapies de troisième ligne, l'**alemtuzumab** et la **cladribine** permettent, suite à leur administration et la déplétion des lymphocytes, de reconstituer l'immunité des patients traités. Le cladribine est le 2-chlorodeoxyadenosine triphosphate et l'alemtuzumab, un anticorps recombinant monoclonal dirigé contre CD52, molécule exprimée par les lymphocytes matures.

Les essais cliniques ont montré l'efficacité à long terme de ces deux traitements dans la réduction de la fréquence des poussées et la stabilisation de la maladie (Cohen et al., 2012; Coles et al., 2012; Giovannoni et al., 2010; Giovannoni et al., 2021; Giovannoni et al., 2011; Tuohy et al., 2015). Étant donné l'effet déplétant de ces thérapies, les effets secondaires y étant associés peuvent être particulièrement sévères (ex. infections, neutropénie sévère, neurotoxicité, thrombocytopénie).

2.4.2 Les traitements modificateurs de la maladie pour les formes progressives de SEP

La majorité des traitements aujourd'hui disponibles sont administrés à des personnes avec un diagnostic initial de SEP cyclique. Les formes progressives furent, elles, longtemps considérées comme impliquant moins de phénomènes inflammatoires, mais plutôt résultant d'une dégénérescence neuronale secondaire aux événements inflammatoires. C'est ce qui expliquerait une réponse moins bonne aux thérapies immunomodulatrices et immunosuppressives développées dans les 30 dernières années.

Plus récemment, et à l'encontre de cette hypothèse, deux traitements immunomodulateurs furent approuvés pour le traitement des formes progressives. L'**ocrelizumab** (anticorps monoclonal anti-CD20) et le **siponimod** (nouvelle génération de régulateur spécifique des récepteurs sphingosine-1-phosphate) ont été approuvés pour le traitement des formes primaire et secondaire progressives respectivement. Il semblerait donc que le système immunitaire joue encore un rôle dans la phase progressive de la maladie, mais ces mécanismes sont encore peu compris.

2.4.3 Effets secondaires graves

L'administration des thérapies modificatrices de la maladie peut entraîner des effets secondaires parfois fatals. Leurs effets immunomodulateurs, voire immunosuppresseurs, entraînent une susceptibilité des patients traités à développer des infections des voies respiratoires, des voies urinaires ou du SNC.

En effet, certains d'entre eux comme le natalizumab peuvent entraîner des infections virales au sein du SNC. Parmi celles-ci, la leucoencéphalopathie multifocale progressive (LMP) est une maladie démyélinisante du SNC provoquée par le virus John Cunningham (JC). C'est un virus déjà présent chez une grande proportion de la population, mais dans certains cas, le virus JC est réactivé et devient neurotrope. C'est un phénomène principalement observé chez les personnes immunodéficientes ou immunodéprimées, faisant des personnes traitées avec des thérapies immunosuppressives, des personnes particulièrement à risque (Sriwastava et al., 2021). Ainsi, la LMP est un effet secondaire grave décrit chez les personnes traitées avec le natalizumab (Berger & Koralnik, 2005; Kleinschmidt-DeMasters & Tyler, 2005; Linda et al., 2009), le fumarate de diméthyle (Motte et al., 2018), le fingolimod (Berger et al., 2018), l'alemtuzumab (Gerevini et al., 2019), les anti-CD20 (Sul et al., 2020), tous connus comme réduisant l'immunosurveillance dans le SNC, lieu de réactivation du virus JC. Dans le cadre de traitement au natalizumab, le taux d'incidence de la LMP s'élève à 2 patients traités sur 1000 (Bloomgren et al., 2012; Vukusic et al., 2020). Étant une maladie démyélinisante, elle aggrave le pronostic neurologique. Dans le cas des patients traités au natalizumab, 85,5 % ont une augmentation de leur EDSS de plus de 1 des suites de la LMP, et ce, malgré les tentatives de traitements de celle-ci (Sriwastava et al., 2021). En bref, lorsqu'un patient SEP est diagnostiqué avec une LMP et qu'il n'en décède pas, il existe de hautes probabilités qu'il en revienne avec plus de déficits neurologiques qu'il n'avait précédemment.

2.5 L'encéphalite auto-immune expérimentale comme modèle animal de la SEP

L'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE) est le modèle animal le plus répandu dans la recherche sur la SEP. Cette expérimentation fut historiquement pratiquée chez diverses espèces animales allant des primates non humains jusqu'aux rongeurs, la souris étant de loin, l'animal le plus souvent utilisé dans la littérature scientifique des 10 dernières années.

L'EAE est une inflammation du SNC générée par l'induction d'une réaction immunitaire contre des antigènes du soi du SNC. L'inflammation et la démyélinisation chez l'animal provoquent une paralysie ascendante depuis la queue jusqu'aux pattes antérieures, accompagnée dans certains modèles d'une ataxie. Une grande variété d'EAE existe, permettant la modélisation chez l'animal

de différents aspects de la maladie de la SEP chez l'humain. En effet, la forme de la pathologie peut varier selon la souche animale, le sexe et la méthode d'induction utilisée. Ici, nous présenterons trois grandes méthodes d'induction de l'EAE chez la souris : active, passive et spontanée.

2.5.1 L'EAE active

L'EAE dite active est induite par immunisation de l'animal via l'injection sous-cutanée de peptides encéphalitogènes. Les protéines constitutives de la myéline sont souvent utilisées, parmi lesquelles sont la protéine protéolipide (PLP) de la myéline, la protéine basique de la myéline (MBP) ou la glycoprotéine oligodendrocyte de la myéline (MOG). Le peptide de MOG₃₅₋₅₅ est aujourd'hui le plus répandu pour induire une EAE monophasique avec des atteintes chroniques (Mendel et al., 1995). Le peptide protéique est injecté dans une émulsion avec l'adjuvant de Freund et *Mycobacterium tuberculosis* afin qu'une réaction inflammatoire soit causée (Mills, 2011). Souvent, la toxine pertussis qui compromet l'intégrité de la barrière, est aussi administrée à l'animal en intrapéritonéale afin de favoriser le développement de l'EAE (Linthicum et al., 1982).

L'EAE active est généralement causée par l'activation de lymphocytes T suite à la présentation du peptide encéphalitogène par les cellules présentatrices d'antigène. Le plus couramment induite par injection du peptide MOG₃₅₋₅₅, l'EAE est dépendante de la présence des lymphocytes T. Leur prolifération et différenciation en lymphocytes T effecteurs les amènent à traverser les barrières du SNC via entre autres l'expression de molécules d'adhérences et d'intégrines (Cayrol et al., 2008; Larochelle et al., 2012; Yednock et al., 1992). L'inflammation se répand avec l'interaction des lymphocytes T et des cellules présentatrices d'antigène au sein du SNC et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- α , l'interféron (IFN)- γ , l'IL-17, le GM-CSF (de l'anglais : *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*). L'EAE-MOG₃₅₋₅₅ est largement utilisée pour l'étude du rôle des lymphocytes T et leurs sous populations (comme les T_H17 et T_H1). Les lymphocytes B, eux, ne sont pas nécessaires au développement de l'EAE-MOG₃₅₋₅₅ bien qu'ils y contribuent (Fillatreau et al., 2002; Matsushita et al., 2008). Ainsi, l'induction d'EAE par injection sous-cutanée de MOG humaine recombinante (rhMOG) permet une meilleure

modélisation du rôle soupçonné des lymphocytes B dans la maladie (Molnarfi et al., 2013). Dans ce type d'EAE, dite dépendante des lymphocytes B, la présence de ceux-ci est nécessaire au développement de la maladie, par leur activité de cellules présentatrices d'antigène et indépendamment de leur activité humorale (Molnarfi et al., 2013). C'est un modèle utilisé dans la recherche du rôle des lymphocytes B dans le développement de lésions démyélinisantes, dans les mécanismes de migration des lymphocytes B vers le SNC et leur rôle dans la neuroinflammation (Lee et al., 2021; Michel et al., 2019; Rojas et al., 2019).

Ce modèle d'EAE active est encore à ce jour fortement utilisé dans le développement et la compréhension des mécanismes d'action des thérapies pour la SEP. En effet, l'acétate de glatimère et le natalizumab d'abord testés dans des modèles EAE, ont été développés en thérapies pour la SEP (Ben-Nun et al., 1996; Farooqi et al., 2010; Teitelbaum et al., 1971; Yednock et al., 1992). En revanche, ce mode d'induction d'EAE ne parvient pas à modéliser l'aspect progressif de la maladie qui est présente chez l'humain. D'autres systèmes d'induction permettent de pallier à cette limitation, via l'utilisation de différentes souches de souris et divers peptides injectés. Un éventail de modèles d'EAE existe aujourd'hui et chacun peut refléter différents aspects de la SEP. Ainsi, un modèle particulier ou une combinaison de modèles peuvent être choisis en fonction de la question de recherche (Constantinescu et al., 2011).

2.5.2 L'EAE passive

L'EAE dite passive ou de transfert adoptif, consiste à l'injection de lymphocytes autoréactifs dans des souris receveuses naïves (Stromnes & Goverman, 2006). Les premières expériences d'EAE passives consistaient à isoler les lymphocytes de souris préimmunisées avec des homogénats de tissus de cerveau et les injecter à des animaux receveurs naïfs qui développaient alors une EAE (Paterson, 1960). Après de nombreuses études sur ce procédé, l'EAE passive peut aujourd'hui s'induire par injection de lymphocytes T spécifiques d'antigènes du SNC. L'isolation de ces lymphocytes T peut se faire à partir de ganglions lymphatiques ou de rate d'animaux immunisés comme initialement exploré par Phillip Paterson ou à partir de souris transgéniques exprimant un récepteur de cellule T (TCR, de l'anglais : *T cell receptor*) reconnaissant un peptide de MOG (ex.

TCR₁₆₄₀ voir 2.5.3). Les lymphocytes T isolés sont ensuite réactivés en culture en présence de molécules encéphalitogéniques (ex. MOG₃₅₋₅₅) avant injection. Le transfert adoptif de cellules T encéphalitogéniques est très utile dans la recherche sur les insultes tissulaires et la neuroinflammation médiées par les lymphocytes T CD4⁺ et les mécanismes de leur migration vers le SNC dans ce contexte (Bartholomaeus et al., 2009; Schlager et al., 2016).

Le transfert de Lymphocytes T CD8⁺ autoréactifs est une autre induction possible d'EAE permettant une modélisation différente de la SEP avec une manifestation clinique et physiopathologique différente des EAE de transfert de lymphocytes T CD4⁺ (Huseby et al., 2001).

Le transfert de lymphocytes B encéphalitogéniques n'a, à ma connaissance, pas encore été montré comme suffisant pour induire une réponse immunitaire caractéristique de l'EAE. Aussi, l'injection d'anticorps encéphalitogéniques n'a pas porté ses fruits pour l'induction d'une EAE bien qu'ils exacerbent la pathologie (Linnington et al., 1988).

2.5.3 L'EAE spontanée

Certains modèles d'EAE consistent à induire une reconnaissance d'antigène du soi dans des modèles animaux transgéniques. Le plus souvent, le TCR est transgénique et spécifique d'un encéphalitogène entraînant le développement spontané d'une EAE au-delà de 50 jours après la naissance (Lassmann & Bradl, 2017). D'autres modèles transgéniques existent, du récepteur de cellule B (BCR, de l'anglais : *B Cell Receptor*) par exemple, permettant de générer des modèles doubles transgéniques du BCR et TCR reconnaissant des antigènes encéphaliques où le développement de la maladie implique alors à la fois les lymphocytes B et T (Bettelli et al., 2006; Krishnamoorthy et al., 2006).

Parmi les nombreux modèles transgéniques existants, le modèle de souris SJL/J TCR₁₆₄₀, dont le TCR reconnaît le peptide de MOG₉₂₋₁₀₆, est l'un des modèles d'EAE spontanée (Pollinger et al., 2009). Dans ces animaux, l'EAE reproduit certains dimorphismes de sexe observés dans la SEP chez l'humain (Dhaeze et al., 2019). Près de 80 % des souris femelles développent l'EAE dans les 160 premiers jours de leur vie et ont tendance à développer une EAE cyclique où les symptômes

viennent par poussées et rémissions. En contrepartie, 60 % des souris mâles tombent malade et développent pour la moitié d'entre elles une forme d'EAE progressive. Contrairement à de nombreux autres modèles EAE, l'atteinte n'est pas uniquement au niveau de la moelle épinière, mais aussi au niveau du cerveau. De plus, bien qu'induite via l'expression d'un TCR transgénique par les lymphocytes T, les lymphocytes B et les anticorps anti-MOG sont indispensables au développement de l'EAE spontanée. C'est donc un modèle de choix pour l'étude du dimorphisme de sexe dans le développement et la forme de la maladie, bien qu'il ait le défaut d'être induit uniquement par les lymphocytes T.

Bien que de nombreux modèles existent, l'EAE est un modèle animal qui reste imparfait. Là où la SEP est complexe et multifactorielle (prédispositions environnementales et génétiques), l'EAE est le résultat d'une induction contrôlée par l'expérimentateur et donc biaisée. L'environnement des animaleries de recherche est fortement contrôlé et considéré stérile. Les souris sacrifiées sont génétiquement identiques et exposées aux mêmes contraintes environnementales et expérimentales, permettant ainsi de limiter les variations interexpériences pour l'interprétation des données. Ceci fait de l'EAE un modèle reproductible, mais parfois difficilement transposable à l'humain. Les variations existent toutefois car certains paramètres tels que le stress vécu par les souris, l'expérimentateur, la saison de l'année peuvent modifier l'incidence, le début de la maladie et sa sévérité (Alvarez-Sanchez et al., 2020; Fournier et al., 2020; Gerrard et al., 2017).

Les limites des expérimentations animales sont nombreuses d'un point de vue éthique et par les difficultés de transposition des observations chez l'humain. Mais dans l'attente de modèles biologiques substitutifs, l'utilisation combinée de plusieurs types d'EAE chez des animaux des deux sexes sont une avenue expérimentale considérablement informative et parfois fructueuse dans le développement de médicament et la compréhension des mécanismes qui régissent la neuroinflammation.

3. Les populations lymphocytaires en SEP

Bien que l'étiologie de la SEP soit encore mal comprise, elle est considérée comme une maladie médiée, au moins en partie, par le système immunitaire. Les loci identifiés comme facteurs de risques sont pour une grande proportion, impliqués dans l'immunité adaptative, comme, par exemple, de nombreux variants HLA, molécule clef dans le dialogue entre leucocytes lors d'une réaction immunitaire (Gresle et al., 2020; International Multiple Sclerosis Genetics et al., 2013; International Multiple Sclerosis Genetics et al., 2007). En effet, l'implication des lymphocytes T et B, acteurs de l'immunité adaptative, est depuis longtemps connue et les indices pathologiques de leur infiltration cérébrale sont nombreux (Babbe et al., 2000; Baranzini et al., 1999; Kebir et al., 2009; Lassmann, 2018; Magliozzi et al., 2007; Serafini et al., 2004). Cette infiltration corrèle d'ailleurs avec l'activité lésionnelle démyélinisante de la maladie (Frischer et al., 2009).

Dans les 20 dernières années, de nombreuses études ont permis de mieux caractériser les acteurs de l'immunité adaptative impliqués dans les mécanismes pathologiques de la SEP. Parmi eux, on retrouve plusieurs sous-populations lymphocytaires telles que les lymphocytes T mémoires ($CD45RA^{neg}CD45RO^{+}$) effecteurs (plus spécifiquement exprimant CCR7), les lymphocytes T $CD8^{+}$, les lymphocytes B mémoires (exprimant CD27) et les plasmocytes (Claes et al., 2015; Fraussen et al., 2016; Kivisakk et al., 2004; MacLeod et al., 2010; Neumann et al., 2002). L'implication des autres populations de cellules immunitaires comme les monocytes/macrophages, les cellules NK (de l'anglais : *natural killer*) ou les cellules dendritiques n'est pas discutée ici bien que leur contribution dans la physiopathologie de la SEP soit maintenant reconnue (Filippi et al., 2018; Sospedra & Martin, 2005).

3.1 Les lymphocytes T

Les lymphocytes T furent considérés comme les acteurs principaux de la maladie depuis la fin du XXe siècle. Les modèles animaux impliquant des lymphocytes T ($CD4^{+}$ ou $CD8^{+}$) autoréactifs furent les premiers indices du rôle soupçonné central de ceux-ci dans la physiopathologie de la SEP (Ando et al., 1989; Ben-Nun et al., 1981; Huseby et al., 2001; Pettinelli & McFarlin, 1981).

Chez l'humain, les poussées cliniques sont principalement médiées par une activation aberrante et/ou une régulation insuffisante des lymphocytes T effecteurs pro-inflammatoires spécifiques du SNC. Ceux-ci incluent des lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ qui transitent jusqu'au parenchyme cérébral et causent la démyélinisation périvasculaire, l'activation des cellules gliales et des dommages neuro-axonaux (Dendrou et al., 2015). Ces cellules effectrices sont présentes dans les lésions cérébrales de SEP où l'infiltration de lymphocytes T CD4⁺ est plutôt périvasculaire et méningée alors que les lymphocytes T CD8⁺ migrent à travers la glie limitante et ont tendance à pénétrer le parenchyme (Gay et al., 1997).

De façon générale, les lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ se distinguent sur de nombreux aspects. Entre autres, les lymphocytes T CD8⁺ reconnaissent les peptides antigéniques présentés par le complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH-I), là où les lymphocytes T CD4⁺ reconnaissent ceux présentés par le CMH-II. Le CMH-I, exprimé de façon ubiquitaire à la surface des cellules nucléées de l'organisme, permet la présentation de peptides antigéniques aux lymphocytes T CD8⁺. Quant à lui, le CMH-II est exprimé à la surface de cellules immunitaires spécialisées qu'on nomme alors les cellules présentatrices d'antigènes (ex. macrophages, lymphocytes B, cellules dendritiques). Par la présentation d'un peptide antigénique exogène, le CMH-II permet l'activation des lymphocytes T CD4⁺. Pour chacune de ces deux populations de lymphocytes T, aux rôles distincts et complémentaires, sera détaillée ici leur implication dans la physiopathologie de la maladie.

3.1.1 Les lymphocytes T CD4⁺

Les lymphocytes T CD4⁺ peuvent selon l'environnement cytokinique auquel ils sont exposés se différencier en lymphocytes T auxiliaires (T_H, de l'anglais : *T_{Helper}*) principalement caractérisés par leur sécrétion de cytokines. Ces cytokines sont des molécules solubles généralement de petite taille qui ont pour fonction d'entraîner une cascade métabolique lorsqu'elles se lient à leur récepteur à la surface des cellules. Comme leur nom l'indique donc, les lymphocytes T auxiliaires jouent un rôle de soutien et de messenger par leur activité sécrétrice, ciblant à la fois des cellules de l'immunité adaptative et innée. Les lymphocytes T_H se découpent en plusieurs sous-

populations qui se distinguent par leur sécrétion de cytokine : les lymphocytes T_H1 sécréteurs d'IFN- γ , les lymphocytes T_H2 sécréteurs d'IL-4, les lymphocytes T_H17 sécréteurs d'IL-17, les lymphocytes T_H22 sécréteurs d'IL-22 et les T_H9 sécréteurs d'IL-9. Certains sous-types comme les T_H1 , T_H17 et T_H22 sont plutôt pathogéniques dans le cadre de maladies auto-immunes par leur sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (IFN- γ , IL-1 β , TNF- α et IL-17). En revanche, les sous-populations de T_H2 et T_H9 sont sécrétrices de cytokines anti-inflammatoires (IL-9, IL-4 et IL-10) et joueraient un rôle plutôt bénéfique dans le cadre de la SEP. Aussi impliqués en SEP, certains lymphocytes T $CD4^+$ peuvent se différencier en lymphocytes T régulateurs (T_{reg}). Ce sont des cellules connues pour leur rôle anti-inflammatoire notamment par la sécrétion de cytokines inhibant la réponse des lymphocytes T auxiliaires tels que le TGF- β (de l'anglais : *transforming growth factor- β*), l'IL-10 et l'IL-35. La contribution de chacun de ses sous-types de lymphocytes T $CD4^+$ dans la pathologie de la SEP sera détaillée ici.

T_{H1}

Les lymphocytes T_H1 sont l'un des deux premiers sous-types de cellules T auxiliaires qui furent identifiés dans les années 80 (Mosmann & Coffman, 1989). Ils sont caractérisés par leur expression à la membrane de CXCR3 (CXC chimiokine récepteur de type 3), du récepteur à l'IL-12 (IL-12R) et par l'expression intracellulaire de T-bet (de l'anglais : *T-box expressed in T cells*), facteur de transcription indispensable à leur différenciation en T_H1 . Leur cytokine majeure étant l'IFN- γ , les cellules T_H1 sécrètent aussi plusieurs cytokines parmi lesquelles sont l'IL-15, le GM-CSF et le TNF- α . Leur rôle principal est attribué à l'activation des macrophages, des cellules NK et des lymphocytes T $CD8^+$ pour favoriser l'extermination des pathogènes intracellulaires (revue dans Kunkl et al., 2020). Ce rôle s'exerce notamment via l'IFN- γ , connue pour activer les macrophages, mais aussi augmenter l'expression de certaines molécules d'adhérences par les cellules endothéliales, comme VCAM-1 ou ICAM-1 (McCarron et al., 1993; Wong & Dorovini-Zis, 1995), favorisant une éventuelle migration des lymphocytes T vers le parenchyme.

En EAE, l'IFN- γ est détecté dans le SNC des souris dès la phase présymptomatique (Merrill et al., 1992), bien qu'il ne s'avère pas indispensable pour le développement de la maladie (revue dans

Kunkl et al., 2020). En revanche, le transfert adoptif de cellules T_H1 suffit à l'induction de l'EAE dans des souris receveuses (Segal & Shevach, 1996). Dans la même lignée et soutenant le rôle des T_H1 en EAE, elles furent décrites comme étant les cellules T_H auxiliaires les plus fréquentes dans le SNC des souris EAE (Ando et al., 1989; Voskuhl et al., 1993). En SEP, l'IFN- γ est présent au sein des lésions actives de patient SEP (Lock et al., 2002) et, indice majeur de son implication dans la maladie, l'injection d'IFN- γ aux patients atteints de SEP exacerbe la maladie (Panitch, Hirsch, Haley, et al., 1987; Panitch, Hirsch, Schindler, et al., 1987). Ainsi, les cellules T_H1 furent longtemps considérées comme actrices principales de la physiopathologie de la SEP pour leur rôle pro-inflammatoire et activateur. C'est à la suite de la caractérisation d'un nouveau sous-type de cellules T_H effectrices, les cellules T_H17, que la communauté scientifique comprit que par-delà les cellules T_H1, les cellules T_H17 jouaient un rôle central dans le développement de l'EAE, et par la suite, de la SEP.

T_H17

Les lymphocytes T_H17, cellules sécrétrices d'IL-17, furent identifiés plus tard, au milieu des années 2000 (Langrish et al., 2005). Les marqueurs de surfaces utilisés pour les identifier sont CD161 et les récepteurs aux chimiokines CCR6 et CCR4 (Acosta-Rodriguez, Rivino, et al., 2007) et elles sont aussi connues pour leurs sécrétions cytokiniques variées parmi lesquelles sont l'IL-17 (aussi appelé IL-17A), l'IL-17F, l'IL-22 et le GM-CSF (Codarri et al., 2011; El-Behi et al., 2011). Le facteur de transcription qui définit le profil T_H17 est ROR γ t (de l'anglais : *retinoic-acid-receptor-related orphan receptor γ t*) (Ivanov et al., 2006). Générer *in vitro* des T_H17 nécessite la présence des cytokines TGF- β , IL-6 et IL-1 β ; et l'IL-23 s'ajoute parfois à la liste (Acosta-Rodriguez, Napolitani, et al., 2007; Aggarwal et al., 2003; Mangan et al., 2006; Zhou et al., 2007). Une fois différenciées dans l'organisme, ce sont des cellules spécialisées dans la protection contre les pathogènes extracellulaires. L'IL-17, cytokine signature des cellules T_H17, agit sur de nombreux types cellulaires tels que les macrophages, les cellules épithéliales et endothéliales. Elle est une cytokine pro-inflammatoire qui favorise l'expression d'autres cytokines telles que le GM-CSF, le G-CSF (de l'anglais : *granulocyte colony-stimulating factor*), l'IL-6 et de chimiokines (ex. CXCL8,

CXCL10, CXCL1), jouant un rôle dans le recrutement d'autres cellules immunitaires vers le site de l'inflammation (Pelletier et al., 2010). Afin d'atteindre les tissus, les T_H17 expriment certaines molécules clés à leur migration telles que CD6, MCAM ou VLA-4 en plus hautes proportions que les T_H1 (Brucklacher-Waldert et al., 2009). Ces molécules favorisent d'ailleurs la migration des T_H17 à travers les cellules endothéliales de la barrière hémato-encéphalique ou des barrières sang-LCR (Breuer et al., 2018; Flanagan et al., 2012; Larochelle et al., 2012; Schneider-Hohendorf et al., 2014). Les cellules T_H17 jouent donc un rôle évident localement de recruteur et messenger pro-inflammatoire au niveau du tissu touché.

En EAE, elles atteignent le SNC et y jouent un rôle d'activatrices des cellules astrocytaires et microgliales (Murphy et al., 2010). L'IL-17 est d'ailleurs requis pour que l'inflammation cérébrale s'installe (Stromnes et al., 2008). Aussi, les souris *knockout* (KO) pour l'IL-17 développent une EAE moins sévère (Komiyama et al., 2006).

En SEP, les cellules T_H17 et l'IL-17 furent hautement étudiés. En premier lieu, de hauts niveaux d'expression d'IL-17 ont été décrits dans le sang, le LCR et les lésions cérébrales des patients (Lock et al., 2002; Matusevicius et al., 1999). C'est une molécule qui a le potentiel de perturber l'intégrité de la barrière hémato-encéphalique (Huppert et al., 2010), et ainsi de potentiellement contribuer à la formation des lésions. Parallèlement, la culture *in vitro* des cellules mononuclées issues du sang de patients atteints de SEP, a montré que l'expression d'IL-17 corrèle avec l'activité lésionnelle (nombre de plaques actives en IRM) du patient (Hedegaard et al., 2008). Au niveau cellulaire, une augmentation de la proportion de T_H17 est observée dans le sang des patients SEP cyclique dès les stades précoces de la maladie (Zhang et al., 2015) de même que chez les patients présentant des formes progressives de la maladie (Kalra et al., 2020; Romme Christensen et al., 2013). Étudiée plus en détail, la fréquence de cellules T_H17 est particulièrement augmentée dans le sang et le LCR des patients pendant les phases de poussée (Brucklacher-Waldert et al., 2009; Durelli et al., 2009), suggérant un rôle des T_H17 dans la phase active de la maladie.

In vitro, des cellules T_H17 dérivées de lymphocytes T CD4⁺ naïfs de patients SEP, tendent vers un profil hautement pathogénique révélé par leur expression d'IL-1R, d'IL-21, d'IL-2 et de LT- α , en comparaison avec les T_H17 dérivées de donneurs sains (Capone et al., 2019). Ceci est d'autant

plus révélateur que ce sont des cellules qui ont la capacité de migrer à travers la barrière hémocéphalique et d'infiltrer le parenchyme cérébral vers des sites de lésions actives (Kebir et al., 2009; Kebir et al., 2007; Tzartos et al., 2008; van Langelaar et al., 2018). Elles sont soupçonnées d'y être pathogéniques par leur rôle dans l'activation des macrophages, des microglies et des astrocytes et par le fait même, par leur rôle, même si indirect, dans les dommages axonaux (touchant les oligodendrocytes et neurones) (Kebir et al., 2009; Kebir et al., 2007; van Langelaar et al., 2018). Pour finir, plusieurs thérapies immunomodulatrices efficaces en SEP comme le natalizumab et les anti-CD20 entraînent une modification de la proportion de T_H17 dans le sang périphérique des patients (Buhler et al., 2017; Gingele et al., 2018). Toutes ses observations font de ces cellules des actrices centrales dans la physiopathologie de la SEP bien que beaucoup d'informations manquent encore à la compréhension des mécanismes qui régissent leur contribution.

Les lymphocytes T_H17 sont aussi connus pour leur grande plasticité. Leur profil de sécrétion de cytokine peut changer selon l'environnement auquel ils sont exposés. Dans certains cas, ils peuvent se différencier en cellules anti-inflammatoires T_{reg} . Mais dans d'autres cas, ils peuvent devenir hautement pro-inflammatoire en sécrétant de l'IFN- γ , ce sont alors des $T_H17.1$ (aussi appelée T_H1/T_H17) (Paroni et al., 2017). Ces cellules qui, comme les T_H17 , se retrouvent dans le SNC des souris EAE, jouent un rôle pro-inflammatoire et activateur des microglies (Murphy et al., 2010). Elles co-expriment l'IFN- γ , le GM-CSF et l'IL-17 et jouent un rôle dans le développement précoce de la maladie chez les patients SEP. Leur proportion est même augmentée dans le LCR des patients ayant un début de maladie rapide (van Langelaar et al., 2018). Pour finir, ces cellules qui co-expriment l'IFN- γ et l'IL-17 sont connues pour leur haut potentiel pathogénique en SEP, où on les retrouve dans les lésions (Kebir et al., 2009).

T_H2

Les lymphocytes T_H2 sont des cellules à profil anti-inflammatoire. Ils sécrètent des cytokines comme l'IL-4, l'IL-5, l'IL-10 et l'IL-13. L'IL-4 et l'IL-10 sont toutes deux connues pour leur rôle

protecteur en EAE (Bettelli et al., 1998) et soupçonné en SEP (Correale et al., 1995; Tahani et al., 2019). Leur contribution réelle dans la physiopathologie de la SEP est encore peu caractérisée bien qu'elle soit soupçonnée mineure par rapport aux autres grands sous-types de T_H auxiliaires que sont les T_H1 et les T_H17.

T_{reg}

Les lymphocytes T_{reg} sont les cellules CD4⁺CD25⁺ régulatrices. Ils restreignent la prolifération des lymphocytes T effecteurs inflammatoires. Leur différenciation et développement est dépendant du facteur de transcription intranucléaire FoxP3 (de l'anglais : *forkhead box P3*), souvent utilisé pour les identifier (Fontenot et al., 2003). Leur capacité régulatrice est utile dans plusieurs contextes inflammatoires comme l'auto-immunité et les infections virales (Levings et al., 2006), mais aussi dans le maintien de la tolérance aux antigènes du soi (Sakaguchi et al., 1995). En SEP, leur nombre est altéré en périphérie (Carbone et al., 2014), ils sont présents au sein des lésions de SEP (Fritzsching et al., 2011; Zandee et al., 2017) et certaines thérapies modificatrices de la maladie semblent jouer un rôle positif sur ces cellules (Sambucci et al., 2019).

T_H22

Les cellules T_H22 sont une sous-population de T_H auxiliaires qui fut d'abord décrite en 2009 (Trifari et al., 2009). Ces cellules sécrètent de l'IL-22, cytokine aussi sécrétée par les T_H17, de l'IL-13 et du TNF- α . Bien que le rôle de l'IL-22 en SEP ne soit pas encore bien caractérisé, plusieurs études suggèrent son implication dans l'immunopathologie de la maladie (Rolla et al., 2014; Xu et al., 2013). En premier lieu, son action en synergie avec l'IL-17 entraîne une dérégulation de l'intégrité la barrière hémato-encéphalique (Kebir et al., 2007). En lien avec ses observations, de hauts niveaux d'IL-22 sont détectés dans le sérum des patients SEP cyclique (Perriard et al., 2015; Xu et al., 2013). L'IL-22 est aussi retrouvée au niveau des lésions de patients SEP, où elle colocalise avec son récepteur IL-22R (Kebir et al., 2007; Perriard et al., 2015). Pour finir, les cellules T_H22

joueraient un rôle dans la régulation des astrocytes et la survie des oligodendrocytes en SEP mais ce sont des mécanismes encore à explorer (Perriard et al., 2015; Zhen et al., 2017).

T_H9

Récemment découvertes, les T_H9 sont les lymphocytes T auxiliaires sécréteurs d'IL-9. L'IL-9 était précédemment associée à la réponse des T_H2 anti-inflammatoire. Cette interleukine semble jouer notamment un rôle dans la phase de rémission chez les patients SEP en réduisant la production d'IL-17 par les cellules T_H17 (Ruocco et al., 2015). En effet, les niveaux d'IL-9 dans le LCR des patients RRMS corrént négativement avec l'activité inflammatoire et la neurodégénérescence (Ruocco et al., 2015). De la même façon que les cellules T_H22, ce sont des cellules encore peu étudiées dans le cadre de la SEP.

3.1.2 Les lymphocytes T CD8⁺

Les lymphocytes T CD8⁺ sont essentiellement connus sous le nom de lymphocytes T cytotoxique (Tc). Acteurs essentiels du système immunitaire adaptatif, ils peuvent directement tuer les cellules dans le cadre de défense contre des pathogènes intracellulaires. Afin d'acquérir leurs fonctions effectrices, les lymphocytes T CD8⁺ doivent reconnaître le complexe peptide/CMH-I. Ils peuvent alors sécréter des granules cytotoxiques constitués de perforines et de granzymes. Ces molécules entraînent à leur contact, l'apoptose de la cellule cible infectée (Chavez-Galan et al., 2009). Cette mort cellulaire peut aussi être induite par l'interaction Fas/FasL des lymphocytes T CD8⁺ avec la cellule cible. Enfin, ces cellules peuvent sécréter des cytokines comme le TNF- α et l'IFN- γ et de la même manière que les T CD4⁺ auxiliaires, être définies Tc1, Tc2 et Tc17 en fonction de leur profil d'expression de cytokines (ex. IFN- γ , IL-4 et IL-17) (Slifka et al., 1999).

Ce sont des cellules qui ont fait l'objet de nombreuses études en SEP notamment parce qu'elles représentent une grande proportion des lymphocytes retrouvés au sein des lésions de SEP. En premier lieu, chez la souris, le transfert adoptif de lymphocytes T CD8⁺ dirigés contre la myéline induit une auto-immunité sévère du SNC, définie comme EAE. Selon la souche de souris et le

peptide de myéline utilisé, les symptômes observés chez ces animaux miment plusieurs aspects de la pathologie de la SEP comme, par exemple, la phase progressive (Huseby et al., 2001; Sun et al., 2001).

Chez l'humain, la majorité des cellules résidentes du SNC (les neurones, les astrocytes et les oligodendrocytes) expriment le CMH-I dans des conditions inflammatoires, faisant d'elles des cellules pouvant présenter des antigènes aux lymphocytes T CD8⁺. Cela est vrai en SEP où le CMH-I est surexprimé très tôt dans le SNC, et ce, même avant que la démyélinisation soit observée (Hayashi et al., 1988). L'allèle du CMH-I HLA-A3 (A*0301) est d'ailleurs associé à une susceptibilité à développer la maladie, alors que d'autres variants (ex. HLA-A*0201) sembleraient réduire les risques de la développer (Brynedal et al., 2007; Goverman, 2009).

Lorsqu'étudiés *in vitro*, on constate que les lymphocytes Tc ont une réponse aux peptides de MBP augmentée chez les patients SEP par rapport aux contrôles sains (Zang et al., 2004). De plus, les lymphocytes Tc spécifiques de la myéline sécrètent des molécules chimioattractantes comme l'IL-16 ou l'IP-10 pouvant guider les lymphocytes T CD4⁺ spécifiques de la myéline vers le site lésionnel (Biddison et al., 1998). De plus, la fréquence des lymphocytes T CD8⁺ en périphérie diminue simultanément à l'exacerbation de certains aspects cliniques, reflétant leur recrutement potentiel au SNC inflammé à cette phase de la maladie (Compston, 1983). Récemment, une étude de séquençage d'acide ribonucléiques messagers (ARN) au niveau cellulaire chez des jumeaux monozygotes fit le constat d'une expansion clonale de lymphocytes T CD8⁺ dans le sang et le LCR des jumeaux atteints de SEP ou ayant des manifestations non symptomatiques à l'IRM (Beltran et al., 2019). Cette expansion clonale avait déjà été observée dans le LCR (Jacobsen et al., 2002) et le cerveau des patients atteints de SEP de différents sous-types (Babbe et al., 2000; Goverman, 2009; Machado-Santos et al., 2018; Skulina et al., 2004). *In situ*, les lymphocytes T CD8⁺ sont les lymphocytes les plus abondants dans les lésions de SEP. Elles sont situées en périvasculaire dans les lésions actives et plutôt en intraparenchymateux dans les lésions chroniques actives, où elles arborent un phénotype de T CD8⁺ mémoires résidentes (Fransen et al., 2020). C'est aussi le lieu où elles sont en contact direct avec des cellules myéloïdes, potentiellement présentatrices d'antigènes (Konjevic Sabolek et al., 2019). Avec les lymphocytes T CD8⁺, les granules cytotoxiques qu'ils sécrètent sont détectés au sein des plaques de démyélinisation indiquant leur

rôle potentiel dans la mort cellulaire qui s’y produit (Neumann et al., 2002). De plus, Neumann et ses collègues ont observé que la fréquence des lymphocytes T CD8⁺ infiltrés corrèle avec les dommages axonaux dans les lésions actives de patients. Il existe donc de nombreux arguments soutenant le rôle délétère des lymphocytes Tc dans le SNC en SEP. En revanche, les mécanismes qui régissent leur recrutement vers le SNC sont encore peu compris bien que plusieurs molécules d’adhérence comme MCAM et VLA-4 furent décrites comme y participant (Ifergan, Kebir, Alvarez, et al., 2011; Laroche et al., 2015).

Aujourd’hui, la contribution des lymphocytes T CD8⁺ dans l’installation de l’inflammation en SEP est encore assez mal comprise et reste à explorer plus en détail, mais il ne fait aucun doute qu’ils sont des acteurs importants dans la maladie. En conclusion, les lymphocytes T CD8⁺ contribuent, avec les lymphocytes T CD4⁺ à la pathologie de la SEP et l’on suspecte que leurs fonctions y soient complémentaires, par leur répartition distincte dans l’espace et le temps.

3.2 Les lymphocytes B

Les lymphocytes B sont un bras essentiel de l’immunité adaptative, notamment par leur rôle de cellules mémoires et leur activité humorale. Dans un contexte sain, de nombreuses sous-populations de lymphocytes B circulent en périphérie. Avant leur rencontre avec un antigène, les lymphocytes B matures sont dits **naïfs** (CD27^{neg}IgM^{low}IgD^{high} ou CD38^{dim}CD24^{dim}). Plusieurs types d’interactions peuvent amener à l’activation du lymphocyte B de façon T-indépendante ou T-dépendante. En effet, selon les cas, les lymphocytes B peuvent être activés par leur interaction avec des antigènes du soi ou étranger détectés par le BCR ou avec des motifs bactériens communs d’ADN non méthylés (CpG) détectés par leurs récepteurs TLR (de l’anglais : *toll-like receptor*) (Krieg et al., 1995). Une fois **activés**, les lymphocytes B peuvent être identifiés par leur expression à la membrane des molécules CD95, CD40, CMH-II, CD80 ou CD86. Ensuite, au sein des organes lymphoïdes secondaires, certains lymphocytes B ayant rencontré un antigène subissent une hypermutation somatique de leur BCR pour en augmenter l’affinité, pouvant les mener à un changement de l’isotype des immunoglobulines (Ig ou anticorps) produites, et une sélection sur la base de leur affinité pour un antigène spécifique. Elles deviennent ainsi des cellules hautement

spécialisées pour un antigène, en tant que lymphocytes B mémoires ou cellules sécrétrices d'Ig (plasmablastes/plasmocytes) (discuté dans DiSano et al., 2021). Les lymphocytes B **mémoires** (CD27⁺ ou CD38^{neg}CD24^{high}) sont des cellules pouvant survivre des décennies dans l'attente d'une seconde rencontre avec l'antigène pour lequel ils sont spécialisés. Ils sont alors capables, lors de la réponse immunitaire secondaire, d'intervenir rapidement, en sécrétant des cytokines inflammatoires ou en se différenciant en cellule sécrétrice d'Ig. Les **plasmablastes**, cellules à courte durée de vie, sont des cellules capables de sécréter rapidement un grand nombre d'Ig pour de courtes périodes. Dans la même lignée, les **plasmocytes** (CD19^{+/-neg}CD27⁺⁺ CD38⁺⁺⁺CD138^{+/-neg} CD20^{neg}) sont des cellules ayant comme unique fonction la sécrétion d'Ig, mais celles-ci persistent à travers le temps. Étant le dernier stade de différenciation des lymphocytes B, ce sont des cellules qui ont perdu leur capacité de division. Enfin, certains lymphocytes B dits **transitionnels** (de l'état immature vers mature) sont détectés en périphérie. Ils sont identifiés grâce à leur forte expression de CD38 et CD24, mais ne représentent qu'une très faible proportion (approximativement 4 %) des lymphocytes B circulants d'un adulte sain (Jacquot & Boyer, 2006). Leur fonction reste floue bien qu'ils soient soupçonnés régulateurs par leurs similarités avec les lymphocytes B régulateurs sécréteurs d'IL-10 anti-inflammatoire (Oleinika et al., 2019). En SEP, leur fréquence est diminuée dans le sang périphérique des patients (Lee-Chang et al., 2011; Zhou et al., 2020), mais leur rôle y reste à explorer.

3.2.1 Les anticorps et les cellules sécrétrices d'anticorps en SEP

Historiquement, les lymphocytes B sont connus pour leur rôle de cellules sécrétrices d'Ig, molécules clés dans la lutte contre les pathogènes. La découverte de leur implication dans la physiopathologie de la SEP date de 1950, lorsqu'une augmentation d'Ig fut détectée dans le LCR des patients. C'est la raison pour laquelle la contribution de ces molécules dans la pathologie fut hautement étudiée depuis le milieu du XXe siècle. L'accumulation d'Ig dans le LCR des patients demeure encore aujourd'hui un élément du diagnostic de SEP (Thompson et al., 2018) et la présence d'Ig fut décrite dans les lésions de patients SEP (Tobin et al., 2021).

Les premières études menées dans l'exploration du rôle des Ig montrèrent que les Ig anti-MOG peuvent induire une destruction de la myéline en EAE (Lington et al., 1988; Schluesener et al., 1987). Il fut même compris plus tard qu'en EAE et *in vitro*, les Ig sont capables de causer de la démyélinisation axonale par différents processus qu'est l'opsonisation de la myéline pour la phagocytose ou via l'activation de la voie du complément (Goldenberg et al., 1989; Mead et al., 2002). Mais il semblerait que les anticorps en EAE ne soient pas nécessairement néfastes, car leur présence favoriserait la différenciation des lymphocytes T CD4⁺ en T_H2 (Saoudi et al., 1995) et ils favoriseraient la remyélinisation (Rodriguez & Lennon, 1990).

Historiquement, le mécanisme principalement associé aux lymphocytes B dans la pathologie de la SEP était la destruction de la myéline favorisée par les anticorps dirigés contre la myéline. Bien que de prime abord les études décrivaient une augmentation d'Ig anti-MOG dans le LCR des patients, il fut plus tard constaté que leur présence dans le LCR des patients définissait des maladies démyélinisantes distinctes de la SEP, aujourd'hui dénommées MOGAD (de l'anglais : *MOG antibody-associated diseases*). Ces observations montrent tout de même que les Ig dirigés contre un épitope de la myéline peuvent entraîner une dégradation de celle-ci, suggérant ainsi que les Ig retrouvés en SEP pourraient jouer un rôle délétère dans la formation des lésions bien qu'aucun épitope spécifique n'ait encore été identifié. L'augmentation d'Ig dans le LCR des patients atteints de SEP est observée par électrophorèse où des bandes oligoclonales sont détectées. Par le passé, plusieurs études ont montré que ces Ig provenaient d'un nombre limité de clones de lymphocytes B, eux-mêmes situés dans le LCR (Baranzini et al., 1999; Colombo et al., 2000; Qin et al., 2003; Qin et al., 1998; Sharief & Thompson, 1991; Walsh & Tourtellotte, 1986). Ces bandes oligoclonales sont l'une des raisons qui menèrent la communauté scientifique à tester les thérapies anti-lymphocytes B pour traiter la SEP. Parmi les thérapies anti-lymphocytes B, l'Atacicept, bloquant leur maturation, entraîna une exacerbation des poussées de SEP (Sergott et al., 2015). Cette molécule cause notamment la perte des plasmocytes et des plasmablastes sans perturber les lymphocytes B mémoires. Ces derniers, par leur profil pro-inflammatoire, furent alors soupçonnés d'aggraver la SEP. En parallèle, les thérapies anti-CD20, ne ciblant pas les plasmocytes matures (CD20^{neg}), furent efficaces pour lutter contre la maladie cyclique où l'on observa une réduction du taux de poussées (Hauser et al., 2017; Hauser et al., 2008). En revanche,

leur influence sur la nature et le nombre d'Ig dans le LCR des patients traités était minime ou voire inexistante (Cross et al., 2006; Monson et al., 2005). L'efficacité de ces thérapies dans la lutte contre la SEP fut une découverte massive dans la compréhension de la pathologie et du rôle des lymphocytes B dans celle-ci, indépendamment des anticorps.

3.2.2 Les lymphocytes B mémoires

La contribution des lymphocytes B dans la physiologie de la SEP semble pour une grande part, due aux lymphocytes B mémoires. Ils sont capables de jouer un rôle de cellule présentatrice d'antigène pour les lymphocytes T autoréactifs et ils sécrètent un éventail de cytokines. Dans un contexte auto-immun, ils expriment le CMH-II et les molécules co-stimulatrices CD80 et CD86, jouant un rôle important dans l'activation des lymphocytes T (Molnarfi et al., 2013; O'Neill et al., 2007). En SEP, les lymphocytes B ont un profil plutôt pro-inflammatoire car elles ont tendance à sécréter des cytokines comme l'IL-6, le GM-CSF, le TNF- α et le lymphotoxine- α (LT- α) et diminuent leur sécrétion d'IL-10 régulatrice (Bar-Or et al., 2010; Barr et al., 2012; Duddy et al., 2007; Li, Rezk, Healy, et al., 2015; Li et al., 2017; Li, Rezk, Miyazaki, et al., 2015; McWilliam et al., 2018). Dans un contexte *in vitro*, il fut même démontré que les lymphocytes B dérivés de patients atteints de SEP sécrètent des facteurs, autres que des anticorps, qui induisent la mort cellulaire par apoptose des oligodendrocytes et des neurones (Lisak et al., 2012; Lisak et al., 2017).

En lien avec leur état pro-inflammatoire, l'autoprolifération et la réponse cytokinique des lymphocytes T effecteurs en SEP sont partiellement médiées par les lymphocytes B mémoires (Jelcic et al., 2018). Sans oublier que ces lymphocytes T effecteurs ont le potentiel de migrer vers le SNC et d'y être pathogéniques. Ici encore, les lymphocytes B jouent leur part dans le recrutement au SNC des lymphocytes T et des cellules myéloïdes (Holmoy et al., 2003; Li et al., 2018). En effet, on retrouve les lymphocytes B mémoires non seulement au sein du LCR, mais aussi dans les infiltrats de cellules immunitaires des lésions actives de patients (Machado-Santos et al., 2018) et au niveau des agrégats de cellules immunitaires méningés des patients SEP secondaire progressif (Howell et al., 2011; Magliozzi et al., 2007; Reali et al., 2020; Serafini et al., 2004; Serafini et al., 2010).

De plus, le séquençage des BCR a permis de comprendre que les mêmes clones de lymphocytes B sont détectés en périphérie et dans le SNC, suggérant leur maturation avant d'atteindre le SNC et leur passage d'un compartiment anatomique à l'autre (Palanichamy et al., 2014; Stern et al., 2014). Ces observations soulignent l'importance de comprendre par quels mécanismes les lymphocytes B pathogéniques sont recrutés au sein du SNC. En premier lieu, des études ont montré qu'ils sont guidés par des chimiokines, notamment grâce aux récepteurs CXCR4, CXCR5, CXCR3, CCR1, CCR2 et CCR4 qu'ils expriment (Corcione et al., 2004; Eggers et al., 2017; Ramesh et al., 2020). Aussi, dans leur profil mémoire, ils expriment de hauts niveaux des molécules d'adhérence LFA-1 (de l'anglais : *lymphocyte function-associated antigen 1*) et VLA-4 comparé aux lymphocytes B naïfs, initialement pour leur rétention dans les organes lymphoïdes secondaires. Dans le cadre de la SEP, ces deux molécules ont le potentiel de favoriser la transmigration des lymphocytes B à travers les cellules endothéliales de la barrière hémato-encéphalique (Alter et al., 2003). C'est ce qui explique probablement que l'absence de VLA-4 à la membrane des lymphocytes B entraîne une diminution de leur accumulation dans le SNC chez des souris EAE. De plus, ces souris développent une EAE moins sévère (Lehmann-Horn et al., 2015).

Par leur présence dans le SNC et de leur profil pro-inflammatoire chez les patients atteints de SEP, les lymphocytes B sont une cible thérapeutique d'un grand intérêt. En EAE-MOG₃₅₋₅₅, le traitement anti-CD20 visant les lymphocytes B réduit la sévérité de la maladie, même si le rôle des lymphocytes B dans celle-ci y est limité (Barr et al., 2012; Matsushita et al., 2008). Chez l'humain, les premières études de thérapies de déplétion des lymphocytes B (anticorps anti-CD20) chez les patients SEP cyclique démontrèrent l'importance de ces cellules dans la pathologie (Hauser et al., 2017; Hauser et al., 2008). En effet, les thérapies anti-CD20 que sont le rituximab, l'ocrelizumab et l'ofatumumab sont efficaces pour réduire l'apparition de lésions chez les patients SEP cyclique (Hauser et al., 2017; Hauser et al., 2008; Sorensen et al., 2014). Comme précédemment mentionné, la molécule CD20 n'est pas exprimée par les plasmocytes et ainsi ces thérapies n'ont pas ou que peu d'effet sur les niveaux d'Ig dans le sérum des patients traités (Cencioni et al., 2021; Cross et al., 2006; Hauser et al., 2008; Monson et al., 2005). L'hypothèse est que ces thérapies permettent de réduire la présentation d'antigène menée par les lymphocytes B via leur CMH-II (Molnarfi et al., 2013) et de réduire la sécrétion de cytokines pro-

inflammatoires telles que l'IL-6 ou le GM-CSF (Barr et al., 2012; Li, Rezk, Miyazaki, et al., 2015), qui participent à la neuroinflammation. Il est suggéré que l'ablation de la population de lymphocytes B mémoires soit à l'origine de la diminution de la réponse pro-inflammatoire observée des T_H1 et T_H17 (Bar-Or et al., 2010; Barr et al., 2012).

Aujourd'hui, on considère donc que les lymphocytes B, en tant que cellules présentatrices d'antigène pro-inflammatoires, conduisent à une réponse des T_H1 et T_H17, en favorisant leur circulation et les interactions entre cellules immunitaires, événements déterminants dans la physiopathologie de la SEP.

4. Les molécules d'adhérence dans le recrutement des leucocytes au SNC

Les molécules d'adhérences de la superfamille des immunoglobulines sont très souvent des protéines transmembranaires (discuté dans Harjunpaa et al., 2019). Elles contiennent un ou plusieurs domaines immunoglobulines ou de type immunoglobuline qui se trouvent généralement sur la portion extracellulaire de la protéine. Ce sont des molécules impliquées dans l'adhérence cellule-cellule grâce aux interactions homotypiques et hétérotypiques avec d'autres molécules. Parmi celles-ci, les molécules ICAM, VCAM, MadCAM et ALCAM sont connues plus spécifiquement pour leur implication dans la migration des leucocytes dans de nombreux contextes physiologiques. Ce sont des molécules exprimées par une grande variété de cellules dans l'organisme, jusqu'aux cellules du SNC (Lee & Benveniste, 1999). Dans le contexte de la circulation sanguine et de la migration des cellules immunitaires vers le site d'inflammation, les molécules d'adhérence permettent l'arrêt des cellules immunitaires périphériques sur la surface luminale de la paroi des vaisseaux sanguins. Cette étape est médiée par leur interaction avec des intégrines ou des molécules d'adhérences exprimées par les cellules endothéliales. C'est une étape indispensable pour que la cellule immunitaire trouve, par rampement sur la paroi, le lieu propice à sa migration trans- ou paracellulaire à travers la barrière du SNC, l'emmenant vers l'espace périvasculaire en premiers lieux puis dans le parenchyme cérébral. Les mécanismes par lesquels les cellules immunitaires pathogéniques atteignent les lésions sont encore peu décrits. Toutefois, les recherches des 20 dernières années ont montré que plusieurs molécules

d'adhérence (ex. ICAM-1, VCAM-1, MCAM, sélectine P et E, Ninjurin-1, MAdCAM-1) contribuent au passage des leucocytes pathogéniques à travers les barrières du SNC (plus spécifiquement les barrières hémato-encéphalique et hémato-méningée) (Battistini et al., 2003; Berlin et al., 1993; Bullard et al., 2007; Carvalho-Tavares et al., 2000; Cayrol et al., 2008; Ifergan, Kebir, Alvarez, et al., 2011; Ifergan et al., 2008; Ifergan, Kebir, Terouz, et al., 2011; Larochelle et al., 2011; Larochelle et al., 2012; Larochelle et al., 2015; Lecuyer et al., 2017; Lyck et al., 2017; Wilson et al., 2010). Étant l'objet de cette thèse, il sera discuté ici le rôle de deux molécules d'adhérence spécifiques que sont ALCAM et DICAM (de l'anglais : *dual immunoglobulin domain containing cell adhesion molecule*).

4.1 ALCAM

4.1.1 Structure protéique et ligands

ALCAM est une protéine transmembranaire de 100 à 150 kDa (583 acides aminés) de la superfamille des Ig. Elle est aussi connue sous le nom de CD166, MEMD chez l'humain et est fortement conservée à travers les espèces vertébrées, de la souris au poisson en passant par le rat, la tortue et la poule, où elle fut d'abord décrite en 1990 (Pourquie et al., 1990). Par sa portion extracellulaire, elle se lie de façon homotypique à elle-même et de façon hétérotypique à la molécule CD6, une molécule lymphocytaire co-stimulatrice, favorisant le contact cellule-cellule (Bowen et al., 1995; Ikeda & Quertermous, 2004; Patel et al., 1995; van Kempen et al., 2001). Par son domaine intracellulaire, ALCAM est associée au cytosquelette d'actine de la cellule qui l'exprime par l'intermédiaire des molécules Syntenin-1 et Ezrin qui font office de pont entre la partie intracellulaire d'ALCAM et le cytosquelette (Nelissen et al., 2000; Tudor et al., 2014; Zimmerman et al., 2004). Cette interaction est d'ailleurs stabilisée lorsqu'ALCAM et CD6 interagissent, suggérant un rôle d'ALCAM dans la stabilisation de la synapse immunologique entre lymphocytes T et cellules présentatrices d'antigènes. Autre molécule interagissant avec la partie intracellulaire de la molécule ALCAM est PKC α (protéine kinase α). PKC α est impliquée, par l'intermédiaire du cytosquelette, dans la modulation de l'avidité des interactions homotypiques et hétérotypiques d'ALCAM (Zimmerman et al., 2004). Étant donné que PKC α n'est pas un ligand

direct d'ALCAM, il est suspecté qu'une combinaison d'interaction entre PKC α , Ezrin et Syntenin-1 soit impliquée dans le pont moléculaire entre ALCAM et l'actine au niveau intracellulaire. Autres actrices décrites dans la littérature, la molécule tétraspanine CD9 et la métalloprotéase ADAM17 (de l'anglais : *a disintegrin and metalloprotease17*) forment un complexe protéique avec ALCAM à la surface des leucocytes. ADAM17 est une enzyme qui régule l'adhérence cellulaire par son activité protéolytique de l'ectodomaine de nombreuses molécules d'adhérence comme ALCAM. CD9 quant à elle est impliquée dans l'organisation de microdomaines à la surface cellulaire par son interaction latérale avec d'autres tétraspanines et molécules d'adhérences (Gilsanz et al., 2013). L'interaction d'ALCAM latéralement avec CD9 permet de former des groupes de molécules ALCAM à la surface de la cellule et ainsi d'augmenter les interactions intercellules à la fois homotypique (ALCAM-ALCAM) et hétérotypique (ALCAM-CD6)(Gilsanz et al., 2013).

ALCAM est exprimée dans une grande variété de tissus et de types cellulaires, révélant les multiples fonctions qu'elle incarne. En effet, dès le stade embryonnaire, c'est une molécule exprimée par des cellules hématopoïétiques progénitrices et elle participe à la formation des capillaires par son expression sur les cellules endothéliales (Ohneda et al., 2001). C'est aussi pourquoi ALCAM est exprimée par les cellules endothéliales de nombreux tissus, parmi lesquels le SNC (Chedotal et al., 1995; Ikeda & Quertermous, 2004; Iolyeva et al., 2013; Pourquoi et al., 1990). ALCAM est aussi exprimée par les cellules épithéliales, les cellules stromales mésenchymateuses, les cellules myéloïdes et leurs progénitrices, les neurones, les cellules tumorales et les cellules souches cancéreuses (Arai et al., 2002; Ferragut et al., 2021; Munsterberg et al., 2020; Ohneda et al., 2001).

4.1.2 Fonctions

ALCAM tire son nom de son profil d'expression par des cellules activées et son rôle dans l'adhérence cellulaire. Depuis sa découverte il y a 30 ans, ALCAM a été décrite comme impliquée dans de nombreux événements physiologiques comme l'hématopoïèse, la neurogenèse, l'angiogenèse, l'inflammation et la migration cellulaire (Ferragut et al., 2021; Swart, 2002; Weidle et al., 2010). Au niveau vasculaire, elle est impliquée dans l'interaction entre cellules

endothéliales, sous-jacente du bon fonctionnement et de la stabilité des vaisseaux, de la perméabilité et de la circulation des leucocytes dans ceux-ci (Iolyeva et al., 2013). Dans l'immunité, ALCAM est aujourd'hui décrite comme une molécule co-stimulatrice, impliquée dans la formation et la stabilisation de la synapse immunologique entre cellule présentatrice d'antigène et lymphocyte T (Hassan et al., 2004; Zimmerman et al., 2006).

ALCAM, par ses multiples rôles et localisations, a été étudiée dans divers domaines de recherches comme l'embryologie, l'angiogenèse, l'hématopoïèse et la cancérologie. Dans le cadre de cette thèse, c'est son importance dans les mécanismes de migration des leucocytes en neuroinflammation et plus particulièrement dans la physiopathologie de la SEP qui est notre centre d'intérêt. Il n'en est pas moins qu'ALCAM est une molécule aux multiples facettes quant aux types cellulaires qui l'expriment, aux tissus dans lesquels elle est exprimée et à ses fonctions.

4.1.3 Implication d'ALCAM dans la SEP

ALCAM fut au cœur de nombreuses recherches depuis sa découverte. Son profil d'expression est fortement étudié dans de nombreux types de cancers, où elle semble jouer un rôle dans la propagation des tumeurs et est souvent associée à un mauvais pronostic (corrélation positive ou négative selon les cancers), par exemple dans les mélanomes (Weidle et al., 2010). La quantité de publication à la recherche des mots clefs **ALCAM** et **cancer** dans PubMed révèle l'étendue de ces recherches (350 résultats en date du 30 mars 2022) par rapport à celles effectuées sur la neuroinflammation et la SEP où respectivement 11 et 21 publications sont disponibles lorsque recherchés en combinaison avec ALCAM.

L'implication d'ALCAM en SEP est plus récente car ce n'est qu'en 2013 qu'elle fut identifiée, avec son ligand CD6, comme facteurs de risque associés à la maladie (De Jager et al., 2009; Wagner et al., 2014; Wagner et al., 2013). Cela dit, depuis 2008 les recherches de notre laboratoire et d'autres ont révélé l'implication multifactorielle d'ALCAM en SEP et dans la neuroinflammation. Elle est impliquée, par son interaction avec CD6, dans la prolifération et l'activation des lymphocytes T CD4⁺ en SEP (Kofler et al., 2011). D'un autre côté, ALCAM joue un rôle dans la transmigration de leucocytes potentiellement encéphalitogéniques vers le SNC.

En premier lieu, ALCAM est exprimée par les cellules endothéliales des barrières du SNC *in vitro* et *in situ* (Cayrol et al., 2008; Lyck et al., 2017). Lorsque mises en culture avec de l'IL-1 β , du TNF- α et/ou de l'IFN- γ , les cellules endothéliales de la barrière hémocéphalique alors inflammées surexpriment ALCAM. Et de façon intéressante, ALCAM est plus exprimée par les cellules endothéliales de la barrière hémoméningée que de la barrière hémocéphalique et ceci, même à l'état basal. *In situ*, son expression est augmentée au niveau des vaisseaux sanguins des lésions actives de SEP en opposition avec ceux des lésions chroniques, suggérant son rôle potentiel dans l'infiltration des cellules immunitaires pathogéniques vers le parenchyme cérébral lésionnel (Cayrol et al., 2008; Lyck et al., 2017). *In vitro*, par un système de migration à travers des cellules endothéliales humaines de la barrière hémocéphalique, Cayrol et ses collègues ont montré que le blocage d'ALCAM réduit la migration des monocytes CD14⁺, des lymphocytes T CD4⁺ et des lymphocytes B CD19⁺ (Cayrol et al., 2008). Plus précisément, ALCAM médie le roulement, l'adhérence ferme et la diapédèse des monocytes CD14⁺ sur les cellules endothéliales de la barrière hémocéphalique (Lyck et al., 2017).

Les recherches dans la souris confirmèrent le rôle d'ALCAM dans l'adhérence cellulaire et la neuroinflammation. L'administration de l'anticorps bloquant ALCAM réduit la sévérité de l'EAE-MOG₃₅₋₅₅ en réduisant la proportion et la taille des lésions démyélinisantes et le nombre de cellules CD4⁺ et Mac-1⁺ infiltrées dans les lésions (Cayrol et al., 2008). La création de souris KO pour ALCAM a permis ensuite d'en découvrir davantage sur son rôle dans le maintien de l'intégrité de la barrière hémocéphalique. En effet, ALCAM régule et maintient les jonctions serrées de la barrière. Les souris KO pour ALCAM développent une EAE (MOG₃₅₋₅₅ et rhMOG) plus sévère que leurs consœurs *wild-type* (WT) (Lecuyer et al., 2017), due à une augmentation de l'infiltration au SNC de leucocytes pro-inflammatoires (lymphocytes T_H17, T_H17.1 et macrophages F4/80⁺). Le transfert passif de cellules WT pour ALCAM dans des souris receveuses KO ALCAM souligna d'ailleurs le défaut d'intégrité de la barrière hémocéphalique comme étant cause majeure de l'aggravation de l'EAE.

4.2 DICAM

4.2.1 Structure protéique et ligands

DICAM est une protéine transmembranaire de la superfamille des Ig ayant une haute homologie avec les protéines JAM (Han et al., 2013; Jung et al., 2008; Yonezawa et al., 2003), molécules d'adhérence cellulaires. Elle est une protéine transmembranaire de type I avec deux domaines Ig de type V dans la région extracellulaire et une queue cytoplasmique de 442 acides aminés (Jung et al., 2008). Elle est aussi connue sous le nom de Limitrin, ASP3 et Mxra8 qui sont encore activement utilisés, révélant l'absence de consensus sur cette nouvelle molécule. DICAM est hautement conservée chez les vertébrés, par exemple, chez l'humain et la souris, elle a 84,2 % de similarité (Jung et al., 2008). Elle est exprimée de façon ubiquitaire dans les tissus de l'organisme et dans des lignées cellulaires de cellules endothéliales, de cellules épithéliales et de monocytes (Jung et al., 2008; Yonezawa et al., 2003). Elle est principalement localisée à la membrane des cellules qui l'exprime, mais dans certains cas, elle peut être retrouvée dans la fraction soluble du noyau, où son rôle n'est pas encore décrit. À la membrane, elle est connue pour se lier à l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ et de façon homotypique à elle-même (Jung et al., 2008). Les voies de signalisations induites par la liaison homotypique et hétérotypique de DICAM à la membrane restent à explorer. En revanche, il a été décrit que lorsque les cellules endothéliales de la veine ombilicale sont exposées *in vitro* au VEGF (de l'anglais : *vascular endothelial growth factor*), son expression est augmentée par les voies de signalisation MEK/ERK et PI3K/AKT (Han et al., 2013).

4.2.2 Fonctions

DICAM fut initialement décrite comme une molécule exprimée au niveau des pieds astrocytaires au sein du SNC (Yonezawa et al., 2003). Par sa présence au niveau de la glie limitante à proximité de la barrière hémato-encéphalique, c'est une molécule soupçonnée de jouer un rôle dans le maintien et le bon fonctionnement de celle-ci. Elle fut par la suite décrite par Jung et al., comme molécule d'adhérence cellulaire et d'interaction cellule-cellule, et renommée DICAM des suites de cette observation (Jung et al., 2008). Ces travaux mirent en évidence l'expression de DICAM au niveau des jonctions serrées, révélée par sa co-localisation avec ZO-1. DICAM fut d'ailleurs,

plus tard, démontrée comme impliquée dans les fonctions de la barrière intestinale (Han et al., 2019).

Son interaction avec $\alpha_v\beta_3$, molécule hautement étudiée, était le premier indice de l'implication de DICAM dans l'activité de nombreuses voies de signalisations. Notamment, DICAM fut rapidement étudiée dans le cadre de l'angiogenèse, où $\alpha_v\beta_3$ était déjà connue pour son rôle (Brooks et al., 1994). Présente au niveau des tissus vasculaires, DICAM fut alors décrite comme un inhibiteur de l'angiogenèse (Han et al., 2013). De plus, *in vitro*, DICAM inhibe la migration des cellules endothéliales et promeut leur apoptose (Han et al., 2013).

4.2.3 Dans la maladie

À ce jour, la majorité des études sur le rôle de DICAM dans les pathologies s'en tiennent à son rôle dans le maintien de barrières endothéliales ou épithéliales. En premier lieu, DICAM est exprimée au niveau des jonctions serrées des cellules épithéliales de la barrière muqueuse intestinale (Han et al., 2019). Elle y joue un rôle stabilisateur de jonctions serrées comme le démontrèrent les expériences publiées par Han et al., en 2019. D'abord, par l'utilisation d'un modèle animal de colite, ils démontrèrent que les souris KO pour DICAM développent une maladie plus sévère que leurs consœurs WT. Dans ce modèle animal, l'expression de DICAM augmente avec l'inflammation et diminue avec la résorption de celle-ci. De même, *in vitro*, DICAM est exprimée au niveau des jonctions serrées d'une lignée de cellules épithéliales colorectales (Caco-2) et co-localise avec ZO-1. De façon intéressante, son expression augmente lorsque ces cellules sont mises dans des conditions inflammatoires (TNF- α et IFN- γ).

D'autre part, DICAM est exprimée au niveau des pieds astrocytaires de la barrière hémencéphalique de souris dans un contexte sain (Yonezawa et al., 2003). Lorsqu'une dérégulation de la barrière hémencéphalique par blessure au froid est induite chez la souris, DICAM est fortement diminuée au niveau des lésions cérébrales (Yonezawa et al., 2003). Ceci suggère que l'expression de DICAM est réduite au moment où l'angiogenèse doit avoir lieu, après destruction de la barrière hémencéphalique.

Enfin, très récemment, une étude soutient le rôle protecteur de DICAM dans un modèle expérimental de névrite optique auto-immune (Chun et al., 2021). La névrite optique fait partie des manifestations cliniques typiques de la SEP. Cinquante pour cent des patients vont présenter ce type d'atteinte du nerf optique à un moment dans leur vie. Par ces travaux, on observe que les patients atteints de névrite optique ont une plus grande proportion de DICAM soluble dans le plasma, lorsque mesuré par ELISA (de l'anglais : *enzyme-linked immunosorbent assay*). Aussi, l'absence de DICAM dans des souris KO rend celles-ci plus susceptibles à développer une névrite optique expérimentale. Ce phénomène est lié à une augmentation de la démyélinisation observée, une augmentation de l'expression de cytokines pro-inflammatoires TNF- α , IL-1 β et IFN- γ et de chimiokines CCL3 and CCL5, et une plus grande gliose dans le nerf optique après induction de la névrite optique expérimentale. Ces résultats suggèrent que DICAM joue un rôle protecteur dans la propagation de la neuroinflammation par son rôle dans le maintien de l'intégrité de la barrière hémato-encéphalique et ainsi la restriction de l'infiltration de cellules immunitaires au site de l'inflammation. L'augmentation de la forme soluble de DICAM dans le plasma des patients atteints de névrite optique pourrait donc, d'après les auteurs, être le reflet d'une perte de fonction de DICAM à la barrière hémato-encéphalique suite à son clivage par des protéases.

À ce jour, les résultats sur l'implication de DICAM dans les pathologies restent très peu nombreux. C'est une nouvelle molécule dans l'histoire de la recherche et elle sera probablement le fruit de nombreuses publications scientifiques à venir par la variété de mécanismes dans lesquels elle semble impliquée.

Énoncé clair du problème

Les progrès biotechnologiques des 20 dernières années ont permis de grandes avancées dans la compréhension des mécanismes physiopathologiques qui régissent la SEP. On sait aujourd'hui que l'infiltration des cellules immunitaires dans le SNC est un événement inhérent à la formation des lésions cérébrales. Ces cellules potentiellement pathogéniques, dont font partie les lymphocytes T et B, perpétuent l'inflammation au sein des lésions du SNC. Pour migrer vers le tissu cérébral, les étapes de la diapédèse à travers les barrières du SNC sont multiples et

complexes. Parmi celles-ci, l'adhérence, l'arrêt et le roulement des cellules immunitaires sur les cellules endothéliales sont médiés par diverses molécules dont font partie les molécules d'adhérence. L'une d'entre elles, la molécule d'adhérence VLA-4 est une cible thérapeutique ayant été montrée fructueuse pour traiter la SEP (Polman et al., 2006; Rudick et al., 2006). Historiquement, le développement de cette thérapie reposait sur le défi de réduire l'infiltration de cellules immunitaires pathogéniques vers le SNC. Le natalizumab, un anticorps ciblant et neutralisant la molécule VLA-4, permet de réduire cette infiltration et de diminuer de plus de 90 % l'apparition de nouvelles lésions IRM chez les patients atteints de SEP cyclique (Polman et al., 2006; Rudick et al., 2006). Bien qu'il soit un traitement efficace, la prise de natalizumab s'accompagne de risques d'effets secondaires graves. VLA-4 étant une molécule exprimée par une grande variété de cellules immunitaires, le natalizumab entraîne une baisse de l'immunosurveillance au sein du SNC. Ceci provoque une augmentation de l'apparition d'infections opportunistes du SNC pouvant être fatales (Bloomgren et al., 2012). Ainsi, réduire spécifiquement la migration des cellules immunitaires encéphalitogéniques tout en laissant les cellules responsables de l'immunosurveillance atteindre le SNC des patients atteints de SEP, est le défi que cette thèse tente de relever.

Hypothèse générale à tester

L'hypothèse générale de cette thèse propose que certaines molécules d'adhérence soient exprimées préférentiellement par des sous-populations de cellules immunitaires encéphalitogéniques et régulent de façon spécifique leur migration vers le SNC en SEP. De telles molécules pourraient représenter des cibles thérapeutiques d'intérêt pour le traitement de la SEP, afin de restreindre l'infiltration au SNC des cellules pro-inflammatoires sans compromettre l'immunosurveillance.

La première hypothèse spécifique de ce projet est que la molécule d'adhérence ALCAM régule le passage des lymphocytes B pro-inflammatoires à travers les barrières du SNC en SEP.

La deuxième hypothèse spécifique de ce projet est que la molécule d'adhérence DICAM joue un rôle dans la migration des lymphocytes T_H17 à travers la barrière hémato-encéphalique dans le cadre de la SEP.

Objectifs spécifiques

Les objectifs de cette thèse de doctorat se découpent en deux parties principales concernant la caractérisation de deux molécules d'adhérences distinctes dans des contextes cellulaires différents.

Pour commencer, l'objectif est de caractériser la population de lymphocyte B exprimant la molécule d'adhérence ALCAM. Ensuite, on cherche à décrire le rôle d'ALCAM dans la transmigration des lymphocytes B à travers les barrières du SNC grâce à des expériences *in vitro* et *in vivo* dans le modèle de souris EAE. Enfin, l'importance d'ALCAM dans le cadre de la SEP est caractérisée en étudiant son profil d'expression dans le sang périphérique et les lésions du SNC de patients atteints de la SEP.

La seconde partie de cette thèse porte sur une seconde molécule d'adhérence : DICAM. L'objectif est en premier lieu de déterminer le profil d'expression de cette molécule par les lymphocytes T CD4⁺ et plus spécifiquement les sous-populations de cellules T auxiliaires. De la même manière que pour ALCAM, on décrit le profil d'expression de DICAM dans le contexte de la maladie de la SEP, dans le sang périphérique de patients ainsi que dans les lésions du SNC. Ensuite, son rôle dans la transmigration des lymphocytes T CD4⁺ à travers les barrières du SNC est caractérisé *in vitro* et *in vivo* dans des souris EAE.

Chapitre 2 – Manuscrit 1

Titre : Activated leukocyte cell adhesion molecule regulates B lymphocyte migration across central nervous system barriers

Journal : Sci Transl Med. 2019 Nov 13;11(518):eaaw0475.

Auteurs : Laure Michel*, Camille Grasmuck*, Marc Charabati, Marc-André Lécuyer, Stephanie Zandee, Tessa Dhaeze, Jorge I. Alvarez, Rui Li, Sandra Larouche, Lyne Bourbonnière, Robert Moumdjian, Alain Bouthillier, Boaz Lahav, Pierre Duquette, Amit Bar-Or, Jennifer L. Gommerman, Evelyn Peelen, Alexandre Prat

* Laure Michel et Camille Grasmuck ont contribuées également au travail

Contributions :

En tant que contributrice principale, j'ai participé de façon majeure aux étapes clés de la publication de cette étude. LM et AP ont conçu l'étude. LM et moi-même avons effectué la grande majorité des expériences présentées dans ce manuscrit. LM, AP, MC et moi-même avons interprété les résultats, écrit le manuscrit et mis en forme les figures. M-AL, SZ, TD, JIA, SL, RL, LB, JIA et EP ont participé à la complétion des expériences. RM, AB, BL et PD furent impliqués dans la collecte d'échantillons humains et la caractérisation clinique des patients. SL a maintenu les colonies de souris utilisées pour les expériences. SZ, TD, EP et JIA ont contribués à l'analyse des expériences. JLG, AB-O et EP ont relu et amélioré le manuscrit.

Activated leukocyte cell adhesion molecule regulates B lymphocyte migration across central nervous system barriers

Laure Michel^{1,2*†‡}, Camille Grasmuck^{1,2*}, Marc Charabati^{1,2}, Marc-André Lécuyer^{1,2}, Stephanie Zandee^{1,2}, Tessa Dhaeze^{1,2}, Jorge I. Alvarez^{1,2§}, Rui Li³, Sandra Larouche^{1,2}, Lyne Bourbonnière^{1,2}, Robert Moumdjian⁴, Alain Bouthillier⁴, Boaz Lahav^{1,2}, Pierre Duquette^{1,2}, Amit Bar-Or³, Jennifer L. Gommerman⁵, Evelyn Peelen^{1,2}, Alexandre Prat^{1,2||}

¹Department of Neuroscience, Faculty of Medicine, Université de Montréal, Montréal, QC Canada. ²Neuroimmunology Unit, Centre de recherche du CHUM (CRCHUM), Montréal, QC H2X 0A9, Canada. ³Center for Neuroinflammation and Experimental Therapeutics and Department of Neurology, Perelman School of Medicine, University of Pennsylvania, Philadelphia, PA 19104, USA. ⁴Division of Neurosurgery, CHUM, Montréal, QC H2X 3E4, Canada. ⁵Department of Immunology, University of Toronto, Toronto, ON M5S 1A8, Canada.

*These authors contributed equally to this work.

†Present address: Department of Neurology, CIC P14-14 INSERM, CHU Pontchaillou, 35033 Rennes Cedex, France.

‡Present address: Université de Rennes, Établissement Français du Sang (EFS) de Bretagne, Inserm, MICMAC-UMR_S1236, Rennes, France.

§Present address: Department of Pathobiology, University of Pennsylvania, Philadelphia, PA 19104, USA.

||Corresponding author. Email: a.prat@umontreal.ca

Abstract

The presence of B lymphocyte–associated oligoclonal immunoglobulins in the cerebrospinal fluid is a classic hallmark of multiple sclerosis (MS). The clinical efficacy of anti-CD20 therapies supports a major role for B lymphocytes in MS development. Although activated oligoclonal populations of pathogenic B lymphocytes are able to traffic between the peripheral circulation and the central nervous system (CNS) in patients with MS, molecular players involved in this migration have not yet been elucidated. In this study, we demonstrated that activated leukocyte cell adhesion molecule (ALCAM/CD166) identifies subsets of proinflammatory B lymphocytes and drives their transmigration across different CNS barriers in mouse and human. We also showcased that blocking ALCAM alleviated disease severity in animals affected by a B cell–dependent form of experimental autoimmune encephalomyelitis. Last, we determined that the proportion of ALCAM⁺ B lymphocytes was increased in the peripheral blood and within brain lesions of patients with MS. Our findings indicate that restricting access to the CNS by targeting ALCAM on pathogenic B lymphocytes might represent a promising strategy for the development of next-generation B lymphocyte-targeting therapies for the treatment of MS.

Introduction

Multiple sclerosis (MS) is a chronic autoimmune disorder of the central nervous system (CNS) and the leading cause of nontraumatic neurological handicap in young adults (1). Although proinflammatory and encephalitogenic T lymphocytes are classically thought to drive the development of MS, multiple lines of evidence have recently pinpointed the key contribution of also B lymphocytes in its pathogenesis. The administration of B lymphocyte–depleting therapies, in the form of anti-CD20 monoclonal antibodies (mAbs), was demonstrated to decrease the clinical and radiological activity of the disease in patients with MS affected by both relapsing-remitting (RR) and progressive MS (2–6). The therapeutic benefit of the B lymphocyte-depleting therapies is thought to result from the elimination of B lymphocyte subsets with pathogenic properties from circulation (7–9). In the peripheral blood of patients with MS, pathogenic subsets of B lymphocytes were recently identified and characterized as proinflammatory

granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)-secreting (10) and tumor necrosis factor- α (TNF α)- secreting B lymphocytes (11, 12).

Beyond the clinical evidence implicating B lymphocytes in MS pathogenesis, B lymphocytes were demonstrated to account for up to 10% of CNS-infiltrating leukocytes (13). Several studies have reported the presence of ectopic B lymphocyte-enriched follicles and antibody deposits in the meninges and cortex of MS-affected brains, respectively, and correlated their presence with disease severity (14–16). In parallel, several groups have indicated that B lymphocytes derived from human peripheral blood and draining cervical lymph nodes share antigen specificity with intrathecal B lymphocytes (17, 18). Collectively, these data point to the presence of a blood-CNS axis that permits B lymphocyte infiltration into the CNS in MS. The physiological routes and the molecular players involved in this process are, however, unknown.

During neuroinflammation, pathogenic leukocytes in the peripheral blood use different trafficking molecules to cross the blood-brain barrier (BBB) (19–28) or the blood-meningeal barrier (BMB) (29–32). We have previously demonstrated that activated leukocyte cell adhesion molecule (ALCAM)/CD166 is a cell adhesion molecule that promotes the diapedesis of monocytes and CD4⁺ T lymphocytes across the BBB (21, 27). Traditionally, ALCAM was known as a costimulatory molecule involved in the formation and stabilization of immune synapse between leukocytes and antigen-presenting cells (33–36). It can either bind to its ligand CD6 or engage in homotypic ALCAM-ALCAM interactions (37, 38). Following up on our previous observation that *ex vivo* B lymphocytes express ALCAM (21), we sought to investigate its role in mediating their trafficking into the CNS in MS.

Here, we demonstrated that ALCAM is highly expressed on human B lymphocytes with memory, effector, and proinflammatory phenotypes. Using a B lymphocyte-dependent mouse model of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) induced via immunization with recombinant human myelin oligodendrocyte glycoprotein (rhMOG), we demonstrated that the presence of ALCAM⁺ B lymphocytes in the CNS correlates with disease development. *In vitro*, we demonstrated that ALCAM promotes the interaction of B lymphocytes with mouse BBB endothelial cells (ECs). *In vivo*, we found that blocking ALCAM impairs the trafficking of B

lymphocytes into the CNS, particularly through the meningeal blood vessels, and reduces EAE disease severity. Corroborating our data in mice, we showed that ALCAM mediates the migration of B lymphocytes across primary cultures of human BBB-ECs and BMB-ECs. In patients with MS, not only is the expression of ALCAM on B lymphocytes increased in the peripheral blood, but it is also up-regulated on lesion-infiltrating B lymphocytes harvested from freshly autopsied MS brain. Together, our data identified ALCAM as a valuable therapeutic target for treating B lymphocyte-dependent CNS inflammatory disorders.

Results

ALCAM is primarily expressed on effector memory B lymphocytes

Having previously detected ALCAM on *ex vivo* B lymphocytes (21), we sought to define its expression pattern on different B lymphocyte subsets. Flow cytometry analysis of circulating B lymphocytes isolated from healthy donors revealed that ALCAM is preferentially expressed on CD19⁺CD24^{high}CD38^{neg} and CD19⁺CD27⁺ memory B lymphocytes, while being almost absent on CD19⁺CD24^{dim}CD38^{dim} naïve and CD19⁺CD24^{high}CD38^{high} transitional B lymphocytes (Fig. 1A). Moreover, the expression of ALCAM was increased on activated CD19⁺ B lymphocytes defined using the activation markers CD86, CD80, and CD95, and as compared with nonactivated B lymphocytes (Fig. 1A). In corroboration with these results, flow cytometry analysis of ALCAM⁺ versus ALCAM^{neg} sorted *ex vivo* B lymphocytes revealed that the expression of ALCAM is indeed tightly associated with memory B lymphocyte phenotypes shown as CD24^{high}CD38^{neg} and CD27⁺, and with activated B lymphocyte phenotypes shown as CD80⁺ and CD95⁺ cells (Fig. 1B). Compared with ALCAM^{neg} B lymphocytes, ALCAM⁺ B lymphocytes also expressed higher amounts of the adhesion molecules VLA-4 and LFA-1 (Fig. 1, C and D) and the proinflammatory cytokines [TNF α , GM-CSF, and interleukin-6 (IL-6)] (Fig. 1, E to H), which are all molecules implicated in MS pathogenesis (9–12, 39). To explore whether B lymphocyte activation affects the expression of ALCAM, we stimulated *ex vivo* B lymphocytes with CD40L, recombinant human IL-4, and anti-immunoglobulin M for B cell receptor (BCR)-dependent activation or CpG for Toll-like receptor

(TLR)-dependent activation for 48 hours and subsequently quantified the expression of ALCAM via flow cytometry and immunofluorescence microscopy. Both techniques revealed that ALCAM expression is up-regulated upon both BCR- and TLR-dependent B lymphocyte activation (Fig. 1, I to M, and fig. S1). Together, our observations demonstrate that ALCAM defines a subset of activated memory B lymphocytes with a proinflammatory profile that could be highly relevant for neuroinflammation.

ALCAM on murine B lymphocytes correlates with EAE severity

In the meninges of patients with MS, the presence of B lymphocytes was demonstrated to correlate with the magnitude of neuroinflammation and with the clinical prognosis of the patient (15, 40, 41). To determine whether the expression of ALCAM on B lymphocytes was also associated with these parameters, we resorted to a B lymphocyte-dependent EAE model of MS, induced via immunization with rhMOG (42). Specifically, we used flow cytometry to analyze B lymphocytes isolated from secondary lymphoid organs and CNS tissue, before and after immunization at time points representing the different stages of B lymphocyte-dependent rhMOG-EAE (Fig. 2A) and MOG₃₅₋₅₅-EAE (fig. S2). In both the spleen and inguinal lymph nodes, the frequency of ALCAM⁺ CD19⁺ B lymphocytes was substantially up-regulated just before onset of disease, reaching over 80% at peak of disease in rhMOG-EAE and in MOG₃₅₋₅₅-EAE and remaining elevated in the chronic phase of the disease, compared with naïve animals (Fig. 2, B and C, and fig. S2, A and B). In the CNS, ALCAM⁺ B lymphocytes were detected in all compartments analyzed (spinal cord, brain, and meninges) but were preferentially localized in meningeal infiltrates (fig. S3). Their frequency also closely followed the disease course, reaching over 80% at peak of disease in both EAE models (Fig. 2, D and E, and fig. S2C). In comparison, the CNS of naïve mice contained just over 3000 B lymphocytes, of which only ~20% expressed ALCAM (fig. S4). No differences were observed in their coexpression of other adhesion molecules (fig. S5). Our data demonstrate that ALCAM on B lymphocytes is tightly associated with rhMOG-EAE disease and may thus be actively contributing to the development of neuroinflammation.

ALCAM promotes the extravasation of murine B lymphocytes across BBB endothelium

Because ALCAM was previously shown to promote the migration of monocytes and CD4⁺ T lymphocytes across the BBB (21, 27), we hypothesized that ALCAM could also drive the trafficking of B lymphocytes into the CNS. To address this hypothesis, we investigated whether ALCAM plays a role in the early stages of B lymphocyte extravasation by conducting *in vitro* dynamic flow assays using ALCAM knockout (KO) versus wild-type (WT) B lymphocytes isolated from a previously characterized C57BL/6 mouse model (43). In the absence of ALCAM, the velocity of B lymphocytes flowing over monolayers of primary cultures of BBB-ECs was greater, indicating that ALCAM is involved in the rolling of B lymphocytes on BBB endothelium (Fig. 3, A and B). Accordingly, the absence of ALCAM also resulted in a reduced number of B lymphocytes arrested on the BBB endothelium (Fig. 3C). An in-depth analysis of the interaction between ALCAM on B lymphocytes and BBB endothelium over time revealed that ALCAM participates in rolling and adhesion of B lymphocytes on BBB-ECs beginning from as early as 10 min after beginning of flow and persists for over 30 min without any noteworthy rescue by compensatory mechanisms (Fig. 3, D and E). To evaluate whether ALCAM is also involved in the diapedesis of murine B lymphocytes across BBB endothelium, we conducted *in vitro* migration assays where we observed that its genetic ablation on B lymphocytes reduced the number of B lymphocytes that successfully transmigrated across monolayers of primary cultures of murine WT BBB-ECs (Fig. 3F). These observations demonstrate that ALCAM on B lymphocytes partakes in their early interaction with BBB endothelium as well as in their actual transmigration.

Blocking ALCAM hinders EAE progression and reduces the trafficking of B lymphocyte into the CNS

With our aforementioned data demonstrating that ALCAM is a potential contributor to the migration of B lymphocytes and to the development of neuroinflammation, we sought to define its role *in vivo* in B lymphocyte-dependent EAE. Analysis of CNS-infiltrating B lymphocytes in ALCAM KO versus WT mice immunized with rhMOG revealed a diminished presence of B lymphocytes in the CNS of ALCAM KO animals at the chronic phase of EAE (Fig. 4A), despite

observing a similar number of total CNS-infiltrating leukocytes (fig. S6) and no abnormality in the peripheral B lymphocyte compartment of ALCAM KO versus WT animals (fig. S7). To determine whether ALCAM is a potential therapeutic target for treating neuroinflammation, we administered anti-ALCAM mAb or isotype control antibodies into mice immunized with rhMOG. Although blocking ALCAM did not affect disease onset, it impaired EAE progression from day 19 onward (Fig. 4B). Examination of CNS-infiltrating leukocytes via flow cytometry indicated that the reduced EAE severity mainly coincided with diminished B lymphocyte infiltration at the onset of the disease (days 12 to 13) (Fig. 4C).

In contrast, the numbers of microglia, CD45⁺ cells, T cells, and CD3^{neg}B220^{neg} cells all remained unchanged within the CNS (fig. S8) when blocking ALCAM in this B lymphocyte-dependent EAE model. Because B lymphocytes were demonstrated to preferentially accumulate within the leptomeninges in MS (15, 30, 40, 41, 44, 45), we sought to investigate whether ALCAM promotes this localized B lymphocyte infiltration in rhMOG-EAE. Intravital two-photon live imaging of the leptomeningeal vessels in the spinal cords of immunized animals revealed a >3-fold decrease in the number of infiltrating B lymphocytes at both the onset and chronic phase of the disease, respectively, upon ALCAM blockade (Fig. 4, D and E). Together, our data demonstrate that blocking ALCAM limits the extent of disability in the chronic phase and impairs the trafficking of B lymphocytes into the CNS, which occurs, at least partially, through the meningeal vascular structures.

ALCAM mediates B lymphocyte migration across human CNS barriers

To establish whether ALCAM expression on human B lymphocytes serves the same function as in mouse, we investigated the migration of B lymphocytes across monolayers of primary cultures of human BBB-ECs and BMB-ECs using a modified Boyden chamber, as previously described (23, 25–27, 46). The migration of B lymphocytes was twofold greater across BMB-ECs than across the BBB-ECs, suggesting that the BMB is a preferred access point to the CNS for B lymphocyte in human (Fig. 5A). Flow cytometric analysis of B lymphocytes in the lower versus upper chambers (migrated versus nonmigrated cells, respectively) demonstrated that ALCAM is in fact preferentially up-regulated on B lymphocytes that migrated across both barriers (Fig. 5, B and C). To investigate

whether ALCAM plays an active role in human B lymphocyte transmigration, we repeated the migration assays, introducing an anti-ALCAM blocking mAb versus isotype control into the Boyden chamber system and comparing it with other blocking antibodies that have a known effect on the trafficking of B lymphocytes (47). Treatment with an anti-ALCAM blocking mAb reduced the migration of B lymphocytes across BMB-ECs and BBB-ECs comparable to anti-intercellular adhesion molecule-1 (anti-ICAM-1) mAb treatment, but slightly less than anti-VLA-4 mAb (Fig. 5, D and E, and fig. S9, A and B). To explore the role of ALCAM in the early stages of human B lymphocyte extravasation across CNS barriers, we also conducted *in vitro* dynamic flow assays using pretreated B lymphocytes with either anti-ALCAM blocking mAb or isotype control. Blocking ALCAM reduced B lymphocyte adhesion to the BBB-EC monolayer (fig. S10). These results demonstrate that human B lymphocytes migrate across both the BBB and BMB, with a preference for the BMB, and that ALCAM participates in the trafficking across both barriers.

Peripheral and brain-infiltrating B lymphocytes up-regulate ALCAM in patients with MS

B lymphocytes have previously been detected within MS lesions (13, 40, 48, 49) and are believed to actively contribute to disease development. To examine whether ALCAM⁺ B lymphocytes are preferentially elevated in the periphery and/or brain lesions of patients with MS, we investigated their presence in the peripheral blood and within the CNS of patients with MS. First, we compared the expression of ALCAM on *ex vivo* B lymphocytes isolated from the blood of patients with MS versus healthy controls. The percentage of ALCAM expression on B lymphocytes was found to be increased in untreated patients, in stable patients with relapsing-remitting MS (RRMS), and in patients with secondary progressive MS (SPMS), compared with healthy controls (Fig. 6, A and B). In patients with active relapse (AR), the amount of ALCAM on the individual B lymphocytes was also observed as up-regulated (fig. S9C). ALCAM⁺ B lymphocytes from the blood of untreated patients with RRMS were also coexpressing adhesion molecules VLA-4, ICAM-1, and CD11a (fig. S11). Second, we quantified and validated the presence of ALCAM⁺ B lymphocytes in brain lesions of patients with MS by both flow cytometry and immunohistochemical staining, respectively. For flow cytometry, we generated a protocol for isolating and analyzing immune cells infiltrating active and chronic inactive lesions (as defined by luxol fast blue hematoxylin eosin staining and

oil red O staining) extracted from postmortem MS brains within hours of the patient's death. Overall, we analyzed two cortical lesions and three white matter lesions (active and chronic inactive) from one patient with MS. Among all examined lesions, cortical lesions contained the highest number of CD19⁺ B lymphocytes (Fig. 6C). The expression of ALCAM on B lymphocytes was higher in all types of lesions than on B lymphocytes derived from the peripheral blood of patients with MS (dashed red line) and was particularly high in cortical lesions (Fig. 6D). Last, using confocal microscopy imaging of frozen human MS CNS samples, we confirmed the presence of ALCAM⁺ B lymphocytes in meningeal (Fig. 6, E and F, and fig. S12, B and C) and parenchymal infiltrates (Fig. 6, G to K, and fig. S12A), most of them being CD3 negative (fig. S12). Additional histological costaining showed coexpression of ALCAM with other adhesion molecules (VLA-4 and CD11a) on infiltrating B lymphocytes (fig. S13). To conclude, these findings support the important role of ALCAM in MS pathogenesis and indicate a role for ALCAM in meningeal infiltration of B lymphocytes and in cortical lesion formation.

Discussion

B lymphocyte-depleting therapies provide strong evidence that B lymphocytes are involved in MS disease activity. B lymphocytes are found in the inflamed meninges of patients with MS, and this inflammation is associated with adjacent cortical demyelination and neurodegenerative changes in progressive forms of the disease and also early after diagnosis, suggesting a pathogenic role for meningeal B cells (14, 15, 30, 41, 44, 45, 50). Specific subsets of regulatory B lymphocytes were shown to be able to infiltrate the CNS to counteract neuroinflammation (51–53), but their presence was reported to be reduced in patients with MS (54). The proposed mechanisms by which B lymphocytes influence MS pathogenesis and progression include antigen presentation (10, 55, 56), autoantibody production (57, 58), and/or cytokine secretion (10, 51–53). However, the mechanisms, molecular players, and cellular signals required for B lymphocytes to infiltrate the CNS remain unclear (31).

In the present manuscript, we demonstrate that ALCAM expression is greater on proinflammatory memory and mature naïve B lymphocytes, is rapidly upregulated upon both BCR- and TLR-dependent B lymphocyte activation, and is increased on B lymphocytes derived from patients

with MS. With GM-CSF believed to be highly implicated in MS pathogenesis (59–64) and GM-CSF⁺ B lymphocyte amounts reported to be increased in patients with MS (10), our current data collectively demonstrate that B cell-intrinsic ALCAM expression is likely to be involved in one or more stages of MS pathogenesis. In support of this notion, allele polymorphisms in both ALCAM and its ligand CD6 have been found associated with an increased risk of developing MS (65–68). However, because our cohorts do not feature patients with other neurological and/or inflammatory diseases, we cannot determine whether the pathological regulation of ALCAM extends to other diseases as well. This will need to be addressed on a per-disease basis.

We and others have previously demonstrated that ALCAM is involved in the CNS recruitment of both monocytes and CD4⁺ T lymphocytes (21, 28). At the same time, we recently showed that ALCAM also plays a major role in maintaining BBB integrity (27). The dual functions of ALCAM may be attributed to its cellular localization as a cell surface adhesion molecule or due to its association with junctional proteins. Here, we focus on the function of ALCAM as an extracellular adhesion molecule and delineate its role in the migration of B lymphocytes across different CNS barriers. First, we provide evidence that human B lymphocytes migrate in greater numbers across meningeal vascular structures than across parenchymal microvessels, which might explain the relative paucity of B lymphocytes in white matter lesions and the presence of B lymphocyte aggregates in meningeal structures and in cortical lesions (14, 15). Second, we show that pharmacologically blocking ALCAM or neutralizing its expression by genetic knockout impairs the capacity of B lymphocytes to roll over, adhere to, and transmigrate across CNS ECs. Unlike this multifunctional role, ALCAM plays a rather specific role in mediating CD4⁺ T lymphocyte extravasation; it only participates in their transmigration across BBB endothelium but plays no role in also mediating their initial interaction with the BBB (21, 28). Last, we demonstrate that the frequency of ALCAM⁺ B lymphocytes within the CNS increases presymptomatically and correlates with EAE disease severity and that targeting ALCAM *in vivo* reduces the number of infiltrating B lymphocytes within the meningeal structures of EAE animals while also alleviating EAE symptoms in the chronic phase of the disease. The absence of beneficial effect at earlier disease time points can simply reflect our anti-ALCAM treatment window, starting presymptomatically when ALCAM⁺ B lymphocytes might have already begun invading the CNS. Together, our findings establish

ALCAM as a major cell adhesion molecule involved in B lymphocyte extravasation into the CNS. They do not completely rule out its implication in promoting B lymphocyte trafficking under steady state for immunosurveillance but strongly demonstrate its pathological contribution to CNS inflammation. Our different *in vitro* and *in vivo* experimental approaches were carefully selected to validate the precise role of ALCAM on B lymphocyte and minimize, if not eliminate, any caveat that may stem from compensatory mechanisms in genetically KO animals or from targeting ALCAM⁺ cellular populations beside B lymphocytes.

On the molecular level, ALCAM was initially described as a ligand for CD6, a costimulatory molecule involved in the formation of immune synapses between T lymphocytes and antigen-presenting cells (33–36). ALCAM can also form homotypic ALCAM-ALCAM interactions, although ALCAM-CD6 binding was later found to be the stronger of the two (37, 38). More recently, the list of ALCAM's binding partners was expanded to include at least eight other molecules (27, 69, 70), suggesting that ALCAM may be more promiscuous than initially thought. The cell membrane microdomains known as lipid rafts, where we initially identified ALCAM as a cell adhesion molecule (21) and which are implicated in many physiological processes including leukocyte extravasation, are known to also harbor many important cell adhesion molecules such as E-selectin, ICAM-1, and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) (71, 72). It is therefore very plausible that ALCAM promotes leukocyte extravasation while cooperating through direct or indirect interactions with other molecules and structures involved in cell adhesion and migration. Although we did not directly address this hypothesis in the present manuscript, our current observations showing that ALCAM⁺ B lymphocytes feature high coexpression of both ICAM-1 and VLA-4 indeed support it and point to the need to potentially decipher immune migration into the CNS through a wider lens that includes the collective and perhaps synergetic function of major adhesion molecules.

The central disadvantages of currently used therapeutic strategies in MS reside in their safety profile. Highly effective therapies, whether immune cell-depleting agents (rituximab, ocrelizumab, and alemtuzumab) or immune cell migration blockers (natalizumab), carry important risk of developing opportunistic infections, cancer, or autoimmune disorders (73, 74). This is probably in direct relation with their potential to cause profound immunosuppression due

to their unspecific targeting of a vast array of immune cell populations. Our goal is to define a cell adhesion molecule signature profile to specifically define pathogenic immune cell subtypes and thus to specifically deplete them from the circulation or to prevent them from migrating into the target organs. Even if we did not directly investigate in this study the health consequences of targeting ALCAM⁺ B lymphocytes in neuroinflammation, our data provide conclusive evidence that ALCAM is a key mediator of B lymphocyte adhesion and migration across CNS vascular barriers, and more so across the BMB. We postulate that a pharmacological neutralization of ALCAM could prevent, or at least delay, cortical pathology and disease progression in humans affected with MS.

Materials and methods

Study design

This study investigated the role of the adhesion molecule ALCAM in B lymphocyte migration across CNS barriers. This was evaluated by flow cytometry and confocal microscopy using peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) and brain-infiltrating immune cells from patients with MS and healthy controls. Primary cultures of human brain and meningeal ECs were used to explore *in vitro* the role of ALCAM in B lymphocyte migration, using >3 biological repeats and conducted in >3 independent experiments. EAE mouse models were used for *in vivo* experiments, using >5 animals per condition treated and scored by an investigator blinded to the treatment group and conducted in >3 independent experiments. Clinical scores were evaluated by a blinded investigator. Primary data are reported in data file S1.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using Prism (GraphPad Software, San Diego, CA), and results are presented as means ± SEM. Student's *t* test, one-way analysis of variance (ANOVA) with Bonferroni's or Dunnett's post hoc test, and two-way ANOVA with Bonferroni's post hoc test were performed when appropriate. Only *P* values <0.05 were considered statistically significant.

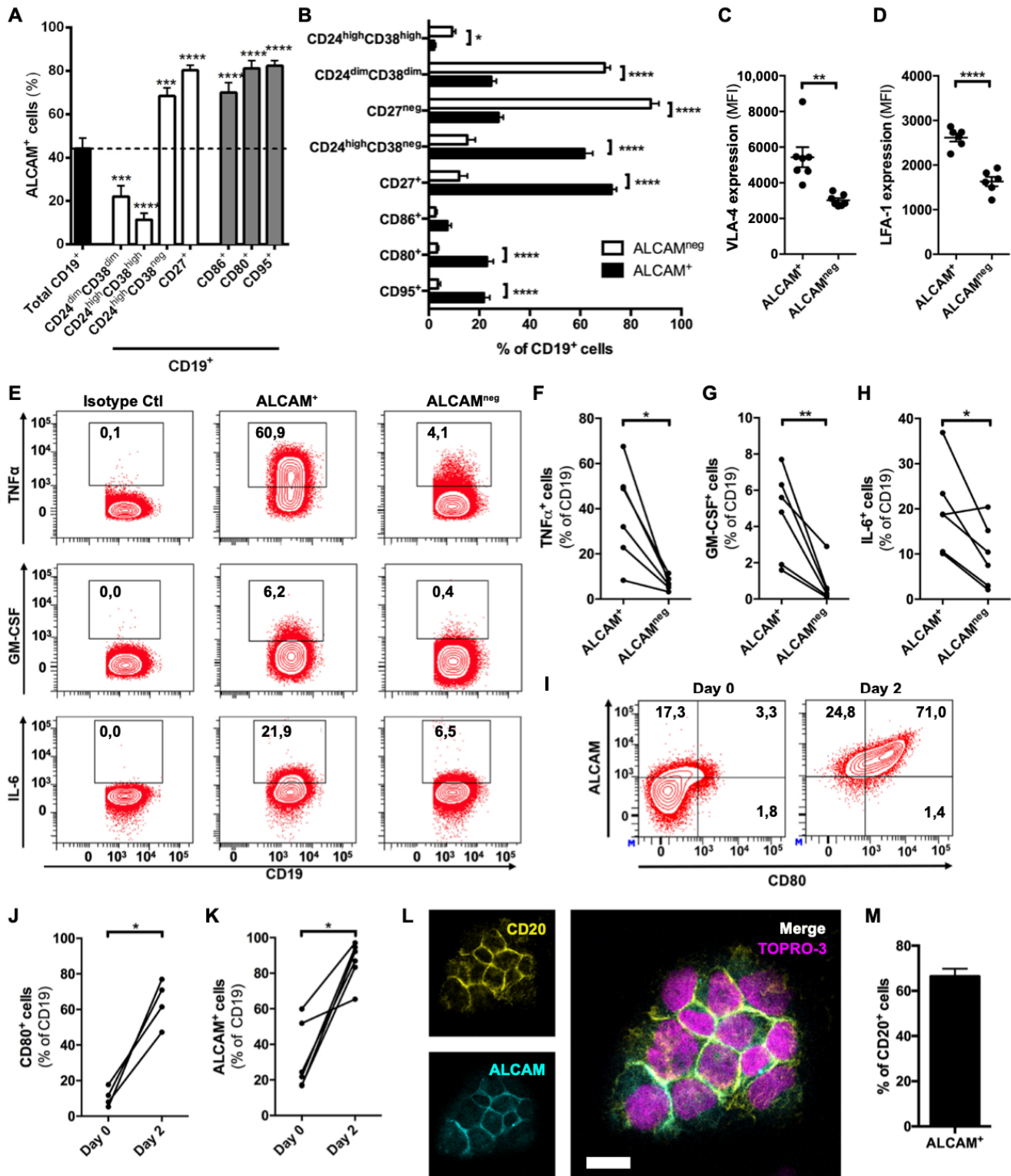


Fig. 1. ALCAM identifies populations of pathogenic human B lymphocytes.

Fig. 1. ALCAM identifies populations of pathogenic human B lymphocytes. (A to H) Characterization of *ex vivo* B lymphocytes from the peripheral blood of healthy donors by flow cytometry. (A) Frequencies (mean \pm SEM) of ALCAM expression on total CD19⁺, CD24^{dim}CD38^{dim} (naïve), CD24^{high}CD38^{high} (transitional), CD24^{high}CD38^{neg} and CD27⁺ (memory), and CD86⁺, CD80⁺, and CD95⁺ (activated) CD19⁺ B lymphocytes; $n \geq 12$. *** $P > 0.001$, **** $P > 0.0001$ by one-way ANOVA with Bonferroni's post hoc test. (B) Frequencies (mean \pm SEM) of the expression of the same markers as in (A) on ALCAM⁺ versus ALCAM^{neg} CD19⁺ B lymphocytes; $n \geq 12$. * $P > 0.05$, **** $P > 0.0001$ by two-way ANOVA with Bonferroni's post hoc test. (C and D) Fluorescence intensity (mean \pm SEM) of VLA-4 and LFA-1 expression in ALCAM⁺ versus ALCAM^{neg} B lymphocytes; $n = 7$. ** $P > 0.01$, **** $P > 0.0001$ by paired t test. MFI, mean fluorescence intensity. (E) Representative dot plots and (F to H) quantification graphs of the expression of intracellular TNF α , GM-CSF, and IL-6 in ALCAM⁺ versus ALCAM^{neg} B lymphocytes; $n = 6$. * $P > 0.05$, ** $P > 0.01$ by paired t test. (I to K) Analysis of ALCAM and CD80 expression on B lymphocytes from the peripheral blood of healthy donors before (day 0, *ex vivo*) versus after (day 2) *in vitro* activation by flow cytometry; $n \geq 4$. * $P < 0.05$ by paired t test. (L and M) Representative images and frequencies (mean \pm SEM) of activated B lymphocytes immunostained for CD20 (yellow), ALCAM (cyan), and nuclei (TOPRO-3; magenta) and acquired by confocal microscopy. Scale bar, 10 μm ; data shown are representative of $n = 3$.

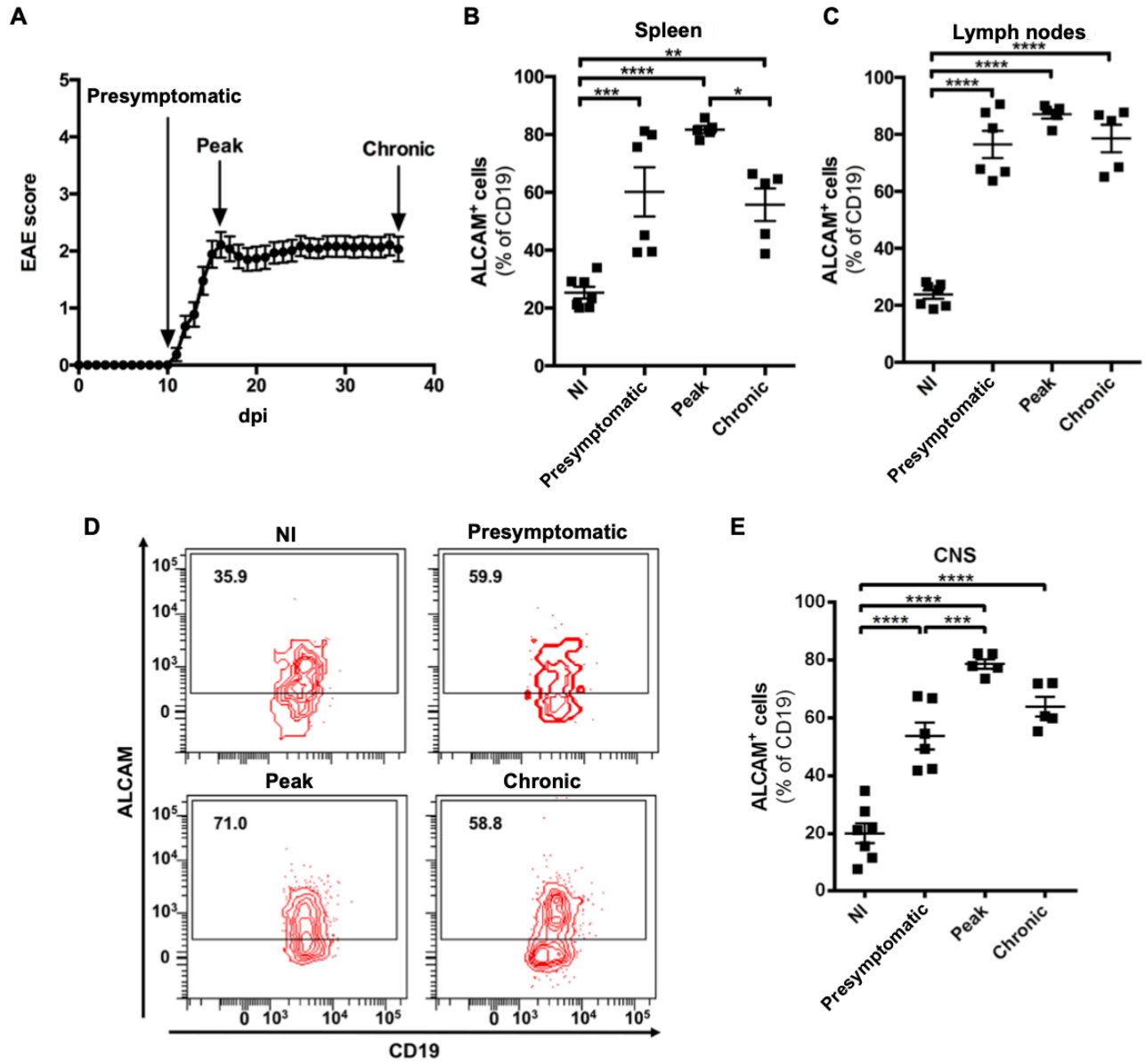


Fig. 2. ALCAM on B lymphocytes correlates with rhMOG-EAE severity.

Fig. 2. ALCAM on B lymphocytes correlates with rhMOG-EAE severity. (A) EAE clinical scores (daily, mean \pm SEM) of rhMOG-immunized C57BL/6 mice; arrows indicate animal euthanasia and organ harvest for subsequent B lymphocyte analysis; $n = 3$ pooled experiments with a total of 31 animals. (B, C, and E) Frequencies (mean \pm SEM) and (D) representative dot plots of ALCAM expression on CD19⁺ B lymphocytes isolated from (B) spleen, (C) inguinal lymph nodes, and (D and E) CNS of nonimmunized (NI) versus immunized animals at 10 (presymptomatic), 15 (peak), and 37 (chronic) days postimmunization (dpi), as analyzed by flow cytometry. For flow cytometry, $n = 5$ to 7 animals per group. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ by one-way ANOVA with Bonferroni's post hoc test.

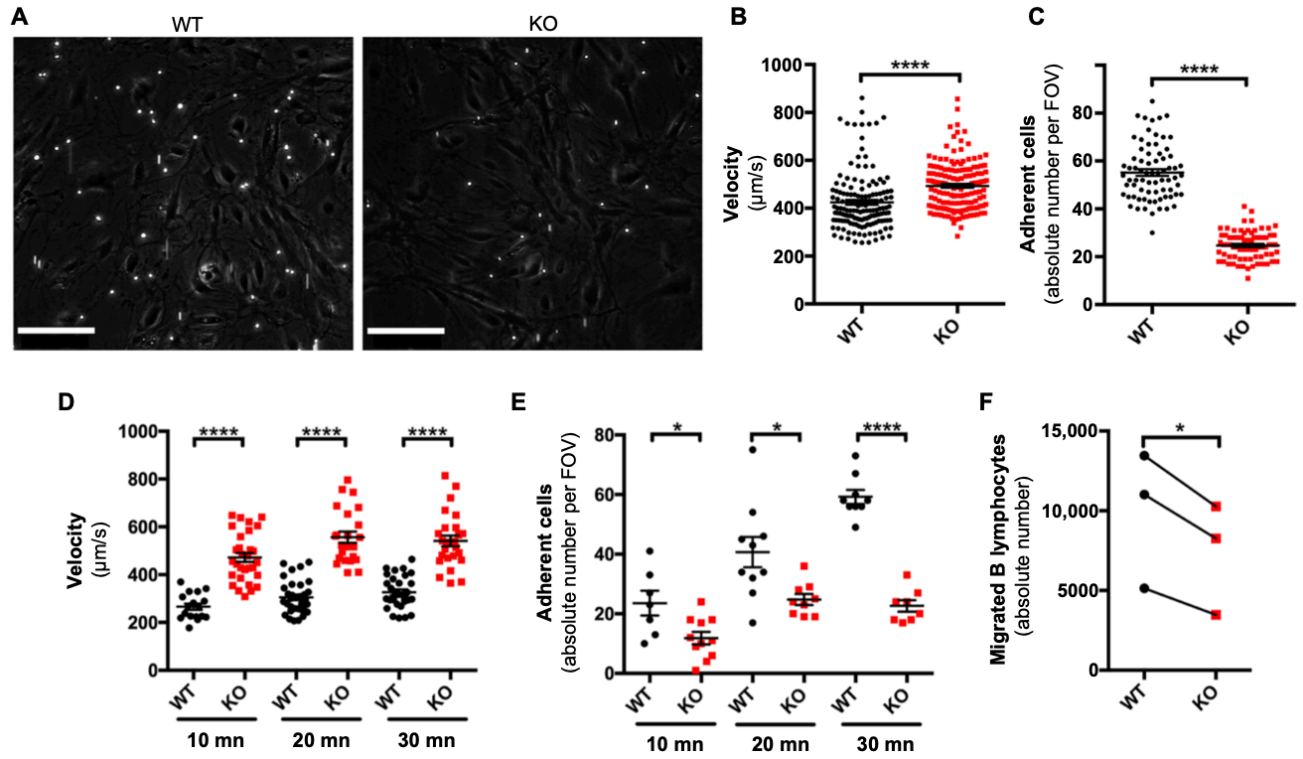


Fig. 3. ALCAM mediates the rolling and adhesion of murine B lymphocytes on BBB endothelium.

Fig. 3. ALCAM mediates the rolling and adhesion of murine B lymphocytes on BBB endothelium.

(A to F) Interaction of B lymphocytes isolated from ALCAM knockout (KO) mice versus wild-type (WT) mice, with activated primary cultures of BBB-ECs isolated from WT mouse brain tissue, as assessed by dynamic flow assays. (A) Representative images of arrested B lymphocytes (white) on BBB-ECs after 30 min of constant flow. (B and D) Velocities (mean in $\mu\text{m/s} \pm \text{SEM}$) of B lymphocytes (B) pooled over 30 min and (D) divided into 10-min intervals during constant flow. (C and E) Quantification of arrested (mean \pm SEM) B lymphocytes per field of view (FOV) (C) after 30 min and (E) divided into 10-min intervals over 30 min of constant flow. $*P < 0.05$, $****P < 0.0001$ by Student's *t* test. (F) Absolute number of migrated B lymphocytes isolated from ALCAM KO versus WT mice across BBB-ECs isolated from WT mice. Scale bars, 120 μm . Data shown are representative of $n = 3$ independent experiments. $*P < 0.05$ by paired *t* test.

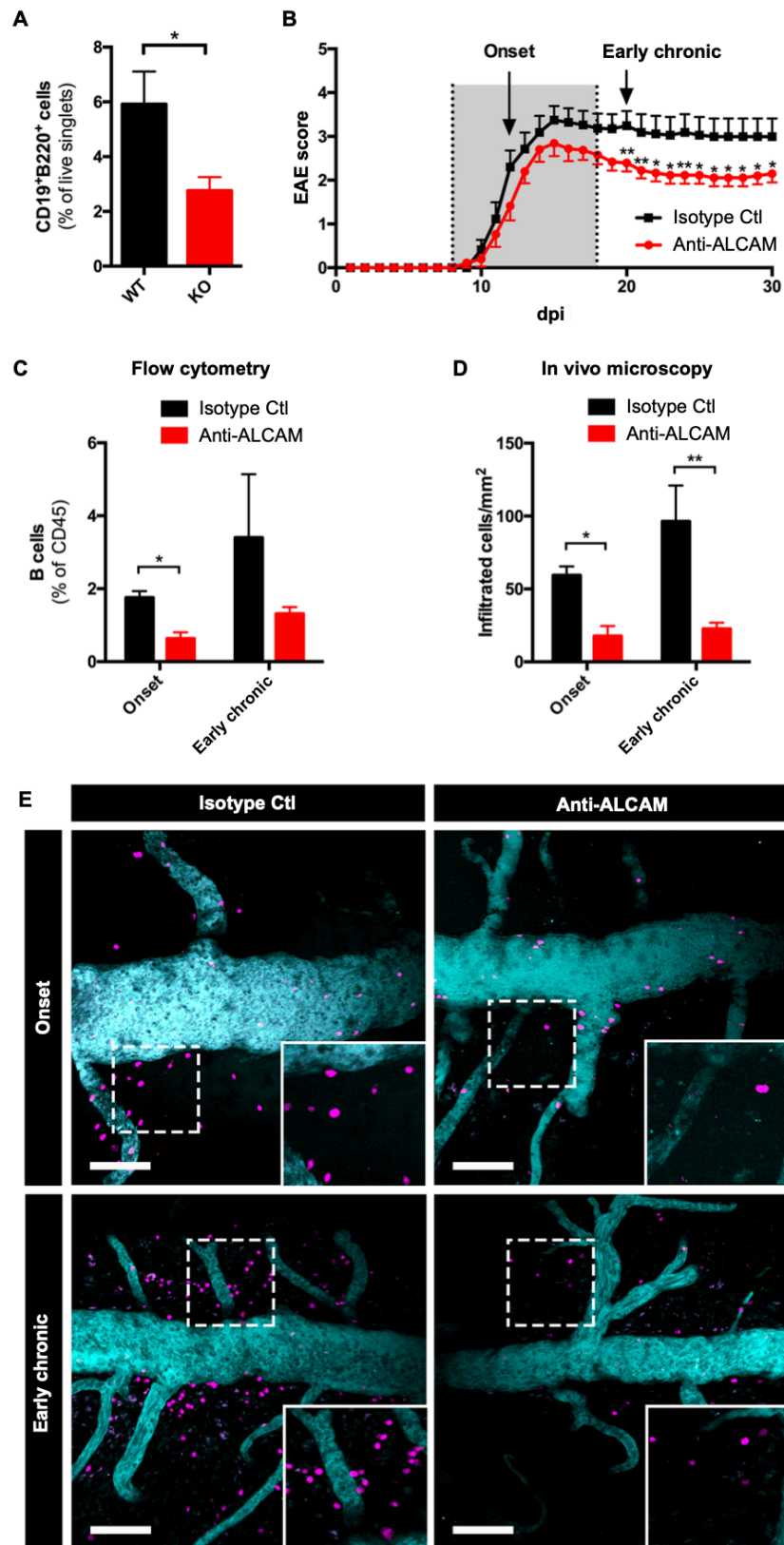


Fig. 4. ALCAM contributes to pathogenic B lymphocyte infiltration in EAE.

Fig. 4. ALCAM contributes to pathogenic B lymphocyte infiltration in EAE. (A) Frequencies (mean \pm SEM) of CD19⁺B220⁺ B lymphocytes in CNS-infiltrating leukocytes in rhMOG- immunized ALCAM KO versus WT mice at 36 to 37 dpi (chronic phase); $n = 10$ per group. $*P < 0.05$ by Student's t test. (B to E) rhMOG-EAE after the administration of anti-ALCAM antibody versus isotype control (Ctl) every other day from days 8 to 18 postimmunization. (B) EAE clinical scores (daily, mean \pm SEM); gray area indicates treatment window; arrows indicate animal euthanasia and organ harvest for subsequent B lymphocyte analysis; $n = 3$ pooled experiments with a total of 17 to 20 animals per group. (C) Frequencies (mean \pm SEM) of CD19⁺ B lymphocytes in CNS-infiltrating CD45⁺ cells at the onset and early chronic phase of the disease after treatment, as analyzed by flow cytometry; $n \geq 3$ per group. (D) Quantifications (mean per mm² \pm SEM), and (E) representative images of B lymphocytes in the meninges of immunized animals at the onset and early chronic phase of the disease after treatment, via intravital two-photon live imaging; data shown are representative of $n = 3$ per group. (E) B lymphocytes are in magenta, and leptomeningeal vessels are in cyan. Scale bars, 100 μ m. (B to D) $*P < 0.05$, $**P < 0.01$ by Wilcoxon- Mann-Whitney test.

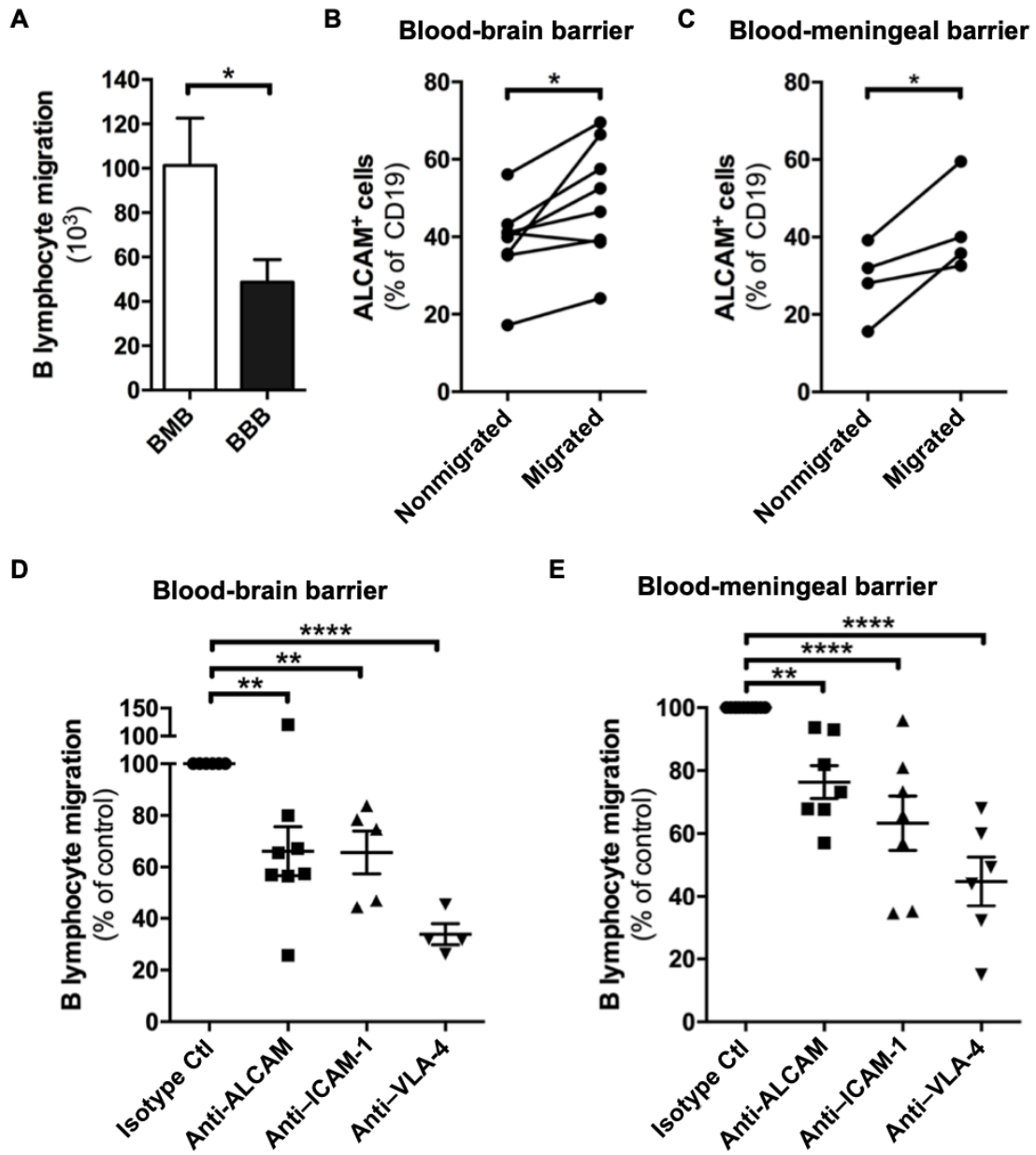


Fig. 5. ALCAM mediates the migration of human B lymphocytes across human CNS barriers.

Fig. 5. ALCAM mediates the migration of human B lymphocytes across human CNS barriers. (A to E) Migration of *ex vivo* B lymphocytes from healthy donors across primary cultures of human BBB-EC or BMB-EC, using a modified Boyden chamber model. (A) Absolute numbers (mean \pm SEM) of B lymphocytes that have migrated across human BBB-EC or BMB-EC; $n = 14$ per group, in triplicate. $*P < 0.05$ by Student's *t* test. (B and C) Expression of ALCAM on nonmigrated (recovered from the upper chamber) versus migrated (recovered from the lower chamber) CD19⁺ B lymphocytes, as analyzed by flow cytometry; $n \geq 4$ per group. $*P < 0.05$ by paired *t* test. (D and E) Frequencies (mean \pm SEM) of migrated B lymphocytes across BBB-ECs and BMB-ECs. B lymphocytes and ECs were preincubated for 1 hour with isotype control versus blocking antibodies against ALCAM, ICAM-1, or VLA-4; $n \geq 4$ per group. $**P < 0.01$, $****P < 0.0001$ by one-way ANOVA with Dunnett's post hoc test.

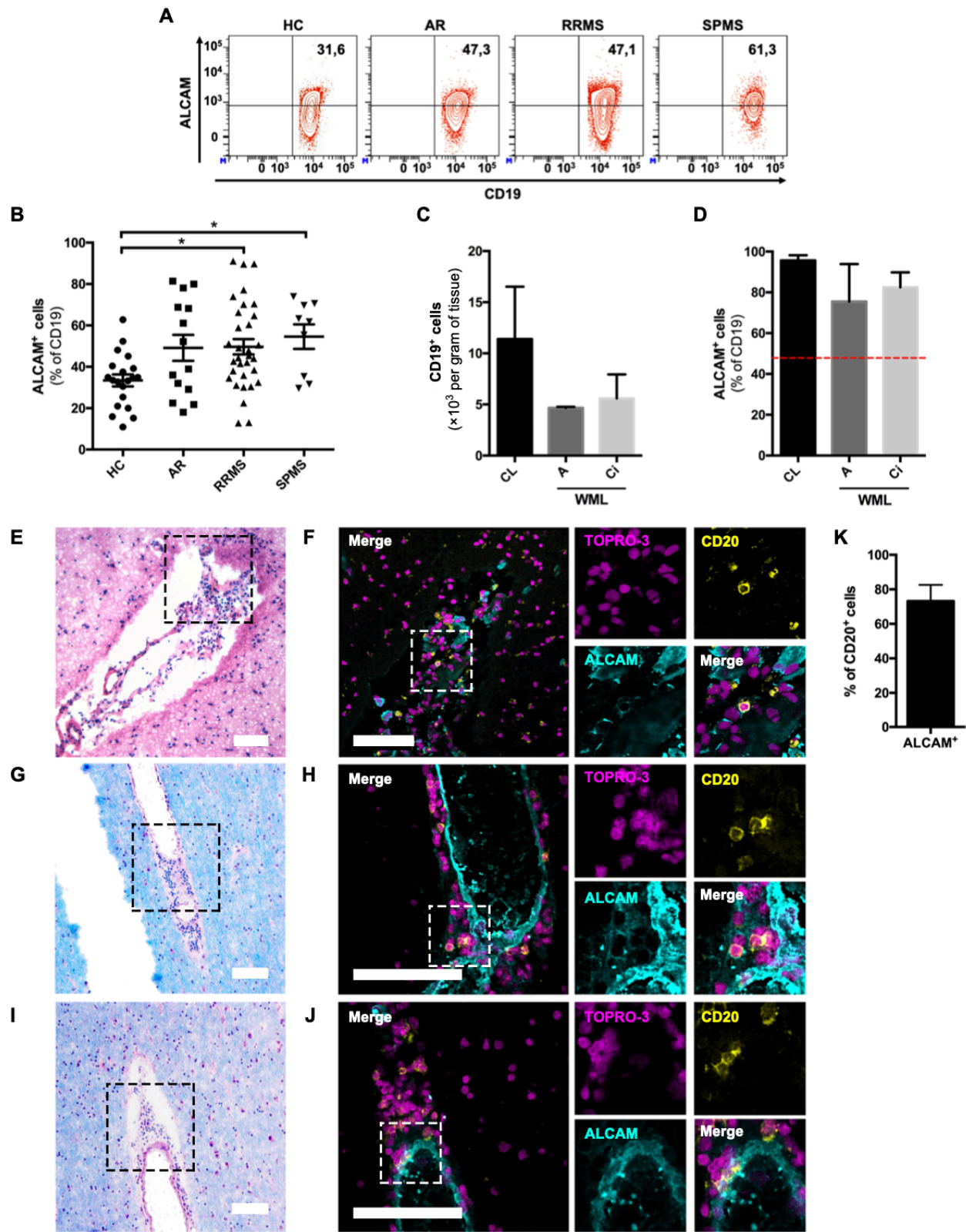


Fig. 6. ALCAM is expressed by B lymphocytes in patients with MS.

Fig. 6. ALCAM is expressed by B lymphocytes in patients with MS. (A) Representative dot plots and (B) quantification graphs of frequencies (mean \pm SEM) of ALCAM expression on CD19⁺ B lymphocytes in the peripheral blood of healthy controls (HC), patients with MS with active relapse (AR), relapsing-remitting disease (RRMS) and secondary progressive disease (SPMS), as measured by flow cytometry; $n = 7$ to 25 donors per group. (C) Absolute numbers (mean per gram of tissue \pm SEM) of CD19⁺ B lymphocytes and (D) frequencies (mean \pm SEM) of ALCAM expression on CD19⁺ B lymphocytes recovered from cortical lesions (CL), as well as active (A) and chronic inactive (Ci) white matter lesions (WML), analyzed by flow cytometry; $n = 1$ to 4. * $P < 0.05$ by one-way ANOVA with Dunnett's post hoc test. (E to J) Representative images of meningeal (E and F) and perivascular infiltrates (G to J), (E, G, and I) stained with luxol fast blue (blue), hematoxylin (violet), and eosin (pink) in sections obtained from patients with MS. Black squares in (E), (G), and (I) are magnified areas shown respectively in (F), (H), and (J) regions, with immunostainings for CD20 (yellow), ALCAM (cyan), and nuclei (TOPRO-3; magenta), captured by confocal microscopy. Scale bar, 100 μm ; $n = 3$. (K) Quantification (mean \pm SEM) of CD20⁺ cells that are positive for ALCAM by confocal microscopy; $n = 12$ images from four different patients with MS.

References and notes

1. M. Pugliatti, G. Rosati, H. Carton, T. Riise, J. Drulovic, L. Vécsei, I. Milanov, The epidemiology of multiple sclerosis in Europe. *Eur. J. Neurol.* **13**, 700–722 (2006).
2. S. L. Hauser, E. Waubant, D. L. Arnold, T. Vollmer, J. Antel, R. J. Fox, A. Bar-Or, M. Panzara, N. Sarkar, S. Agarwal, A. Langer-Gould, C. H. Smith, B-cell depletion with rituximab in relapsing-remitting multiple sclerosis. *N. Engl. J. Med.* **358**, 676–688 (2008).
3. K. Hawker, P. O'Connor, M. S. Freedman, P. A. Calabresi, J. Antel, J. Simon, S. Hauser, E. Waubant, T. Vollmer, H. Panitch, J. Zhang, P. Chin, C. H. Smith; OLYMPUS trial group, Rituximab in patients with primary progressive multiple sclerosis: Results of a randomized double-blind placebo-controlled multicenter trial. *Ann. Neurol.* **66**, 460–471 (2009).
4. L. Kappos, D. Li, P. A. Calabresi, P. O'Connor, A. Bar-Or, F. Barkhof, M. Yin, D. Leppert, R. Glanzman, J. Tinbergen, S. L. Hauser, Ocrelizumab in relapsing-remitting multiple sclerosis: A phase 2, randomised, placebo-controlled, multicentre trial. *Lancet* **378**, 1779–1787 (2011).
5. S. L. Hauser, A. Bar-Or, G. Comi, G. Giovannoni, H.-P. Hartung, B. Hemmer, F. Lublin, X. Montalban, K. W. Rammohan, K. Selmaj, A. Traboulsee, J. S. Wolinsky, D. L. Arnold, G. Klingelschmitt, D. Masterman, P. Fontoura, S. Belachew, P. Chin, N. Mairon, H. Garren, L. Kappos; OPERA I and OPERA II Clinical Investigators, Ocrelizumab versus interferon beta-1a in relapsing multiple sclerosis. *N. Engl. J. Med.* **376**, 221–234 (2017).
6. X. Montalban, S. L. Hauser, L. Kappos, D. L. Arnold, A. Bar-Or, G. Comi, J. de Seze, G. Giovannoni, H.-P. Hartung, B. Hemmer, F. Lublin, K. W. Rammohan, K. Selmaj, A. Traboulsee, A. Sauter, D. Masterman, P. Fontoura, S. Belachew, H. Garren, N. Mairon, P. Chin, J. S. Wolinsky; ORATORIO Clinical Investigators, Ocrelizumab versus placebo in primary progressive multiple sclerosis. *N. Engl. J. Med.* **376**, 209–220 (2017).
7. A. Bar-Or, L. Fawaz, B. Fan, P. J. Darlington, A. Rieger, C. Ghorayeb, P. A. Calabresi, E. Waubant, S. L. Hauser, J. Zhang, C. H. Smith, Abnormal B-cell cytokine responses a trigger of T-cell-mediated disease in MS? *Ann. Neurol.* **67**, 452–461 (2010).

8. L. Piccio, R. T. Naismith, K. Trinkaus, R. S. Klein, B. J. Parks, J. A. Lyons, A. H. Cross, Changes in B- and T-lymphocyte and chemokine levels with rituximab treatment in multiple sclerosis. *Arch. Neurol.* **67**, 707–714 (2010).
9. T. A. Barr, P. Shen, S. Brown, V. Lampropoulou, T. Roch, S. Lawrie, B. Fan, R. A. O'Connor, S. M. Anderton, A. Bar-Or, S. Fillatreau, D. Gray, B cell depletion therapy ameliorates autoimmune disease through ablation of IL-6-producing B cells. *J. Exp. Med.* **209**, 1001–1010 (2012).
10. R. Li, A. Rezk, Y. Miyazaki, E. Hilgenberg, H. Touil, P. Shen, C. S. Moore, L. Michel, F. Althehair, S. Rajasekharan, J. L. Gommerman, A. Prat, S. Fillatreau, A. Bar-Or, Proinflammatory GM-CSF-producing B cells in multiple sclerosis and B cell depletion therapy. *Sci. Transl. Med.* **7**, 310ra166 (2015).
11. M. Duddy, M. Niino, F. Adatia, S. Hebert, M. Freedman, H. Atkins, H. J. Kim, A. Bar-Or, Distinct effector cytokine profiles of memory and naive human B cell subsets and implication in multiple sclerosis. *J. Immunol.* **178**, 6092–6099 (2007).
12. L. Michel, M. Chesneau, P. Manceau, A. Genty, A. Garcia, M. Salou, A. Elong Ngonu, A. Pallier, M. Jacq-Foucher, F. Lefrère, S. Wiertlewski, J. P. Soulillou, N. Degauque, D. A. Laplaud, S. Brouard, Unaltered regulatory B-cell frequency and function in patients with multiple sclerosis. *Clin. Immunol.* **155**, 198–208 (2014).
13. J. Machado-Santos, E. Saji, A. R. Tröscher, M. Paunovic, R. Liblau, G. Gabriely, C. G. Bien, J. Bauer, H. Lassmann, The compartmentalized inflammatory response in the multiple sclerosis brain is composed of tissue-resident CD8+ T lymphocytes and B cells. *Brain* **141**, 2066–2082 (2018).
14. B. Serafini, B. Rosicarelli, R. Magliozzi, E. Stigliano, F. Aloisi, Detection of ectopic B-cell follicles with germinal centers in the meninges of patients with secondary progressive multiple sclerosis. *Brain Pathol.* **14**, 164–174 (2004).
15. R. Magliozzi, O. Howell, A. Vora, B. Serafini, R. Nicholas, M. Puopolo, R. Reynolds, F. Aloisi, Meningeal B-cell follicles in secondary progressive multiple sclerosis associate with early onset of disease and severe cortical pathology. *Brain* **130**, 1089–1104 (2007).

16. F. Aloisi, B. Serafini, R. Magliozzi, O. W. Howell, R. Reynolds, Detection of Epstein–Barr virus and B-cell follicles in the multiple sclerosis brain: What you find depends on how and where you look. *Brain* **133**, e157 (2010).
17. A. Palanichamy, L. Apeltsin, T. C. Kuo, M. Sirota, S. Wang, S. J. Pitts, P. D. Sundar, D. Telman, L. Z. Zhao, M. Derstine, A. Abounasr, S. L. Hauser, H.-C. von Budingen, Immunoglobulin class-switched B cells form an active immune axis between CNS and periphery in multiple sclerosis. *Sci. Transl. Med.* **6**, 248ra106 (2014).
18. J. N. H. Stern, G. Yaari, J. A. Vander Heiden, G. Church, W. F. Donahue, R. Q. Hintzen, A. J. Huttner, J. D. Laman, R. M. Nagra, A. Nylander, D. Pitt, S. Ramanan, B. A. Siddiqui, F. Vigneault, S. H. Kleinstein, D. A. Hafler, K. C. O'Connor, B cells populating the multiple sclerosis brain mature in the draining cervical lymph nodes. *Sci. Transl. Med.* **6**, 248ra107 (2014).
19. C. Berlin, E. L. Berg, M. J. Briskin, D. P. Andrew, P. J. Kilshaw, B. Holzmann, I. L. Weissman, A. Hamann, E. C. Butcher, Alpha 4 beta 7 integrin mediates lymphocyte binding to the mucosal vascular addressin MAdCAM-1. *Cell* **74**, 185–195 (1993).
20. E. L. Berg, L. M. McEvoy, C. Berlin, R. F. Bargatze, E. C. Butcher, L-selectin-mediated lymphocyte rolling on MAdCAM-1. *Nature* **366**, 695–698 (1993).
21. R. Cayrol, K. Wosik, J. L. Berard, A. Dodelet-Devillers, I. Ifergan, H. Kebir, A. S. Haqqani, K. Kreymborg, S. Krug, R. Moumdjian, A. Bouthillier, B. Becher, N. Arbour, S. David, D. Stanimirovic, A. Prat, Activated leukocyte cell adhesion molecule promotes leukocyte trafficking into the central nervous system. *Nat. Immunol.* **9**, 137–145 (2008).
22. I. Ifergan, H. Kébir, M. Bernard, K. Wosik, A. Dodelet-Devillers, R. Cayrol, N. Arbour, A. Prat, The blood-brain barrier induces differentiation of migrating monocytes into Th17-polarizing dendritic cells. *Brain* **131**, 785–799 (2008).
23. I. Ifergan, H. Kebir, J. I. Alvarez, G. Marceau, M. Bernard, L. Bourbonnere, J. Poirier, P. Duquette, P. J. Talbot, N. Arbour, A. Prat, Central nervous system recruitment of effector memory CD8 + T lymphocytes during neuroinflammation is dependent on α 4 integrin. *Brain* **134**, 3557–3574 (2011).

24. C. Laroche, J. I. Alvarez, A. Prat, How do immune cells overcome the blood-brain barrier in multiple sclerosis? *FEBS Lett.* **585**, 3770–3780 (2011).
25. C. Laroche, R. Cayrol, H. Kebir, J. I. Alvarez, M. A. Lécuyer, I. Ifergan, É. Viel, L. Bourbonnière, D. Beauseigle, S. Terouz, L. Hachehouche, S. Gendron, J. Poirier, C. Jobin, P. Duquette, K. Flanagan, T. Yednock, N. Arbour, A. Prat, Melanoma cell adhesion molecule identifies encephalitogenic T lymphocytes and promotes their recruitment to the central nervous system. *Brain* **135**, 2906–2924 (2012).
26. C. Laroche, M. A. Lécuyer, J. I. Alvarez, M. Charabati, O. Saint-Laurent, S. Ghannam, H. Kebir, K. Flanagan, T. Yednock, P. Duquette, N. Arbour, A. Prat, Melanoma cell adhesion molecule-positive CD8 T lymphocytes mediate central nervous system inflammation. *Ann. Neurol.* **78**, 39–53 (2015).
27. M.-A. Lécuyer, O. Saint-Laurent, L. Bourbonnière, S. Larouche, C. Laroche, L. Michel, M. Charabati, M. Abadier, S. Zandee, N. Haghayegh Jahromi, E. Gowing, C. Pittet, R. Lyck, B. Engelhardt, A. Prat, Dual role of ALCAM in neuroinflammation and blood-brain barrier homeostasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **114**, E524–E533 (2017).
28. R. Lyck, M. A. Lécuyer, M. Abadier, C. B. Wyss, C. Matti, M. Rosito, G. Enzmann, T. Zeis, L. Michel, A. B. García Martín, F. Sallusto, F. Gosselet, U. Deutsch, J. A. Weiner, N. Schaeren-Wiemers, A. Prat, B. Engelhardt, ALCAM (CD166) is involved in extravasation of monocytes rather than T cells across the blood–brain barrier. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **37**, 2894–2909 (2017).
29. E. H. Wilson, W. Weninger, C. A. Hunter, Trafficking of immune cells in the central nervous system. *J. Clin. Invest.* **120**, 1368–1379 (2010).
30. O. W. Howell, C. A. Reeves, R. Nicholas, D. Carassiti, B. Radotra, S. M. Gentleman, B. Serafini, F. Aloisi, F. Roncaroli, R. Magliozzi, R. Reynolds, Meningeal inflammation is widespread and linked to cortical pathology in multiple sclerosis. *Brain* **134**, 2755–2771 (2011).
31. N. B. Pikor, A. Prat, A. Bar-Or, J. L. Gommerman, Meningeal tertiary lymphoid tissues and multiple sclerosis: A gathering place for diverse types of immune cells during CNS autoimmunity. *Front. Immunol.* **6**, 657 (2016).

32. M. E. Walker-Caulfield, J. K. Hatfield, M. A. Brown, Dynamic changes in meningeal inflammation correspond to clinical exacerbations in a murine model of relapsing-remitting multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.* **278**, 112–122 (2015).
33. M. A. Bowen, D. D. Patel, X. Li, B. Modrell, A. R. Malacko, W. C. Wang, H. Marquardt, M. Neubauer, J. M. Pesando, U. Francke, Cloning, mapping, and characterization of activated leukocyte-cell adhesion molecule (ALCAM), a CD6 ligand. *J. Exp. Med.* **181**, 2213–2220 (1995).
34. G. S. Whitney, G. C. Starling, M. A. Bowen, B. Modrell, A. W. Siadak, A. Aruffo, The membrane-proximal scavenger receptor cysteine-rich domain of CD6 contains the activated leukocyte cell adhesion molecule binding site. *J. Biol. Chem.* **270**, 18187–18190 (1995).
35. N. J. Hassan, A. N. Barclay, M. H. Brown, Frontline: Optimal T cell activation requires the engagement of CD6 and CD166. *Eur. J. Immunol.* **34**, 930–940 (2004).
36. A. W. Zimmerman, B. Joosten, R. Torensma, J. R. Parnes, F. N. Van Leeuwen, C. G. Figdor, Long-term engagement of CD6 and ALCAM is essential for T-cell proliferation induced by dendritic cells. *Blood* **107**, 3212–3220 (2006).
37. L. C. L. T. Van Kempen, J. M. D. T. Nelissen, W. G. J. Degen, R. Torensma, U. H. Weidle, H. P. J. Bloemers, C. G. Figdor, G. W. M. Swart, Molecular basis for the homophilic activated leukocyte cell adhesion molecule (ALCAM)-ALCAM interaction. *J. Biol. Chem.* **276**, 25783–25790 (2001).
38. J. te Riet, A. W. Zimmerman, A. Cambi, B. Joosten, S. Speller, R. Torensma, F. N. van Leeuwen, C. G. Figdor, F. de Lange, Distinct kinetic and mechanical properties govern ALCAM-mediated interactions as shown by single-molecule force spectroscopy. *J. Cell Sci.* **120**, 3965–3976 (2007).
39. R. Li, A. Rezk, L. M. Healy, G. Muirhead, A. Prat, J. L. Gommerman, A. Bar-Or, Cytokine-defined B cell responses as therapeutic targets in multiple sclerosis. *Front. Immunol.* **6**, 626 (2016).
40. J. M. Frischer, S. Bramow, A. Dal-Bianco, C. F. Lucchinetti, H. Rauschka, M. Schmidbauer, H. Laursen, P. S. Sorensen, H. Lassmann, The relation between inflammation and neurodegeneration in multiple sclerosis brains. *Brain* **132**, 1175–1189 (2009).

41. R. Magliozzi, O. W. Howell, C. Reeves, F. Roncaroli, R. Nicholas, B. Serafini, F. Aloisi, R. Reynolds, A Gradient of neuronal loss and meningeal inflammation in multiple sclerosis. *Ann. Neurol.* **68**, 477–493 (2010).
42. E. R. Pierson, I. M. Stromnes, J. M. Goverman, B Cells Promote Induction of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis by Facilitating Reactivation of T Cells in the Central Nervous System. *J. Immunol.* **192**, 929–939 (2014).
43. J. A. Weiner, S. J. Koo, S. Nicolas, S. Fraboulet, S. L. Pfaff, O. Pourquié, J. R. Sanes, Axon fasciculation defects and retinal dysplasias in mice lacking the immunoglobulin superfamily adhesion molecule BEN/ALCAM/SC1. *Mol. Cell. Neurosci.* **27**, 59–69 (2004).
44. C. F. Lucchinetti, B. F. G. Popescu, R. F. Bunyan, N. M. Moll, S. F. Roemer, H. Lassmann, W. Brück, J. E. Parisi, B. W. Scheithauer, C. Giannini, S. D. Weigand, J. Mandrekar, R. M. Ransohoff, Inflammatory Cortical Demyelination in Early Multiple Sclerosis. *N. Engl. J. Med.* **365**, 2188–2197 (2011).
45. S. R. Choi, O. W. Howell, D. Carassiti, R. Magliozzi, D. Gveric, P. A. Muraro, R. Nicholas, F. Roncaroli, R. Reynolds, Meningeal inflammation plays a role in the pathology of primary progressive multiple sclerosis. *Brain* **135**, 2925–2937 (2012).
46. H. Kebir, K. Kreymborg, I. Ifergan, A. Dodelet-Devillers, R. Cayrol, M. Bernard, F. Giuliani, N. Arbour, B. Becher, A. Prat, Human TH17 lymphocytes promote blood-brain barrier disruption and central nervous system inflammation. *Nat. Med.* **13**, 1173–1175 (2007).
47. A. Alter, M. Duddy, S. Hebert, K. Biernacki, A. Prat, J. P. Antel, V. W. Yong, R. K. Nuttall, C. J. Pennington, D. R. Edwards, A. Bar-Or, Determinants of human B cell migration across brain endothelial cells. *J. Immunol.* **170**, 4497–4505 (2003).
48. C. Lucchinetti, W. Brück, J. Parisi, B. Scheithauer, M. Rodriguez, H. Lassmann, Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: Implications for the pathogenesis of demyelination. *Ann. Neurol.* **47**, 707–717 (2000).
49. M. H. Barnett, J. W. Prineas, Relapsing and remitting multiple sclerosis: Pathology of the newly forming lesion. *Ann. Neurol.* **55**, 458–468 (2004).

50. L. Haider, T. Zrzavy, S. Hametner, R. Höftberger, F. Bagnato, G. Grabner, S. Trattnig, S. Pfeifenbring, W. Brück, H. Lassmann, The topography of demyelination and neurodegeneration in the multiple sclerosis brain. *Brain* **139**, 807–815 (2016).
51. S. Fillatreau, C. H. Sweenie, M. J. McGeachy, D. Gray, S. M. Anderton, B cells regulate autoimmunity by provision of IL-10. *Nat. Immunol.* **3**, 944–950 (2002).
52. P. Shen, T. Roch, V. Lampropoulou, R. A. O'Connor, U. Stervbo, E. Hilgenberg, S. Ries, V. D. Dang, Y. Jaimes, C. Daridon, R. Li, L. Jouneau, P. Boudinot, S. Wilantri, I. Sakwa, Y. Miyazaki, M. D. Leech, R. C. McPherson, S. Wirtz, M. Neurath, K. Hoehlig, E. Meinl, A. Grützkau, J. R. Grün, K. Horn, A. a Kühl, T. Dörner, A. Bar-Or, S. H. E. Kaufmann, S. M. Anderton, S. Fillatreau, IL-35-producing B cells are critical regulators of immunity during autoimmune and infectious diseases. *Nature* **507**, 366–370 (2014).
53. O. L. Rojas, A. K. Pröbstel, E. A. Porfilio, A. A. Wang, M. Charabati, T. Sun, D. S. W. Lee, G. Galicia, V. Ramaglia, L. A. Ward, L. Y. T. Leung, G. Najafi, K. Khaleghi, B. Garcillán, A. Li, R. Besla, I. Naouar, E. Y. Cao, P. Chiaranunt, K. Burrows, H. G. Robinson, J. R. Allanach, J. Yam, H. Luck, D. J. Campbell, D. Allman, D. G. Brooks, M. Tomura, R. Baumann, S. S. Zamvil, A. Bar-Or, M. S. Horwitz, D. A. Winer, A. Mortha, F. Mackay, A. Prat, L. C. Osborne, C. Robbins, S. E. Baranzini, J. L. Gommerman, Recirculating intestinal IgA-producing cells regulate neuroinflammation via IL-10. *Cell* **176**, 610–624.e18 (2019).
54. S. Knippenberg, E. Peelen, J. Smolders, M. Thewissen, P. Menheere, J. W. Cohen Tervaert, R. Hupperts, J. Damoiseaux, 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 (2011).
55. C. T. Harp, A. E. Lovett-Racke, M. K. Racke, E. M. Frohman, N. L. Monson, Impact of myelin-specific antigen presenting B cells on T cell activation in multiple sclerosis. *Clin. Immunol.* **128**, 382–391 (2008).
56. C. T. Harp, S. Ireland, L. S. Davis, G. Remington, B. Cassidy, P. D. Cravens, O. Stuve, A. E. Lovett-Racke, T. N. Eagar, B. M. Greenberg, M. K. Racke, L. G. Cowell, N. J. Karandikar, E. M. Frohman, N.

- L. Monson, 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 (2010).
57. M. K. Storch, A. Stefferl, U. Brehm, R. Weissert, E. Wallström, M. Kerschensteiner, T. Olsson, C. Linington, H. Lassmann, Autoimmunity to myelin oligodendrocyte glycoprotein in rats mimics the spectrum of multiple sclerosis pathology. *Brain Pathol.* **8**, 681–694 (1998).
58. C. P. Genain, B. Cannella, S. L. Hauser, C. S. Raine, Identification of autoantibodies associated with myelin damage in multiple sclerosis. *Nat. Med.* **5**, 170–175 (1999).
59. I. Ifergan, T. S. Davidson, H. Kebir, D. Xu, D. Palacios-Macapagal, J. Cann, J. M. Rodgers, Z. N. Hunter, C. L. Pittet, S. Beddow, C. A. Jones, A. Prat, M. A. Sleeman, S. D. Miller, Targeting the GM-CSF receptor for the treatment of CNS autoimmunity. *J. Autoimmun.* **84**, 1–11 (2017).
60. P. B. Carrieri, V. Provitera, T. De Rosa, G. Tartaglia, F. Gorga, O. Perrella, Profile of cerebrospinal fluid and serum cytokines in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis: A correlation with clinical activity. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* **20**, 373–382 (1998).
61. J. Rasouli, B. Ciric, J. Imitola, P. Gonnella, D. Hwang, K. Mahajan, E. R. Mari, F. Safavi, T. P. Leist, G.-X. Zhang, A. Rostami, Expression of GM-CSF in T Cells Is Increased in Multiple Sclerosis and Suppressed by IFN- β Therapy. *J. Immunol.* **194**, 5085–5093 (2015).
62. L. Codarri, G. Gyölvézi, V. Tosevski, L. Hesske, A. Fontana, L. Magnenat, T. Suter, B. Becher, ROR γ t drives production of the cytokine GM-CSF in helper T cells, which is essential for the effector phase of autoimmune neuroinflammation. *Nat. Immunol.* **12**, 560–567 (2011).
63. J. Komuczki, S. Tuzlak, E. Friebel, T. Hartwig, S. Spath, P. Rosenstiel, A. Waisman, L. Opitz, M. Oukka, B. Schreiner, P. Pelczar, B. Becher, Fate-mapping of GM-CSF expression identifies a discrete subset of inflammation-driving T helper cells regulated by cytokines IL-23 and IL-1 β . *Immunity* **50**, 1289–1304.e6 (2019).

64. A. L. Croxford, M. Lanzinger, F. J. Hartmann, B. Schreiner, F. Mair, P. Pelczar, B. E. Clausen, S. Jung, M. Greter, B. Becher, The Cytokine GM-CSF Drives the Inflammatory Signature of CCR2+ Monocytes and Licenses Autoimmunity. *Immunity* **43**, 502–514 (2015).
65. P. L. De Jager, X. Jia, J. Wang, P. I. W. de Bakker, L. Ottoboni, N. T. Aggarwal, L. Piccio, S. Raychaudhuri, D. Tran, C. Aubin, R. Briskin, S. Romano, S. E. Baranzini, J. L. McCauley, M. A. Pericak-Vance, J. L. Haines, R. A. Gibson, Y. Naeglin, B. Uitdehaag, P. M. Matthews, L. Kappos, C. Polman, W. L. McArdle, D. P. Strachan, D. Evans, A. H. Cross, M. J. Daly, A. Compston, S. J. Sawcer, H. L. Weiner, S. L. Hauser, D. A. Hafler, J. R. Oksenberg, J. R. Oksenberg, Meta-analysis of genome scans and replication identify CD6, IRF8 and TNFRSF1A as new multiple sclerosis susceptibility loci. *Nat. Genet.* **41**, 776–782 (2009).
66. D. M. Kofler, C. A. Severson, N. Mousissian, P. L. De Jager, D. A. Hafler, The CD6 Multiple Sclerosis Susceptibility Allele Is Associated with Alterations in CD4+ T Cell Proliferation. *J. Immunol.* **187**, 3286–3291 (2011).
67. M. Wagner, A. Wiśniewski, M. Bilińska, A. Pokryszko-Dragan, I. Nowak, P. Kuśnierczyk, M. Jasek, ALCAM - Novel multiple sclerosis locus interfering with HLA-DRB1*1501. *J. Neuroimmunol.* **258**, 71–76 (2013).
68. M. Wagner, M. Bilinska, A. Pokryszko-Dragan, M. Sobczynski, M. Cyrul, P. Kusnierczyk, M. Jasek, ALCAM and CD6 — Multiple sclerosis risk factors. *J. Neuroimmunol.* **276**, 98–103 (2014).
69. C. Tudor, J. te Riet, C. Eich, R. Harkes, N. Smisdom, J. Bouhuijzen Wenger, M. Ameloot, M. Holt, J. S. Kanger, C. G. Figdor, A. Cambi, V. Subramaniam, Syntenin-1 and ezrin proteins link activated leukocyte cell adhesion molecule to the actin cytoskeleton. *J. Biol. Chem.* **289**, 13445–13460 (2014).
70. A. Gilsanz, L. Sánchez-Martín, M. D. Gutiérrez-López, S. Ovalle, Y. Machado-Pineda, R. Reyes, G. W. Swart, C. G. Figdor, E. M. Lafuente, C. Cabañas, ALCAM/CD166 adhesive function is regulated by the tetraspanin CD9. *Cell. Mol. Life Sci.* **70**, 475–493 (2013).

71. J.-M. Kiely, Y. Hu, G. García-Cardena, M. A. Gimbrone, Lipid raft localization of cell surface E-selectin is required for ligation-induced activation of phospholipase C γ . *J. Immunol.* **171**, 3216–3224 (2003).
72. C. V. Carman, T. A. Springer, A transmigratory cup in leukocyte diapedesis both through individual vascular endothelial cells and between them. *J. Cell Biol.* **167**, 377–388 (2004).
73. F. Pavanello, E. Zucca, M. Ghielmini, Rituximab: 13 open questions after 20years of clinical use. *Cancer Treat. Rev.* **53**, 38–46 (2017).
74. E. A. Mills, Y. Mao-Draayer, Understanding progressive multifocal leukoencephalopathy risk in multiple sclerosis patients treated with immunomodulatory Therapies: A bird's eye view. *Front. Immunol.* **9**, 138 (2018).
75. H. Kebir, I. Ifergan, J. I. Alvarez, M. Bernard, J. Poirier, N. Arbour, P. Duquette, A. Prat, Preferential recruitment of interferon-gamma-expressing TH17 cells in multiple sclerosis. *Ann. Neurol.* **66**, 390–402 (2009).
76. T. Kuhlmann, S. Ludwin, A. Prat, J. Antel, W. Brück, H. Lassmann, An updated histological classification system for multiple sclerosis lesions. *Acta Neuropathol.* **133**, 13–24 (2017).
77. G. Galicia, B. Boulianne, N. Pikor, A. Martin, J. L. Gommerman, A. S. Basso, Secondary B Cell Receptor Diversification Is Necessary for T Cell Mediated Neuro-Inflammation during Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *PLOS ONE* **8**, e61478 (2013).
78. I. Ifergan, H. Kebir, S. Terouz, J. I. Alvarez, M. A. Lécuyer, S. Gendron, L. Bourbonnière, I. R. Dunay, A. Bouthillier, R. Moumdjian, A. Fontana, A. Haqqani, A. Klopstein, M. Prinz, R. López-Vales, T. Birchler, A. Prat, Role of ninjurin-1 in the migration of myeloid cells to central nervous system inflammatory lesions. *Ann. Neurol.* **70**, 751–763 (2011).
79. I. Ifergan, K. Wosik, R. Cayrol, H. Kébir, C. Auger, M. Bernard, A. Bouthillier, R. Moumdjian, P. Duquette, A. Prat, Statins reduce human blood-brain barrier permeability and restrict leukocyte migration: Relevance to multiple sclerosis. *Ann. Neurol.* **60**, 45–55 (2006).

80. J. I. Alvarez, A. Dodelet-Devillers, H. Kebir, I. Ifergan, P. J. Fabre, S. Terouz, M. Sabbagh, K. Wosik, L. Bourbonnière, M. Bernard, J. Van Horssen, H. E. De Vries, F. Charron, A. Prat, The hedgehog pathway promotes blood-brain barrier integrity and CNS immune quiescence. *Science* **334**, 1727–1731 (2011).

81. P. Saikali, J. P. Antel, J. Newcombe, Z. Chen, M. Freedman, M. Blain, R. Cayrol, A. Prat, J. A. Hall, N. Arbour, NKG2D-mediated cytotoxicity toward oligodendrocytes suggests a mechanism for tissue injury in multiple sclerosis. *J. Neurosci.* **27**, 1220–1228 (2007).

82. C. H. Polman, S. C. Reingold, B. Banwell, M. Clanet, J. A. Cohen, M. Filippi, K. Fujihara, E. Havrdova, M. Hutchinson, L. Kappos, F. D. Lublin, X. Montalban, P. O'Connor, M. Sandberg-Wollheim, A. J. Thompson, E. Waubant, B. Weinshenker, J. S. Wolinsky, Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 Revisions to the McDonald criteria. *Ann. Neurol.* **69**, 292–302 (2011).

Acknowledgments: We thank J. A. Weiner for the gift of the ALCAM KO mice. We thank the cytometry facility and the cell imaging facility of the CRCHUM for their availability and their help in carrying out the experiments. We thank A. Michallet Roy for technical help at the animal facilities. We also thank R.-M. Rébillard for helping us with the patients' characterization.

Funding: This study was supported by an operating grant from the Research Foundation of the MS Society of Canada (MSSC) for the "Canadian B cells in MS" team (A.P., A.B.-O., and J.L.G.). A.P. holds the Senior Canada Research Chair in Multiple Sclerosis. C.G. holds a graduate scholarship from the MSSC. E.P. held a postdoctoral scholarship from the MSSC and the Canadian Institute of Health Research (CIHR). L.M. held a postdoctoral scholarship from the MSSC and the Fonds de Recherche Santé Québec (FRSQ). M.C. held a doctoral scholarship from the FRSQ and is now funded by the MSSC. T.D. held a fellowship from the FRSQ. M.-A.L. held a doctoral scholarship from the MSSC. **Author contributions:** L.M. and A.P. designed the study. R.M., A.B., B.L., and P.D. were involved in the collection of human samples and clinical characterization of patients. L.M., C.G., M.C., M.-A.L., S.Z., T.D., J.I.A., S.L., L.B., and E.P. performed the experiments. L.B. and S.L. performed blood collection from healthy controls and helped with PBMC isolations. L.M., C.G., and R.L. did the B lymphocyte *in vitro* characterization by flow cytometry and confocal

microscopy. L.M., C.G., and E.P. did the *in vitro* activation of B lymphocytes. L.B. and E.P. took care of primary culture of human BBB-ECs and BMB-ECs from their isolation to the day of the experiments. L.M. and J.I.A. performed *in vitro* transmigration assays of human B lymphocytes across BBB-ECs and BMB-ECs. C.G. performed *in vitro* flow adhesion assays of human B lymphocytes on BBB-ECs. S.Z., T.D., E.P., and C.G. performed ALCAM expression characterization in lesions of patients with MS. S.L. was holding mouse colonies. L.M., C.G., E.P., S.L., and L.B. contributed to EAE experiments and *in vivo* two-photon acquisitions. L.M., C.G., S.L., and L.B. contributed to the euthanization of animals. L.M., C.G., and L.B. performed mouse cell isolations and flow cytometry acquisition and analysis. M.-A.L., M.C., and C.G. performed mouse brain EC isolation and culture for flow adhesion assays and migration assays. L.M. and M.-A.L. performed flow adhesion assays of mouse B lymphocytes on mouse ECs. C.G. performed *in vitro* migration assays of B lymphocytes across mouse brain ECs. J.L.G. provided isolated and purified rhMOG and provided support with experimental design and data analyses. L.M., C.G., S.Z., T.D., E.P., and J.I.A. analyzed the data. A.B.-O., J.L.G., and E.P. provided key scientific input. L.M., C.G., M.C., and A.P. interpreted the data and wrote the manuscript. A.B.-O., J.L.G., and A.P. secured funding.

Competing interests: L.M. received honoraria for consulting from Biogen, Merck Serono, Roche, Novartis, Sanofi Genzyme, and Teva. J.L.G. has sponsored research agreements from Roche, Merck, and Novartis and consults for Roche and Visterra Inc. A.B.-O. and A.P. have participated as speakers in meetings sponsored by and received consulting fees and/or grant support from Actelion, Atara Biotherapeutics, Biogen Idec, Celgene/Receptos, Genentech/ Roche, Teva, MAPI, Medimmune, Merck/EMD Serono, Novartis, and Sanofi Genzyme.

Data and materials availability: All data associated with this study are present in the paper or the Supplementary Materials.

Supplementary materials

Materials and Method

stm.sciencemag.org/cgi/content/full/11/518/eaaw0475/DC1

Ex vivo B lymphocytes isolation and culture

Blood samples were collected from healthy donors and patients with MS after obtaining informed consent in accordance with institutional guidelines (Centre Hospitalier de l'Université de Montréal [CHUM] research ethic committee approval number BH07.001). Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were processed and isolated from blood samples as previously described (26). Human B lymphocytes were isolated using MACS isolation columns (negative selection) according to the manufacturer's protocol (Miltenyi) or using Human CD19 Enrichment Kit (negative selection, Stemcell technologies). Purity was assessed by flow cytometry and was routinely > 95 %. Effector B lymphocytes were generated by stimulating *ex vivo* cells at a concentration of 1 million cells per ml for 48 hours in presence of Mega CD40L (1 µg/ml, Enzo Life Science), recombinant human IL-4 protein (20 ng/ml, R&D Systems) and Goat anti-human IgM (10 µg/ml, Jackson ImmunoResearch) for BCR-dependent activation or ODN 2006 (0.8 µg/ml, InvivoGen) for TLR-dependent activation in X-VIVO 15 medium (Lonza) (10).

Flow cytometry

Extracellular and intracellular stainings were conducted as previously described (26). Briefly, Fc receptors were blocked with mouse IgG isotype control (Invitrogen) for human cells or anti-mouse CD16/CD32 (BD Bioscience) for mice cells for 20 minutes at 4 °C. Cells were then incubated 30 minutes at 4 °C for labelling with surface antigens antibodies. All flow cytometry analyzed populations excluded doublets (eliminated using classical gating strategy) and dead cells (stained with the viability marker LIVE/DEAD fixable Aqua dead cell stain kit from ThermoFisher Scientific).

Surface antigens staining: The following antibodies against human cell surface markers were used: CD11a/LFA-1, CD19, CD24, CD27, CD38, CD49d/VLA-4, CD80, CD86, CD95, CD166/ALCAM,

ICAM-1 (all from BD Biosciences). Appropriate fluorochrome-matched isotype antibodies were used to assess non-specific background staining.

Intracellular cytokines staining: Cells were stimulated for 5 hours with 1 µg/ml ionomycin and 20 ng/ml phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) in the presence of 2 µg/ml brefeldin A (all from Sigma-Aldrich). Cells were stained for surface antigens followed by fixation and permeabilization (Fixation/Permeabilization solution kit, BD Biosciences). Subsequently, cells were incubated for labelling with the following antibodies IL-6, TNFα and GM-CSF (all from BD Biosciences).

Whole blood staining: 300 µl of human peripheral blood was stained as previously mentioned. The following antibodies against surface markers have been used: CD19, CD166/ALCAM (all purchased from BD Biosciences). Subsequently, red blood cells were lysed for 15 minutes at room temperature with lysing buffer (BD Biosciences) before analysis.

Mouse cell staining: Immune cells isolated from inguinal lymph nodes, spleen and CNS were labelled with surface marker antibodies for CD45, CD19 (all purchased from BD Biosciences), B220/CD45R (eBiosciences), CD166/ALCAM (R&D Systems), CD11b (Biolegend). Appropriate fluorochrome-matched isotype antibodies were used to assess non-specific background staining. All samples were acquired on a BD LSR II (Becton Dickinson) and analyzed using BD FACSDiva software (BD Biosciences).

Human CNS cell staining: MS lesions or normal appearing tissue were cut out of the whole brain tissue and immune cells were isolated after homogenization, consecutive mesh-filtering and percoll-density centrifugation. Cells of interest were stained using antibodies for CD19 (BD Biosciences) and CD166/ALCAM (BD Biosciences) for 30 minutes at 4 °C in the dark. Appropriate fluorochrome-matched isotype antibodies were used on PBMCs from a healthy donor to assess non-specific background staining.

Immunostaining

Immunocytochemistry: effector B lymphocytes were cytopspined in 25% glycerin and fixed in acetone for 20 seconds at room temperature as previously described (75). These cells were labelled with antibodies for CD166/ALCAM (mouse monoclonal; 1:500; R&D Systems) and CD20

(rabbit monoclonal; 1:200; Abcam) overnight at 4 °C. Sections were then incubated 40 minutes at room temperature with secondary antibodies donkey anti-mouse AF488 and donkey anti-rabbit RRX (1:400, Jackson laboratories) and mounted in Mowiol reagent containing Topro-3 (1:300; Thermofisher Scientific). All images were acquired on a Leica SP5 confocal microscope and were analyzed with Leica LAS AF software (Leica Wetzlar).

Immunohistostaining: fast-frozen brain tissue from 2 patients with MS were studied. Age of patients were 26 and 33 years old with disease duration of 12 and 8 years respectively. Sections of 7 µm thick from 2 to 3 different block per patient were used to stain. Characterization of meningeal infiltrates and lesions were performed by luxol fast blue hematoxylin eosin staining as previously described (76). Tissue sections were stained overnight at 4°C with anti- CD166/ALCAM (goat polyclonal; 1:200; R&D Systems), anti-CD11a (mouse monoclonal; 1:50; Biolegend), anti-ICAM-1 (mouse monoclonal; 1:50; Santa Cruz biotechnology), anti-CD3 (mouse monoclonal; 1:30; BD Biosciences) and anti-CD20 (rabbit monoclonal; 1:200; Abcam) antibodies. Following secondary antibodies, donkey anti-goat A488 (1:500, Jackson laboratories) and donkey anti-rabbit RRX (1:400, Jackson laboratories) were then incubated for 40 minutes at room temperature, mounted and analyzed as previously described for immunocytofluorescence staining.

Mice colonies

ALCAM KO mice on the C57BL/6 background (*Alcamtm1Jawe*) were generously provided by Joshua A. Weiner, Departments of Biology and Psychiatry, The University of Iowa, Iowa City, IA. The founding animals were further backcrossed in our animal facility for seven generations. The weight of the animals matched those of aged-matched WT littermate control, and no gross abnormalities or phenotypes were apparent from the embryonic stage to adulthood, confirming the observation made by the group of J. A. Weiner (43). Animals were kept for a maximum of 1 year with no health issues, which suggests a normal life expectancy.

CD19^{TdTomato Red} transgenic mice were generated from a crossing between CD19Cre mouse (Jackson laboratories 006785) and Rosa26 Tomato Red mouse (Jackson laboratories 007914).

EAE induction, scoring and pathology

All animal procedures were approved by the Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montreal (CRCHUM) Animal Care committee (N15035APs) and followed guidelines of the Canadian Council on Animal Care.

B lymphocyte dependent rhMOG EAE model: Female ALCAM KO, their WT littermates and CD19^{TdTomato} mice at 6-10 weeks of age were immunized subcutaneously with 200 µg rhMOG (1-120), kindly provided by the lab of Dr. Jennifer Gommerman, in a 100 µl emulsion of incomplete Freund's adjuvant (ThermoFisher Scientific) supplemented with 4 mg/ml Mycobacterium tuberculosis (ThermoFisher Scientific). Mice also received two intra-peritoneal doses of pertussis toxin (500 ng; List Biological Labs, Inc.) the day of immunization and 2 days later for ALCAM KO and their WT littermates. Following the same protocol, CD19^{TdTomato} mice received 400 ng of pertussis toxin. The rhMOG consists of 120 amino acids of the extracellular portion of human MOG prepared as described by Galicia et al., (77). The scoring system used was as follows: 0, unaffected; 1, limp tail; 2, slow righting-reflex; 3, partial hindlimb paralysis; 4, complete hindlimb paralysis; and 5, moribund/death.

MOG₃₅₋₅₅ EAE model: MOG₃₅₋₅₅ EAE was induced as previously described (25, 75). Female WT mice at 6-10 weeks old were immunized subcutaneously with 200 µg MOG₃₅₋₅₅ (MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGK; Sheldon Biotechnology Centre) in a 100 µl emulsion of incomplete Freund's adjuvant supplemented with 4 mg/ml Mycobacterium tuberculosis (Fisher Scientific). Pertussis toxin (400 ng, Sigma-Aldrich) was injected intraperitoneally 48 hours after EAE induction.

EAE sacrifice and B lymphocytes staining

WT mice: Representative animals were sacrificed on days 10, 16 and 37 (d.p.i), and their CNS, spleen and inguinal lymph nodes were recovered and processed for cell isolation and flow cytometry analysis as previously described (23).

ALCAM KO mice and WT littermate mice: Representative animals from each group (WT and ALCAM KO) were sacrificed on days 36-37 d.p.i and their CNS were recovered and processed for cell isolation and flow cytometry analysis as previously described (23).

Anti-ALCAM treatment of CD19^{TdTomato Red} mice: After EAE induction, mice were injected intraperitoneally every day from day 8 to 18 with anti-ALCAM (250 µg; monoclonal MAB656; R&D Systems) or isotype control antibody (250 µg; mouse IgG1; MAB002, R&D Systems). Surgery for intravital 2 photon microscopy was performed on days 12/13 and 19/20 (d.p.i) on representative animals from each group. Mice were then sacrificed for immune cells analysis in lymph nodes, spleen and CNS by flow cytometry. Injections, scoring, surgeries, and analysis were assessed by an investigator 'blinded' to the identity of the treatment group.

Primary cultures of mouse BBB-endothelial cells (MBECs)

Primary cultures of mouse brain parenchymal capillary endothelial cells were prepared from 10-15 WT littermate female mice 7-9-week-old. The brains were isolated without perfusion and meninges were removed. The parenchymal tissue was minced and homogenized at low speed in a mechanical Dounce homogenizer. The homogenate was digested in DMEM containing 0.7 mg/ml collagenase type II (Worthington Biochemical corp.) and 39 U/ml DNase I (Worthington Biochemical corp.) for 75 minutes at 37 °C. Myelin was removed by centrifugation at 1000 g for 20 minutes in 20% BSA-DMEM (Sigma-Aldrich/Thermofisher scientific). The remaining pellet was agitated for one hour at 37°C with a mixture of 1 mg/ml collagenase-dispase (Roche/Sigma-Aldrich) and 39 U/ml DNase I in DMEM. The microvessels were separated from remaining glial cells and red blood cells using a 33% continuous Percoll (Ge Healthcare) gradient centrifuged at 1000 g for 10 minutes. Microvessels were plated on 6-wells culture dishes coated with 5 µg/ml collagen type IV (Sigma-Aldrich). MBECs were cultured in DMEM supplemented with 20% (v/v) FBS (Sigma-Aldrich), 1 ng/ml basic fibroblast growth factor (Roche/Sigma-Aldrich), 100 µg/ml heparin (Sigma-Aldrich), 1.4 µM hydrocortisone (Sigma-Aldrich), and 1X antibiotic- antimycotic solution (Thermofisher Scientific). The media was replaced every 24 hours during the first 3 days. Puromycin (10 µg/ml) (Sigma-Aldrich) was added to the media for the first 48 hours of culture. After 72 hours, 4 µg/ml of puromycin was maintained in the culture media. A confluent monolayer was formed following 4-6 days in culture. No immune reactivity for α-smooth muscle actin, glial fibrillary acidic protein, or neuronal nuclei protein could be detected, confirming the absence of contaminating smooth muscle cells, astrocytes, and neurons, respectively. To stimulate

endothelial cells, mouse recombinant TNF α (3 ng/ml) and IFN γ (60 ng/ml) (R&D systems) were added to the culture media 24 hours prior to the experimental procedure.

Flow assays

In vitro live cell imaging of mouse B lymphocyte interaction with MBECs: Flow system adhesion assay was performed as previously published (26, 78). Mice brain endothelial cells were cultured on a 0.4mm μ -slide (Ibidi Integrated BioDiagnostics) in a final volume of 220 μ l mouse endothelial cell media for 4 days to reach confluency. After 4 days, the μ -slide was washed with fresh media and placed inside a live chamber (Live Chamber 37°C and 5% CO $_2$), and connected to the flow system with a 50-cm long perfusion set tubing (aperture diameter of 0.8mm) with a 90° angled connector. The flow generated by the Ibidi pump system was controlled through the Ibidi pump control software (Ibidi Integrated BioDiagnostics). 5,6-Carboxyfluorescein diacetate succinimidylester (CFSE)-labelled mice B lymphocytes (5×10^6) isolated from spleens of KO mice or WT mice were then added to the flow system for a final volume of 4 ml (applied air pressure: -370 Pa, flow rate: 0.43 ml/min, shear stress: 0.56 dyn/cm 2 , shear rate: 27 /s, cycle duration: 90 s, unidirectional flow). Live time-lapse acquisition videos were recorded at constant intervals during 30 minutes and pictures of the whole channel were performed at 30 minutes. Adherent B lymphocytes were counted using Volocity software. Clump cells and small debris were excluded from analysis based on their size and basal fluorescence.

In vitro live cell imaging of human B lymphocyte interaction with human BBB-ECs: Imaging of human B lymphocyte interaction with human BBB-ECs were performed as previously described (25, 78). Human BBB-ECs (8×10^5 cells/slide) were cultured on a 0.4 mm μ -slide (Ibidi Integrated BioDiagnostics) in a final volume of 220 μ l of EC culture media to reach confluency. BBB-ECs were treated for 24 hours prior flow assay with TNF α (117 mU/ μ l) and IFN γ (117 mU/ μ l) (Thermofisher Scientific PHC4031 and PDC3016). Human B lymphocytes were pre-treated for 1 hour at 37 °C with blocking antibody for ALCAM (30 μ g/ml, mouse monoclonal, R&D Systems MAB656) and corresponding isotype control IgG1 (R&D Systems). B lymphocytes (1×10^6) prelabelled with CFSE were added to the flow system and acquisition was done as previously described (25, 78).

Intravital microscopy

Surgical procedure.

Mice were anesthetized by subcutaneous injection of ketamine (10 mg/kg) and dexmedetomidine (10 mg/kg). Isoflurane (1 %) and oxygen were subsequently used throughout the surgery and imaging session to maintain the anesthesia of mice. Incision of 1 cm in length was made on the shaved and disinfected back skin of the mice. After removal of muscle tissue, a single laminectomy was performed at the L3 vertebral level and the dura mater was removed. Following surgery, agarose (3 %; Thermofisher Scientific 16500-500) was applied on the back of mice to create a watertight cavity filled with sterile HBSS 1X around the spinal cord. During intravital image acquisition, mice were placed on a heating pad to maintain body temperature between 34° and 36°C. To visualize blood vessels, Alexa Fluor 488 dextran diluted in sterile saline was injected intravenously in the tail (1 mg/ml; 70kDa; Thermofisher Scientific D1822). To prevent the animals from dehydration, subcutaneous injections of sterile saline (200 µl) were performed every hour during surgery and acquisition.

Two-photon microscopy and data acquisition.

A Zeiss LSM 780 microscope equipped with a Ti:Sapphire laser and 20x waterdipping objective was used for intravital imaging experiment. Two-photon excitation was generated at 760 nm at a 512 x 512 resolution with a pixel size of 1.10 µm. 3 to 7 images were taken to analyse all the spinal cord vessel under the laminectomy window. Images were acquired as z-stacks with 3 µm increments under Zen Blue software (Zeiss), after which they were analysed with Imaris 9.1 software (Bitplane).

Human BBB & BMB endothelial cells isolation & culture

BBB endothelial cells were isolated from nonepileptic surgical human CNS material as per published protocols (21, 46, 79). Informed consent was obtained prior to surgeries (CHUM research ethic committee approval number BH07-001).

For meningeal endothelial cell culture, meninges were removed from the aforementioned surgical specimens, digested mechanically and then chemically using collagenase type IV (2

mg/ml; Sigma-Aldrich) for 15 minutes at 37 °C. Endothelial cells were subsequently isolated using a 30 µm filter (Miltenyi) and cultured in six-well plates coated with 0.5 % gelatin, in EC culture media composed of M199 cell culture media (Thermofisher Scientific) supplemented with 10% FBS, 5% human normal serum (Gemini), 0,2% insulin-transferrin-sodium selenite 100X (Sigma-Aldrich), and 0,14 % EC growth supplement (BD Biosciences) at 37 °C. Processing and characterization of BMB-ECs was performed as with BBB-ECs, as previously described (21, 46, 79).

Migration assays and blocking experiments

Transmigration assays were performed using a modified Boyden chamber as previously published (21, 79). Briefly, human BBB or BMB-ECs were grown for 72 hours in Boyden chambers (Falcon/BD Biosciences) with a pore size of 3 µm in culture media supplemented with (for BBB-EC culture) or without (for BMB-EC culture) 40 % astrocyte culture media (ACM). ACM was harvested from Human fetal astrocytes culture (Centre Hospitalier de l'Université de Montréal research ethic committee approval number HD07.002) and filtered before adding to the EC cultures as previously described (80, 81). Subsequently, 1 million isolated B lymphocytes were added to the upper chamber. After 22 hours, migrated B lymphocytes in the lower chamber were counted and stained. For blocking experiments, antibodies for ALCAM (30 µg/ml, mouse monoclonal, R&D Systems MAB656), ICAM-1 (10 µg/ml, mouse monoclonal, R&D Systems BBA4), VLA-4 (20 µg/ml, mouse monoclonal, R&D Systems BBA37) or the appropriate isotype control (murine IgG1 or IgG2A, at the appropriate concentration) were incubated with immune cells and ECs 1 hour prior to the start of the assay.

For murine migration assay, a similar experimental approach was used. Murine BBB-ECs were grown in their aforementioned media for 96 hours in Boyden chambers. Subsequently, B lymphocytes were isolated via negative selection (negative selection, Stemcell technologies) from spleens of WT or ALCAM KO mice and 1 million cells were directly added to the upper chamber. After 22 hours, migrated B lymphocytes in the lower chamber were counted.

Patient Classification

Patients were classified as Clinically Isolated Syndrome (CIS, n = 7), RRMS (n = 25) and Secondary Progressive MS (SPMS, n = 9) according to McDonald's 2010 revised criteria (82). Active relapse

(AR, n = 14) was defined as acute/subacute onset of new neurological deficits lasting over 24 hours. Untreated patients were defined as patients who have not received immunomodulatory/immunosuppressive drugs for at least 3 months.

Ultra-Fast Autopsy & Patient Classification

Ultra-fast autopsy brain was obtained from a male MS patient who underwent voluntary end of life treatment. The 26 years old patient had an EDSS of 9 and a disease duration of 12 years. He was previously treated with cyclophosphamide, Rebif, Copaxone, Tysabri and finally Gilenya, but was not treated for more than 6 months prior to death. He remained tetraplegic and was dependent on assisted breathing. Upon reception of his autopsy, MS lesions were microdissected, mechanically and chemically digested and their infiltrating leukocytes harvested for analysis via flow cytometry.

Supplementary figures

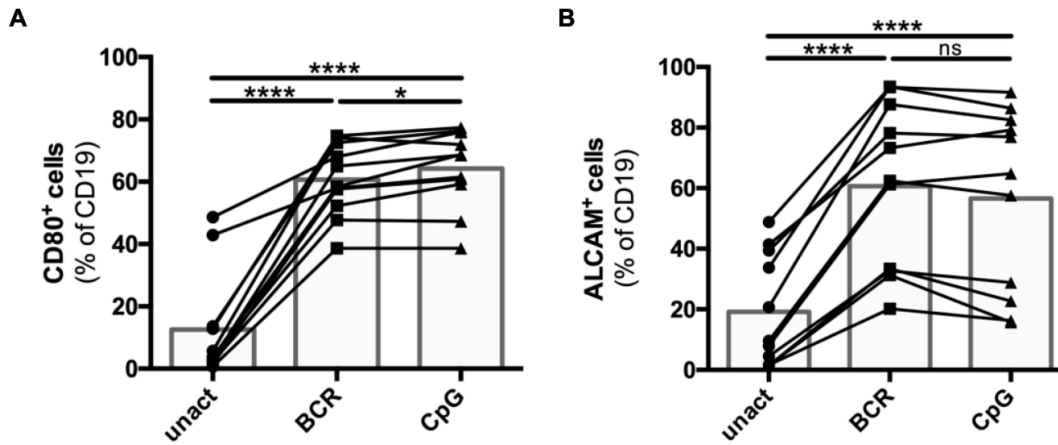


Fig. S1. Activated B lymphocytes up-regulate ALCAM upon both BCR- and TLR-dependent activation.

Frequencies of **(A)** CD80⁺ and **(B)** ALCAM⁺ cells in activated (BCR and CpG) versus unactivated (unact) B lymphocytes from the peripheral blood of healthy donors, by flow cytometry. B lymphocytes were generated by stimulating *ex vivo* cells at a concentration of 1 million cells per ml for 48 hours in presence of Mega CD40L (1 µg/ml), recombinant human IL-4 protein (20 ng/ml) and either Goat anti-human IgM (10 µg/ml, Jackson ImmunoResearch) for BCR-dependant activation (BCR) or CpG ODN (0.8 µg/ml) for TLR-dependant activation (CpG). $n = 11$. ns, not significant ($P > 0.05$), $*P < 0.05$, $****P < 0.0001$ by one-way ANOVA with Bonferroni's post hoc test.

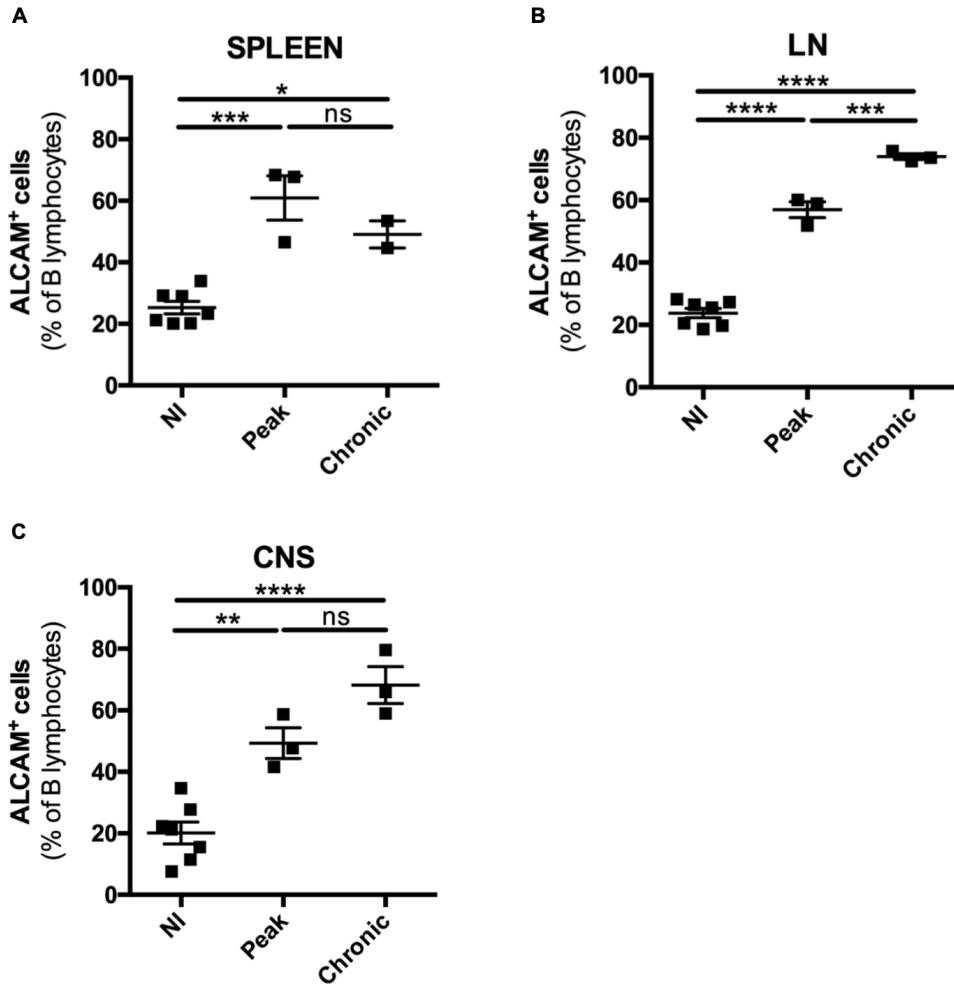


Fig. S2. ALCAM expression on peripheral and CNS-infiltrating B lymphocytes is increased during the course of MOG₃₅₋₅₅-EAE.

Frequencies (mean \pm SEM) of ALCAM expression on CD19⁺ B lymphocytes isolated from (A) spleen, (B) inguinal lymph nodes (LN), and (C) CNS of non-immunized (NI) versus immunized animals with MOG₃₅₋₅₅ at the peak of the disease, as analysed by flow cytometry; $n \geq 2$ animals per group. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ by one-way ANOVA with Bonferroni's post hoc test.

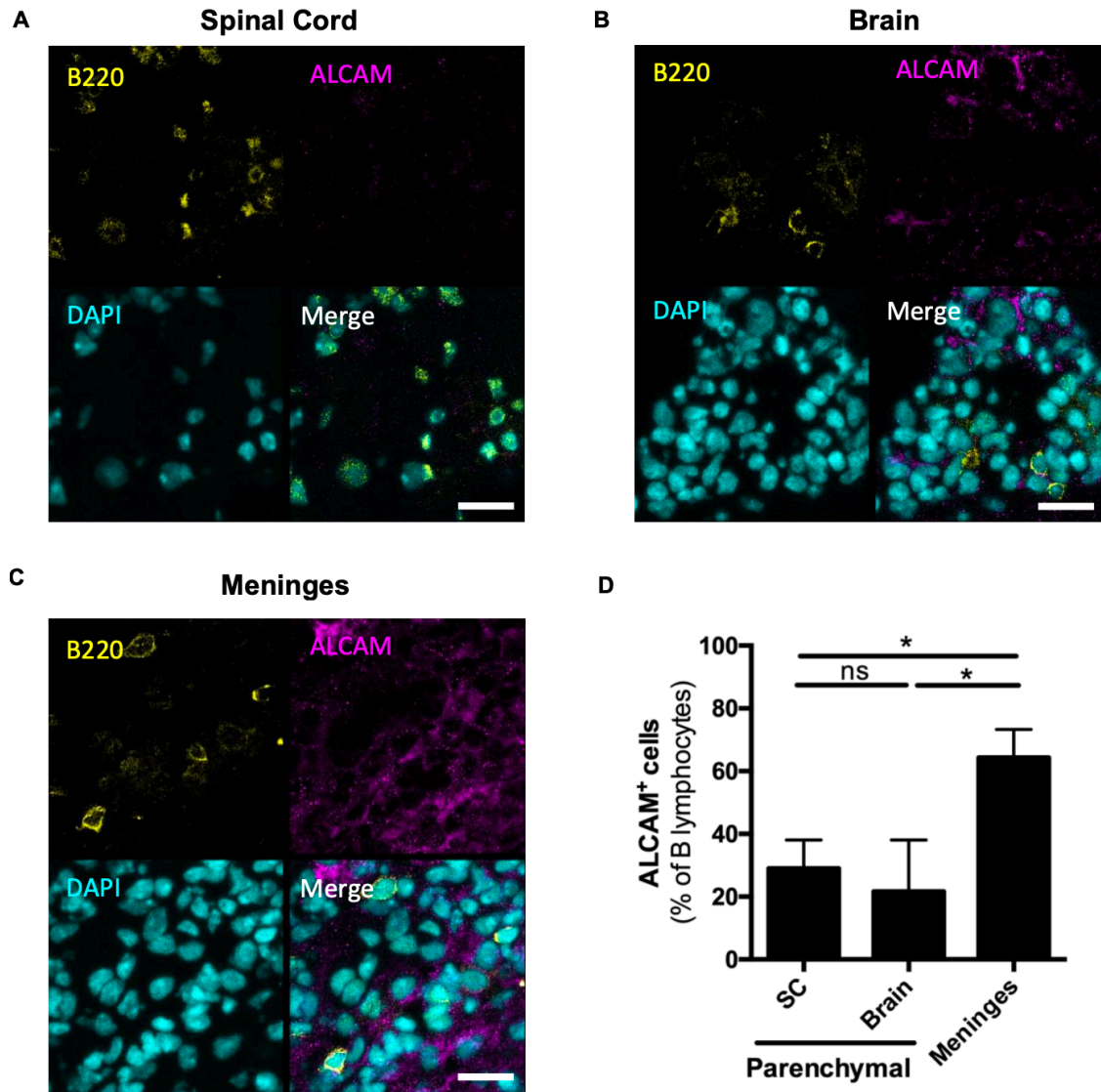


Fig. S3. ALCAM⁺ B lymphocytes are preferentially localized in meningeal infiltrates in EAE.

(A) Spinal cord parenchymal, (B) brain parenchymal and (C) meninges of rhMOG-EAE mice at the peak of the disease were stained by immunofluorescence for B220 (yellow), ALCAM (magenta) and DAPI (cyan); Images representative of $n \geq 6$. Scale bar 20 μm . (D) Percentages (mean \pm SEM) per field of view of B lymphocytes that are ALCAM⁺ in the spinal cord (SC), brain and meninges. ns, not significant ($P > 0.05$), * $P < 0.05$ by one-way ANOVA with Bonferroni's post hoc test.

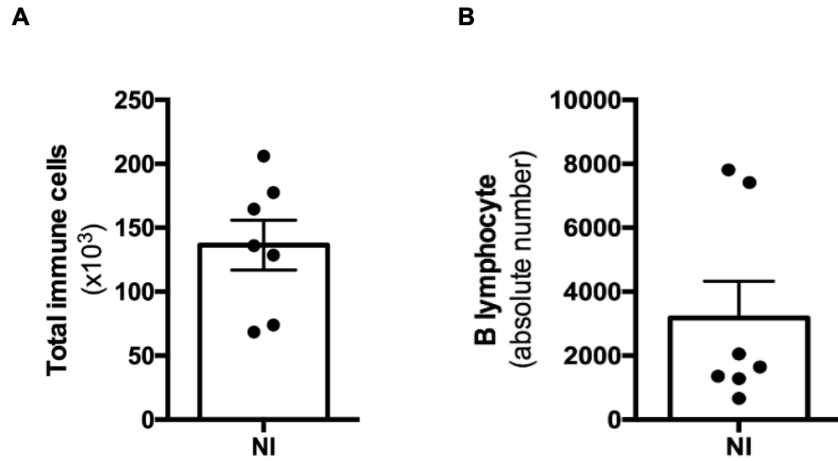


Fig. S4. Few immune cells and B lymphocytes are isolated from the CNS of naïve WT mice.

Mean absolute number (\pm SEM) of **(A)** living cells and **(B)** B lymphocytes by flow cytometry after cell isolation from $n = 7$ naïve WT mice CNS.

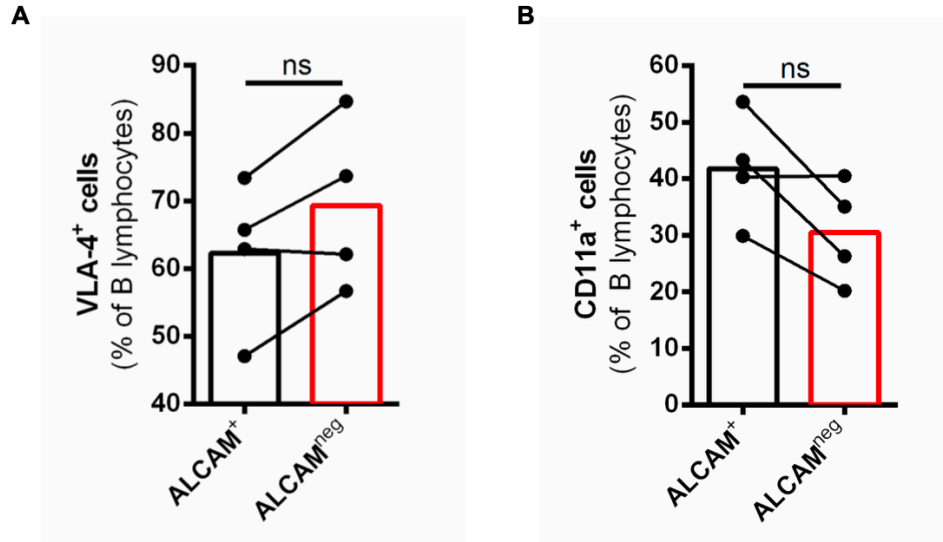


Fig. S5. CNS-infiltrating B lymphocytes do not coexpress cell adhesion molecules in EAE.

Flow cytometry analysis of frequencies of **(A)** VLA-4 and **(B)** CD11a expressing ALCAM⁺ versus ALCAM^{neg} B lymphocytes in C57BL/6 mice CNS at day 15 (peak of disease) in rhMOG-EAE. Frequencies were analyzed by flow cytometry; $n = 4$ animals. ns, not significant ($P > 0.05$) by paired Student's t test.

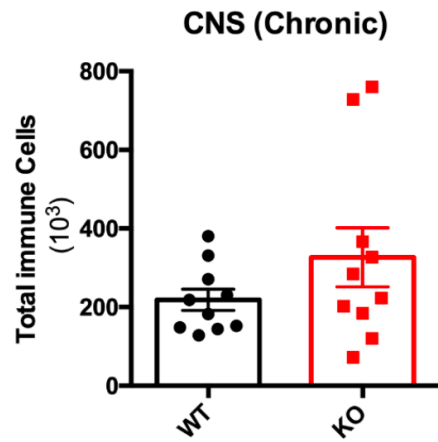


Fig. S6. Immune cells infiltrate CNS of ALCAM KO and WT mice during the chronic phase of the disease.

Absolute numbers of live immune cells in rhMOG-immunized ALCAM KO versus WT mice at day 36-37 (chronic phase of the disease); $n = 10$ per group. No significant difference.

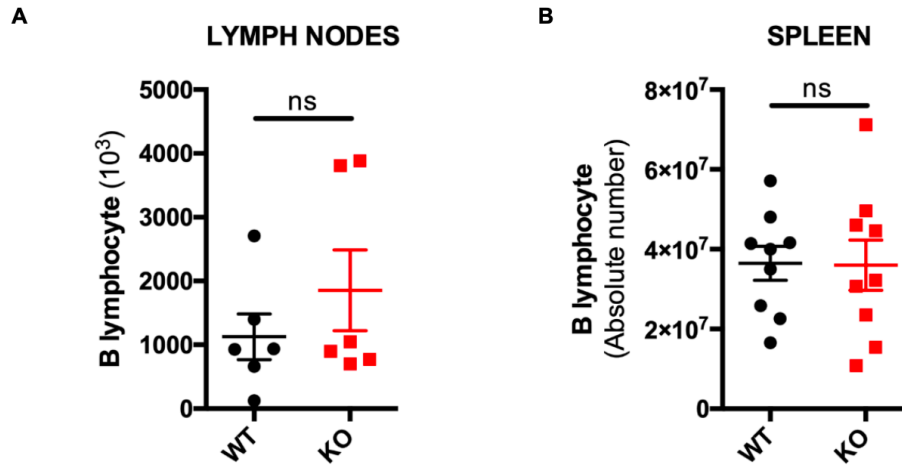


Fig. S7. Absolute numbers of B lymphocytes are similar in lymphoid organs of ALCAM KO and WT mice in the presymptomatic phase.

Frequencies (mean \pm SEM) of CD19⁺B220⁺ B lymphocytes in **(A)** lymph nodes and in **(B)** spleen of rhMOG-immunized ALCAM KO versus WT mice at day 11-12 (pre-symptomatic) analysed by flow cytometry. $n \geq 6$ per group. ns, not significant ($P > 0.05$) by Student's t test.

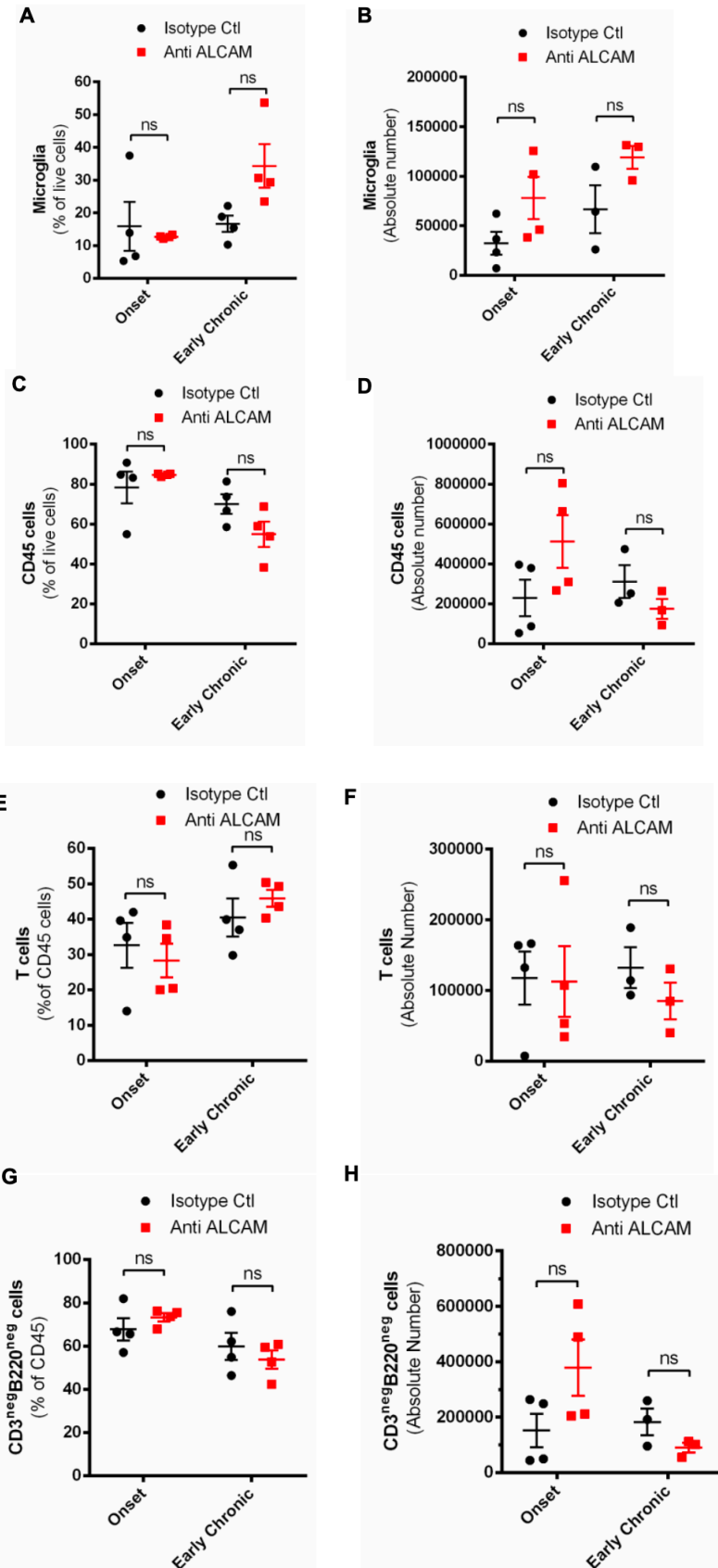


Fig. S8. Non-B lymphocyte immune cell migration into the CNS is not affected by ALCAM blockade in B lymphocyte-dependent rhMOG EAE model.

(**A, C, E, G**) Flow cytometry analysis of frequencies (mean \pm SEM) and (**B, D, F, H**) absolute numbers of (A and B) microglia, (C and D) CD45⁺, (E and F) CD3⁺ (T cells) and (G and H) CD3^{neg}B220^{neg} CNS-infiltrated cells in rhMOG-immunized mice treated with anti-ALCAM or Isotype at onset and early chronic phases of the disease. $n \geq 3$ per group. ns, not significant ($P > 0.05$) by two-way ANOVA with Bonferroni's post hoc test.

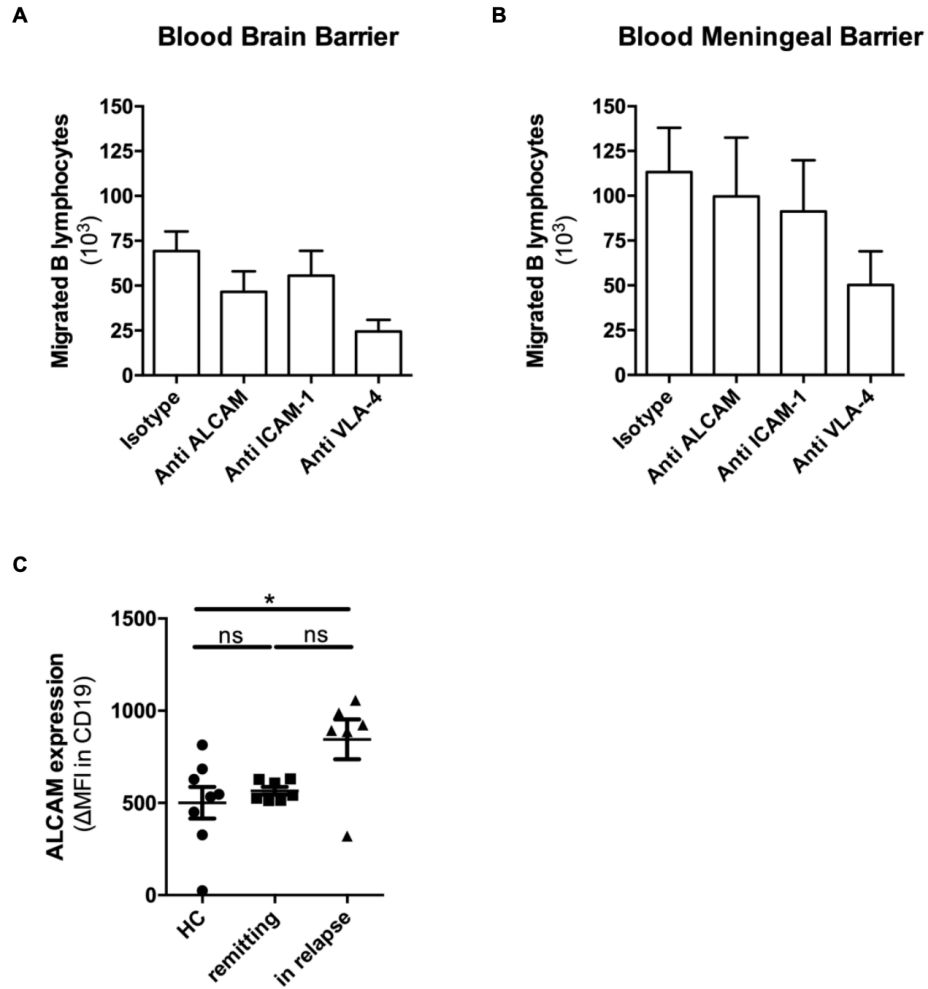


Fig. S9. ALCAM promotes the migration of human B lymphocytes across CNS barriers and is up-regulated in relapsing patients with MS.

Absolute numbers (mean \pm SEM) of migrated B lymphocytes across **(A)** BBB-ECs and **(B)** BMB-ECs after treatment with isotype control versus blocking antibodies against ALCAM, ICAM-1 or VLA-4; $n \geq 4$ per group. **(C)** Flow cytometry analysis of ALCAM median fluorescence intensity (Δ MFI over isotype) in *ex vivo* CD19 positive B lymphocytes from healthy controls (HC, $n = 8$), untreated relapsing-remitting multiple sclerosis patients during the remission phase (remitting, $n = 7$) and in relapse ($n = 7$). ns, not significant ($P > 0.05$), $*P < 0.05$ by one-way ANOVA with Bonferroni's post hoc test.

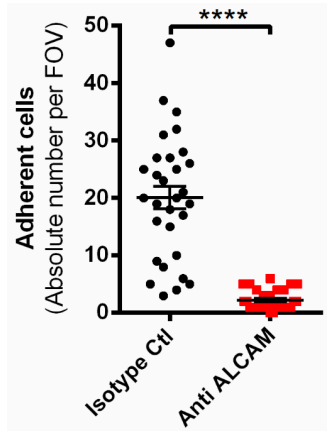


Fig. S10. ALCAM mediates the adhesion of human B lymphocytes on BBB endothelium.

Interaction of *ex vivo* human B lymphocytes pre-treated with isotype or ALCAM blocking antibody for 1h with activated primary cultures of human BBB-ECs, as assessed by dynamic flow assays. Absolute numbers of arrested (mean \pm SEM) B lymphocytes per field of view (FOV) over 20 minutes of constant flow. Data shown are representative of $n = 4$ independent experiments. **** $P < 0.0001$ by Student's t test.

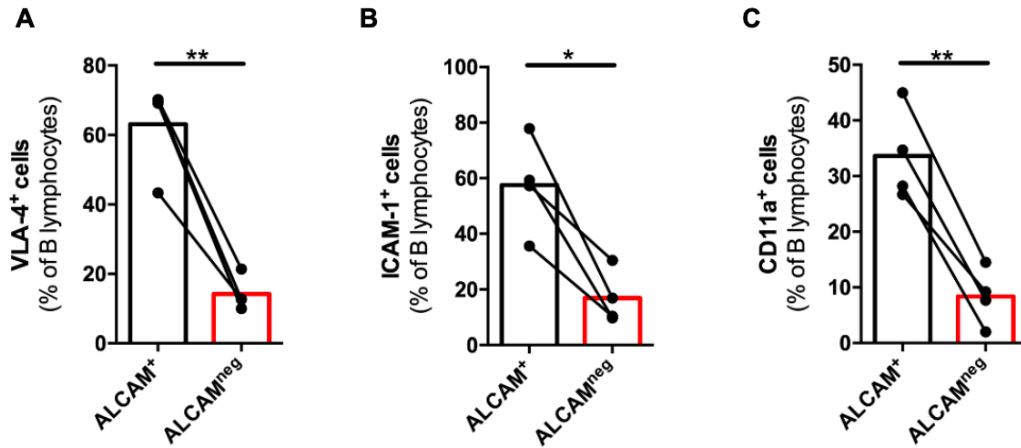


Fig. S11. Cell adhesion molecules are coexpressed on *ex vivo* B lymphocytes from PBMCs of patients with MS.

Flow cytometry analysis of frequencies of (A) VLA-4, (B) ICAM-1 and (C) CD11a cells ALCAM⁺ and ALCAM^{neg} B lymphocyte populations isolated from MS patients. Data have been collected by flow cytometry on PBMCs of $n = 4$ RRMS untreated patients. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ by paired Student's t test.

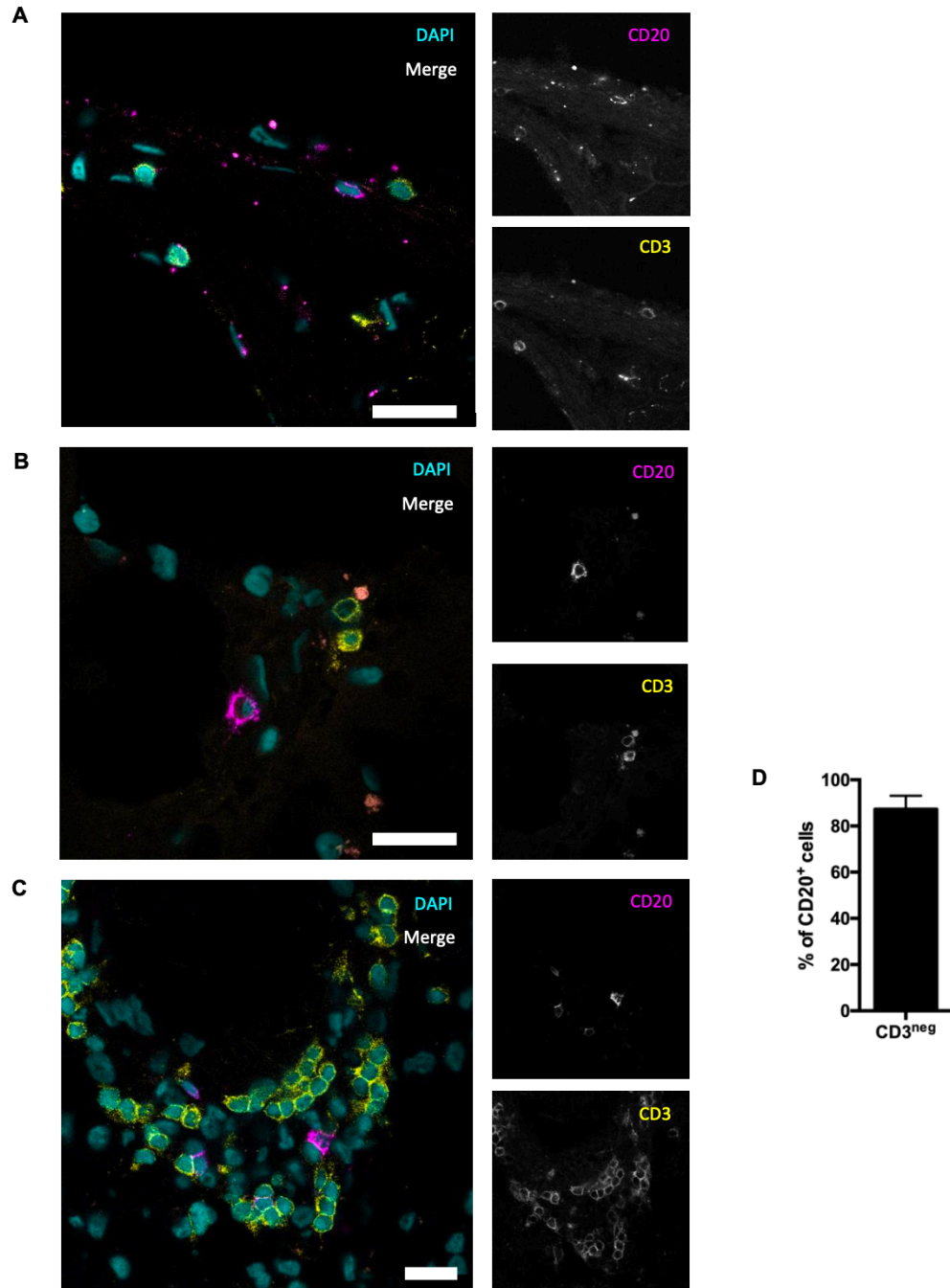


Fig. S12. Most CD20⁺ cells in MS brain immune infiltrates are not CD3⁺ cells.

Representative images of MS patients parenchymal (A) and meningeal infiltrates (B and C) immunostained for CD20 (magenta), CD3 (yellow) and nuclei (DAPI; cyan) captured by confocal microscopy. (D) Percentages (mean \pm SEM) of CD20⁺ cells that are CD3⁺ in MS brain immune

infiltrates. Data shown are representative of $n = 9$ images of 3 different patients with MS sections;
Scale bar 20 μm .

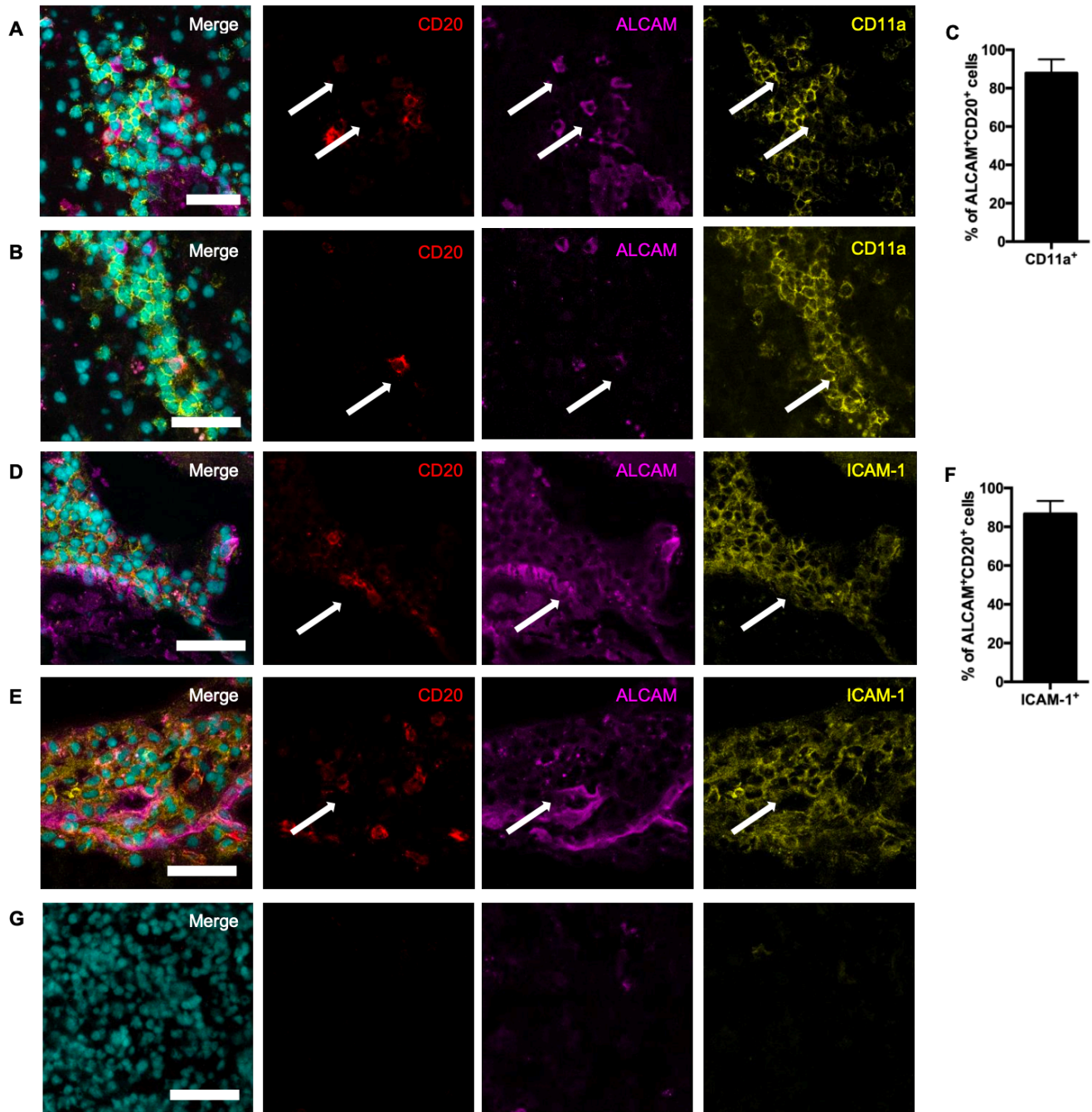


Fig. S13. Cell adhesion molecules are coexpressed on B lymphocytes in MS lesions.

Representative images of MS patients (A and B) parenchymal and (D and E) meningeal infiltrates immunostained for CD20 (red), ALCAM (magenta), (A and B) CD11a and (D and E) ICAM-1 (yellow) and nuclei (DAPI; cyan) as captured by confocal microscopy. (C and F) Respective quantifications (Mean \pm SEM) of ALCAM⁺CD20⁺ cells that are (C) CD11a⁺ and (F) ICAM-1⁺ cells; $n = 3 - 4$. (G)

Control images of human spleen stained with secondary antibodies only are presented here. Data shown are representative of $n = 3$ images of 2 different MS patients sections; Scale bar 50 μm .

Chapitre 3 – Manuscrit 2

Titre : DICAM promotes T_H17 lymphocyte trafficking across the blood-brain barrier during autoimmune neuroinflammation

Journal : Sci Transl Med. 2022 Jan 5;14(626):eabj0473.

Auteurs : Marc Charabati†, Camille Grasmuck†, Soufiane Ghannam, Lyne Bourbonnière, Antoine P. Fournier, Marc-André Lécuyer, Olivier Tastet, Hania Kebir, Rose-Marie Rébillard, Chloé Hoornaert, Elizabeth Gowing, Sandra Larouche, Olivier Fortin, Camille Pittet, Ali Filali-Mouhim, Boaz Lahav, Robert Moumdjian, Alain Bouthillier, Marc Girard, Pierre Duquette, Romain Cayrol, Evelyn Peelen, Francisco J. Quintana, Jack P. Antel, Alexander Flügel, Catherine Larochelle, Nathalie Arbour, Stephanie Zandee, Alexandre Prat

† Marc Charabati et Camille Grasmuck ont contribué également au travail

Contributions :

En tant que contributrice principale, j'ai participé de façon majeure à aux étapes clés qui ont mené à la complétion de ce manuscrit. MC, SG, AP et moi-même avons conçu l'étude. MC, SG, LB, APF, MAL, HK, RMR, CH, EG et moi-même avons effectué et analysé les expériences *in vitro*. MC, SG, APF, HK, OF, CP, SZ et moi-même avons effectué et analysé les expériences d'immunohistochimie *in situ*. MC, SG, LB, MAL, RMR, SL et moi-même avons effectué et analysé les expériences *in vivo* chez les animaux. LB, RMR, SL, BL, RM, AB, MG, PD, RC, CL et AP furent impliqués dans la collection des échantillons humains et/ou dans la caractérisation des patients. MC, OT, AFM et moi-même avons effectué les analyses bioinformatiques et statistiques des résultats. MC, AP et moi-même avons préparé les figures et écrit le manuscrit. EP, FJQ, JPA, AF, CL, NA, et SZ ont relu et amélioré le manuscrit.

DICAM promotes T_H17 lymphocyte trafficking across the blood-brain barrier during autoimmune neuroinflammation

Marc Charabati^{1,2†}, Camille Grasmuck^{1,2†}, Soufiane Ghannam^{1,2}, Lyne Bourbonnière¹, Antoine P. Fournier^{1,2}, Marc-André Lécuyer^{1,3,4}, Olivier Tastet¹, Hania Kebir^{1,3}, Rose-Marie Rébillard^{1,2}, Chloé Hoornaert^{1,2}, Elizabeth Gowing^{1,2}, Sandra Larouche¹, Olivier Fortin¹, Camille Pittet¹, Ali Filali-Mouhim¹, Boaz Lahav^{1,5}, Robert Moumdjian⁶, Alain Bouthillier⁶, Marc Girard⁵, Pierre Duquette^{1,5}, Romain Cayrol⁷, Evelyn Peelen^{1,2}, Francisco J. Quintana^{8,9}, Jack P. Antel¹⁰, Alexander Flügel⁴, Catherine Larochelle^{1,2,5}, Nathalie Arbour^{1,2}, Stephanie Zandee^{1,2}, Alexandre Prat^{1,2,5*}

¹Neuroimmunology Research Laboratory, Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM), Montreal, Quebec H2X 0A9, Canada. ²Department of Neurosciences, Faculty of Medicine, Université de Montréal, Montreal, Quebec H3T 1J4, Canada. ³Department of Microbiology, Infectious Diseases and Immunology, Faculty of Medicine, Université de Montréal, Montreal, Quebec H3T 1J4, Canada. ⁴Institute for Neuroimmunology and Multiple Sclerosis Research, University Medical Center Göttingen, Göttingen D-37073, Germany. ⁵Multiple Sclerosis Clinic, Division of Neurology, Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM), Montreal, Quebec H2L 4M1, Canada. ⁶Division of Neurosurgery, Université de Montréal and CHUM, Montreal, Quebec H2L 4M1, Canada. ⁷Department of Pathology, Université de Montréal and CHUM, Montreal, Quebec H2L 4M1, Canada. ⁸Ann Romney Carter for Neurologic Diseases, Brigham and Women's Hospital, Harvard Medical School, Boston, MA 02115, USA. ⁹Broad Institute of MIT and Harvard, Cambridge, MA 02142, USA. ¹⁰Neuroimmunology Unit, Montreal Neurological Institute and Department of Neurology and Neurosurgery, McGill University, Montreal, Quebec H3A 2B4, Canada.

*Corresponding author. Email: a.prat@umontreal.ca

†These authors contributed equally to this work.

One Sentence Summary: DICAM contributes to the pathogenesis of autoimmune neuroinflammation by promoting the migration of T_H17 lymphocytes across the blood-brain barrier.

Abstract

The migration of circulating leukocytes into the central nervous system (CNS) is a key driver of multiple sclerosis (MS) pathogenesis. The monoclonal antibody natalizumab proved that pharmaceutically obstructing this process is an effective therapeutic approach for treating relapsing-remitting MS (RRMS). Unfortunately, the clinical efficacy of natalizumab is somewhat offset by its incapacity to control the progressive forms of MS (PMS) and by life-threatening side effects in RRMS rising from the expression of its molecular target, very late antigen 4 (VLA4), on most immune cells and consequent impairment of CNS immunosurveillance. Here, we identified dual immunoglobulin domain containing cell adhesion molecule (DICAM) as a cell trafficking molecule preferentially expressed by T helper 17 (T_H17)–polarized CD4⁺ T lymphocytes. We found that DICAM expression on circulating CD4⁺ T cells was increased in patients with active RRMS and PMS disease courses, and expression of DICAM ligands was increased on the blood-brain barrier endothelium upon inflammation and in MS lesions. Last, we demonstrated that pharmaceutically neutralizing DICAM reduced murine and human T_H17 cell trafficking across the blood-brain barrier *in vitro* and *in vivo*, and alleviated disease symptoms in four distinct murine autoimmune encephalomyelitis models, including relapsing-remitting and progressive disease models. Collectively, our data highlight DICAM as a candidate therapeutic target to impede the migration of disease-inducing leukocytes into the CNS in both RRMS and PMS and suggest that blocking DICAM with a monoclonal antibody may be a promising therapeutic approach.

Introduction

Multiple sclerosis (MS) is a debilitating chronic neuroinflammatory disease of the central nervous system (CNS) affecting more than 2.2 million individuals around the world (1). At disease onset, about 90% of patients are typically diagnosed with the relapsing-remitting form of MS (RRMS),

whereas 10% present with a progressive form called primary progressive MS (PPMS). The third main form of the disease, known as secondary progressive MS (SPMS), is phenotypically similar to PPMS but typically develops in patients with RRMS in the decades after their initial diagnosis, as they transition to a disease stage with insidious progression independent of relapses. MS develops as a result of the immune system attacking the myelin sheath and triggering neuronal damage, forming typical perivascular lesions throughout the CNS and inducing neuroinflammation (2). Although there are multiple immune cell subsets involved in MS pathogenesis, the migration of retinoic acid receptor-related orphan receptor (ROR) γ t-driven interleukin-17 (IL-17)–secreting CD4⁺ T helper (T_H17) lymphocytes across the blood-brain barrier (BBB) is widely believed to be an important driver of neuroinflammation (3–7). In addition to their increase in the peripheral blood, cerebrospinal fluid, and CNS lesions in patients with MS, T_H17 lymphocytes exhibit a high encephalitogenic profile, an elevated capacity to cross and disrupt the BBB, and an association with aggravated pathology and clinical outcome (3–24). Whether T_H17 lymphocytes contribute to the pathobiology of RRMS and PMS by similar mechanisms remains ambiguous.

Immune cell trafficking across the BBB endothelium entails several conserved steps, such as leukocyte rolling on the endothelial surface, adhesion onto it, and diapedesis (25, 26). Molecularly, the migration process is orchestrated by multiple cell trafficking molecules expressed on the surface of migrating leukocytes and on the luminal surface of BBB endothelial cells (BBB-ECs) (27). This includes broadly expressed sets such as very late antigen 4 (VLA4)/vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM1) and lymphocyte function–associated antigen 1 (LFA1)/intercellular adhesion molecule 1 (ICAM1) that promote the migration of numerous immune cell subsets, as well as specific molecules whose expression and cell trafficking function are limited to distinct leukocyte subpopulations, such as melanoma cell adhesion molecule (MCAM) on T_H17 and IL-17–secreting cytotoxic CD8⁺ T (T_C17) lymphocytes, and activated leukocyte cell adhesion molecule (ALCAM) on B lymphocytes and monocytes (19, 26, 28–30). Besides MCAM, the molecular determinants implicated in the migration of human T_H17 lymphocytes across the BBB are not completely known.

Blocking immune cell migration into the CNS has already been proven as an effective therapeutic approach to treat MS. Natalizumab is an approved monoclonal antibody designed to specifically hinder this process by targeting VLA4, an integrin expressed on almost all immune cell subsets. Although the administration of natalizumab is highly efficacious for treating patients with RRMS (31–33), it was shown to be poorly effective for patients with PMS (34). In parallel, natalizumab was found to be associated with severe rebound of MS activity upon its cessation (35–38). It was also associated with life-threatening CNS infections attributed to compromised CNS immunosurveillance as a result of ubiquitous expression of VLA4 on both protective and pathogenic leukocytes (39–43). This body of evidence highlights the need to identify additional molecules involved in the selective recruitment of disease-inducing immune cell subsets in both RRMS and PMS.

Dual immunoglobulin domain containing cell adhesion molecule (DICAM), also known as limitrin and encoded by the gene *MXRA8*, is a transmembrane protein of the immunoglobulin (Ig) superfamily that interacts both homotypically (DICAM-DICAM) and heterotypically with $\alpha_v\beta_3$, an integrin known for its role in angiogenesis, tumor growth, and T cell activation (44–49). DICAM was initially described in the CNS on BBB-associated astrocytes (44) but was subsequently characterized in peripheral tissues as an epithelial cell-cell junctional protein (45), a regulator of angiogenesis (50), and a modulator of bone formation (51) and degradation (52). Here, we identify DICAM as a molecule implicated in T_H17 trafficking into the CNS. In patients with MS, we observed an up-regulation in the frequency of circulating DICAM⁺ CD4⁺ T cells and in the expression of its ligands, DICAM and $\alpha_v\beta_3$, on BBB-ECs in CNS lesions. Using a blocking monoclonal antibody and several *in vitro* and *in vivo* models, we found that DICAM contributes to neuroinflammation by promoting the migration of T_H17 lymphocytes across the BBB endothelium.

Results

DICAM is a T_H17-associated cell adhesion molecule

T_H17 lymphocytes are important contributors to neuroinflammation in both MS and experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). To identify molecules potentially involved in their trafficking into the CNS during neuroinflammation, we performed nanoflow liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) on proteins harvested from *in vitro* polarized human T_H17 lymphocytes from six healthy donors, identifying a total of 1813 unique proteins. Gene set enrichment analysis (GSEA) subsequently revealed that this list was mostly enriched for focal adhesion proteins (Fig. 1A) (53, 54). Using the Gene Ontology Molecular Function Database, we observed that 235 (13%) of the 1813 proteins were not annotated for specific functions (Fig. 1B), suggesting that they are relatively unknown, understudied, or newly discovered. To predict whether any of the unclassified proteins could be involved in cellular trafficking, we used the InterPro Domains database to identify their conserved domains and categorize them in groups with similar or related domains. The largest group consisted of 16 proteins with Ig/Ig-like domains (Fig. 1B). Because proteins with such domains include several key molecules involved in immune cell migration into the CNS, such as ICAM1, VCAM1, MCAM, and ALCAM, we carefully examined each of the 16 proteins and identified DICAM as a putative T_H17-associated cellular trafficking molecule; DICAM had also been reported to mediate cell-cell adhesion in a nonimmunological context (45).

To investigate the specificity of DICAM on T_H17 lymphocytes, we first characterized its expression on *in vitro* polarized CD4⁺ T lymphocytes by multiple approaches. Using quantitative polymerase chain reaction (qPCR), we first observed that the mRNA expression of *DICAM* in human CD4⁺ T lymphocytes is preferentially induced *in vitro* by a T_H17 polarization cytokine cocktail containing transforming growth factor (TGF)– β , IL-1 β , IL-6, and IL-23, which also induces the expression of the classic T_H17 markers *IL17* and *RORC* (Fig. 1C). Consistently, we found using qPCR, Western blot, flow cytometry, and confocal microscopy that DICAM is mostly expressed by human T_H17 lymphocytes, as compared to other *in vitro* polarized human CD4⁺ T lymphocytes (Fig. 1, D to G). Next, because our flow cytometry analysis revealed that not all T_H17 lymphocytes express DICAM

(Fig. 1F), we proceeded to examine the transcriptomic differences between DICAM⁺ and DICAM^{neg} fluorescence-activated cell sorting (FACS)–sorted T_H17 lymphocytes. DICAM⁺ T_H17 lymphocytes displayed a stronger T_H17 phenotype with greater mRNA expression of *IL17* and *RORC*, and lower expression of *IFNG* and *TBX21*, than DICAM^{neg} T_H17 lymphocytes (Fig. 1H). At the protein level, the DICAM⁺ fraction comprised more IL-17 and fewer interferon (IFN)– γ producing cells than their DICAM^{neg} counterparts, yet a similar frequency of IL-17⁺ IFN- γ ⁺ cells (Fig. 1I).

Next, to validate the physiological relevance of our findings, we analyzed the expression of DICAM on *ex vivo* CD4⁺ T lymphocytes isolated from healthy donors. qPCR and flow cytometry analyses showed that DICAM mRNA and surface protein expression are about two to three times greater in *ex vivo* memory CD45RO⁺ than in naïve CD45RA⁺ CD4⁺ T lymphocytes (Fig. 2, A to C). The frequency of DICAM⁺ memory CD45RO⁺ CD4⁺ T lymphocytes was found to positively correlate with age (Fig. 2D). Within the memory CD45RO⁺ CD4⁺ T lymphocyte fraction, we observed DICAM expression to be preferentially up-regulated on circulating T_H17 (IL-17⁺) lymphocytes as compared to T_H1 (IFN- γ ⁺) and T_H2 (IL-4⁺) lymphocytes (Fig. 2, E and F). Further in line with our *in vitro* findings, DICAM expression within T_H17 lymphocytes was inversely correlated with their IFN- γ ⁺ expression (Fig. 2G). From a different analysis standpoint, comparing DICAM⁺ versus DICAM^{neg} *ex vivo* memory CD45RO⁺ CD4⁺ T lymphocytes further validated our findings by demonstrating that the DICAM⁺ fraction expressed about three times less IFN- γ , about four times more IL-4, comparable frequency of IL-10, and about 14 times more IL-17 (Fig. 2, H to K). Last, the correlation between DICAM and IL-17 was also detected within individual donors (Fig. 2L). The combination of these observations allowed us to conclude that DICAM expression on circulating human CD4⁺ T lymphocytes is tightly associated with a T_H17 profile.

The expression of DICAM on circulating CD4⁺ T lymphocytes is up-regulated in patients with active RRMS and PMS

T_H17 lymphocytes were reported to be up-regulated in the peripheral blood of patients with MS and have been implicated in MS pathobiology. To investigate whether DICAM is potentially involved in MS, we analyzed its expression in blood samples from patients with MS by flow cytometry and correlated expression with clinical and radiological parameters reflective of

disease activity. First, we observed that the frequency of circulating DICAM⁺ memory CD45RO⁺ CD4⁺ T lymphocytes was up-regulated only in untreated patients with clinically active RRMS, SPMS, or PPMS disease courses when compared to patients with clinically inactive diseases ($P = 0.0082$, $P = 0.1527$, and $P = 0.0040$, respectively) or age- and sex-matched untreated healthy controls ($P = 0.0107$, $P = 0.0318$, and $P = 0.0099$, respectively) (Fig. 3, A to C). Second, the frequency of circulating DICAM⁺ memory CD45RO⁺ CD4⁺ T lymphocytes positively correlated with $\Delta T2$ lesions measured by magnetic resonance imaging (MRI) in patients with all the three forms of MS and was significantly ($P = 0.0087$, $P = 0.0029$, and $P = 0.0016$ in patients with RRMS, SPMS, and PPMS, respectively) increased in patients with two or more $\Delta T2$ lesions (Fig. 3, D to I).

Unexpectedly, the frequency of circulating DICAM⁺ memory CD45RO⁺ CD4⁺ T lymphocytes was found to negatively correlate with age in patients with RRMS (Fig. 3J), unlike in healthy donors (Fig. 2D) and in patients with PMS (Fig. 3, K and L). In SPMS and PPMS, no correlation with age was observed (Fig. 3, K and L). Regardless, with age as a confounding factor in a multivariate logistic regression model featuring disease activity as outcome, the association between DICAM and MS disease activity became even stronger across all MS disease forms and mostly in patients with RRMS. The odds ratios increased from 1.92 to 5.56 (+65%) in RRMS, 1.34 to 1.37 (+2.2%) in SPMS, and 1.38 to 1.45 (+4.8%) in PPMS (table S1). The observations made using blood samples from patients with MS support our hypothesis that DICAM is implicated in MS pathophysiology.

DICAM ligands are up-regulated on BBB endothelium under inflammatory conditions and in MS lesions

DICAM was previously described as capable of homophilic and heterophilic interactions with DICAM and $\alpha_v\beta_3$ integrin, respectively (45). After confirming *in vitro* that human T_H17 lymphocytes can indeed adhere to both ligands, whereas T_H1 lymphocytes only adhere to $\alpha_v\beta_3$ (Fig. 4A and fig. S1), we sought to investigate the expression of both ligands on the BBB endothelium, which represents a major CNS point of entry for proinflammatory leukocytes in MS. Using qPCR (Fig. 4B) and flow cytometry (Fig. 4C), we observed that primary cultures of human BBB-ECs express both ligands in patterns comparable to the prototypical cell adhesion molecules ICAM1 and VCAM1. Indeed, both DICAM and $\alpha_v\beta_3$ were detected under homeostatic conditions and their expression

was further up-regulated upon inflammatory stimulus (Fig. 4, B and C). In postmortem human brain tissue, the expression of DICAM and $\alpha_v\beta_3$ colocalized with markers of BBB-ECs (VE-cadherin, CD31) and were increased in MS lesions as compared to control brain tissue (Fig. 4, D to G), suggesting that the expression of DICAM ligands on BBB endothelium is associated with neuroinflammation and MS.

DICAM promotes the migration of T_H17 lymphocytes across the BBB during neuroinflammation

DICAM is a cell adhesion molecule with conserved Ig domains and homology to members of the junctional adhesion molecule (JAM) family, which includes molecules known to mediate leukocyte-EC interactions (44, 45, 55, 56). To determine whether DICAM mediates T_H17 cellular interactions with the BBB, we treated *in vitro* polarized murine T_H17 lymphocytes with a DICAM blocking monoclonal antibody (clone 9E9) (figs. S2 and S3) and analyzed their interactions with primary cultures of murine BBB-ECs under dynamic flow, which mirrors blood circulation in the CNS microvasculature. Blocking DICAM resulted in a statistically significant ($P = 0.0010$) increase in the velocity of flowing T_H17 lymphocytes and a decrease in their firm adhesion (arrest) on BBB-ECs (Fig. 5, A to C), suggesting that DICAM is involved in T_H17 rolling on the BBB luminal surface and their adhesion onto it. To examine the physiological relevance of these findings, we measured the impact of blocking DICAM on the trafficking of disease-inducing leukocytes into the CNS using two-photon intravital microscopy in C57BL/6 mice with passive EAE, which is induced by adoptively transferring myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG_{35–55})-reactive leukocytes into naïve C57BL/6 animals. We chose this model to ensure that any potential observations would mostly result from the impact of blocking DICAM on immune cell migration and not also on immune cell activation in the periphery. As compared to isotype-treated animals, two-photon intravital imaging showed decreased leukocyte infiltration into the CNS at disease onset in mice that received anti-DICAM treatment starting from day 2 post-EAE induction (Fig. 5, D and E). Flow cytometry analysis of CNS infiltrating leukocytes further confirmed these observations and revealed that blocking DICAM impaired the trafficking of disease-inducing CD4⁺ T lymphocytes into the CNS at disease onset (Fig. 5F).

To corroborate our murine findings in humans, we first measured the impact of blocking DICAM with a monoclonal antibody on the *in vitro* adhesion of T_H1 and T_H17 lymphocytes to primary cultures of human BBB-ECs. As expected, the presence of anti-DICAM antibody had no effect on T_H1 adhesion on BBB-ECs (Fig. 5G) whereas it reduced adhesion of human T_H17 lymphocytes (Fig. 5H). By conducting *in vitro* migration experiments using a modified Boyden chamber coated with a monolayer of human BBB-ECs, we further demonstrated how neutralizing DICAM with the monoclonal antibody significantly ($P = 0.0005$) impaired the trafficking of human T_H17 across BBB-ECs (Fig. 5I). Indeed, the presence of DICAM⁺ CD4⁺ and T_H17 (IL-17⁺) cells could be detected by confocal microscopy in MS brain lesions in close proximity to the BBB (Fig. 5J). Together, we demonstrated that DICAM is involved in several cell trafficking steps, thereby enabling T_H17 lymphocytes to cross the BBB and accumulate in the CNS of EAE mice and patients with MS.

Blocking DICAM with a monoclonal antibody alleviates relapsing-remitting and progressive symptoms in multiple EAE models

Our findings provided strong evidence that DICAM contributes to the *in vivo* development of autoimmune neuroinflammation. To evaluate the clinical impact of pharmacologically targeting DICAM, we used two different murine models. DICAM blocking monoclonal antibody (clone 9E9) or isotype control were injected prophylactically in C57BL/6 mice with passive EAE or therapeutically in C57BL/6 mice with active EAE (70 mg/kg; seven intraperitoneal treatments of 200 µg each; injected every other day; starting before or after disease onset, respectively). These two experimental paradigms were selected to maximize the clinical effect that would result from targeting DICAM-mediated immune cell migration into the CNS and minimize avoidable side effects that could rise from collaterally interfering with EAE-exclusive disease mechanisms. More specifically, the administration of a therapeutic treatment regimen in active EAE is thought to circumvent most of the presymptomatic subcutaneous leukocyte priming events, a disease phase that does not occur in MS. In addition, this paradigm tends to offer a generally more appreciated clinical relevance because patients with MS are also treated in a therapeutic fashion after symptom manifestation.

In both EAE models, we observed that the administration of anti-DICAM antibody attenuated disease severity (Fig. 6A and fig. S4). In the therapeutic paradigm, the average EAE score of mice treated with anti-DICAM antibody remained stable at about 2.5 to 3 and was accompanied by less weight loss from as early as the first injection (Fig. 6, A and B). In agreement with our results demonstrating the involvement of DICAM in T_H17 migration across the BBB, we found that the therapeutic administration of anti-DICAM antibody decreased the number of CNS infiltrating IL-17⁺ (T_H17) but not IFN- γ ⁺ (T_H1) or IFN- γ ⁺ IL-17⁺ double producing CD4⁺ T lymphocytes, as measured by flow cytometry at peak of disease (Fig. 6C). Confocal microscopy analysis corroborated the decrease in number and frequency of IL-17⁺ CD4⁺ cells that had infiltrated the spinal cord at peak of disease (Fig. 6, D to F).

The standard regimen of the anti-VLA4 monoclonal antibody natalizumab in patients with MS is a single injection of about 5 mg/kg (300 mg injection) every 4 weeks. Allometric scaling of this dosage based on body surface area factor as per published guidelines (57) equates it to about 0.4 mg/kg in mouse. To investigate whether a comparable dosage of our anti-DICAM monoclonal antibody (clone 9E9) could similarly influence disease development, we administered 0.2 mg/kg anti-DICAM antibody or isotype control (10 intraperitoneal treatments of 400 ng each; injected every other day starting at day 4) in two preclinical mouse models of MS. For these experiments, we used the TCR1640 SJL/J passive EAE models, in which the adoptive transfer of reactivated splenocytes from TCR1640 mice into naïve SJL/J mice causes female and male mice to mostly develop relapsing-remitting and progressive diseases, respectively, similarly to human RRMS and PMS (58, 59). We chose to administer the treatment in these two models prophylactically to maximize its potential impact, especially after having lowered its dosage by about 350-fold. This experimental paradigm should also carry low risk of off-site targeting because passive EAE features no subcutaneous priming phase.

In female mice with relapsing-remitting EAE, administering the anti-DICAM antibody globally alleviated disease severity from first treatment onward (Fig. 7A). Analysis of disease development in individual female mice showed that, although blocking DICAM did not affect the number of relapses (defined as increases of ≥ 2 in score) experienced by each mouse, it significantly ($P = 0.0010$) reduced their severity (maximum relapse score) (Fig. 7, B and C). It also increased the

number of remissions (defined as decreases to a score ≤ 1 after a relapse) and their amplitude (Δ decrease in score after a relapse) experienced by each female mouse (Fig. 7, D and E). In male mice where progressive EAE is most often observed, anti-DICAM treatments reduced disease severity about 2 weeks after initiation of treatments and until the end of the study (Fig. 7F). Examination of individual male mice further revealed that blocking DICAM converted the progressive clinical symptoms to a disease course with more frequent ($P = 0.0194$) relapses with no change in severity ($P = 0.0983$), intercalated by an increased number of remissions ($P = 0.0342$) with greater amplitude ($P = 0.0107$) (Fig. 7, G to J). Collectively, our findings demonstrate that pharmaceutically blocking DICAM with a monoclonal antibody is a promising therapeutic approach for treating MS in the clinic.

Discussion

The migration of pathogenic immune cell subsets from circulation into the CNS parenchyma is crucial for the development of MS. The clinical efficacy of natalizumab demonstrated the therapeutic benefit of pharmaceutically obstructing this step. However, its collateral damage to CNS immunosurveillance and failure to control PMS motivated us to seek new mediators of CNS immune infiltration that are specific to the disease-inducing immune cell subsets involved in RRMS as well as in PMS. In the present manuscript, we identified DICAM as a key molecule involved in T_H17 cell trafficking across the BBB and into the CNS, whose expression and that of its ligands are up-regulated in MS, and which promotes both relapsing-remitting and progressive autoimmune neuroinflammation in mouse.

T_H17 lymphocytes are widely considered to be pathogenic in the context of RRMS (3, 4, 6, 8–15, 17–24). An increasing number of studies have suggested that they also contribute to the pathogenesis of PMS (5, 8, 11, 14, 16, 18, 19, 21, 23, 24). Yet, the exact molecular determinants of their CNS trafficking have not been fully elucidated. Here, we showed a strong association between the expression of DICAM and the human T_H17 phenotype. Within the T_H17 population, we further demonstrated that DICAM expression enriches for IL-17⁺ but not IFN- γ ⁺ cells, a subset occasionally referred to in the literature as T_H1 -like T_H17 or $T_H17.1$. In contrast, we previously

showed that MCAM, another T_H17 trafficking molecule that structurally resembles DICAM—they both belong to the Ig superfamily of proteins and feature two v-type Ig-like ectodomains—is preferentially up-regulated on T_H17.1 lymphocytes (6, 19, 60, 61). The complementary expression profiles of DICAM and MCAM therefore suggest that similar cell adhesion molecules span the different subset arms of T_H17 lymphocytes. Whether surface molecules besides DICAM and MCAM characterize the different T_H17 subsets is certainly a question in need of future investigation.

With direct relevance to MS, our current data demonstrate that the frequency of circulating DICAM⁺ memory CD4⁺ T cells is preferentially increased in patients with clinically and radiologically active RRMS, SPMS, and PPMS. The correlation of DICAM with clinically active disease was found to be even more pronounced in older patients with PMS who are usually affected by a worse degree of disability. Considering the strong link between DICAM expression and T_H17 lymphocytes, our findings concur with several publications indicating that circulating T_H17 lymphocytes are up-regulated in both RRMS and PMS (8–12, 14–17, 19–21, 24). By showing that DICAM predominantly identifies circulating IFN- γ ^{neg} IL-17⁺ T_H17 lymphocytes but not IFN- γ ⁺ IL-17⁺ T_H17.1 cells, our data suggest that different T_H17 subsets might be present in different frequencies, and thus play different roles, in different MS disease forms and stages. Indeed, circulating IFN- γ ^{neg} IL-17⁺ T_H17 lymphocytes were reported as up-regulated in patients with both SPMS and PPMS (24). In contrast, circulating IFN- γ ⁺ IL-17⁺ T_H17.1 cells, which are believed to be highly pathogenic in MS because of their aggressive profile *in vitro* and *in vivo*, were shown to be increased in patients with RRMS but not PMS (6, 11, 21, 62). Correspondingly, in EAE, the group of M. Rangachari demonstrated that IL-17 production by CNS-infiltrating T_H17 lymphocytes is associated with both rapidly lethal and slow chronic progressive diseases, but that IFN- γ production by the same subpopulation is more associated with the former than latter disease phenotype (63). On the basis of our data and the current literature, we hypothesize that IFN- γ ⁺ IL-17⁺ T_H17.1 lymphocytes, characterized by MCAM expression, are mainly involved in RRMS pathogenesis, whereas IFN- γ ^{neg} IL-17⁺ T_H17 lymphocytes, mostly identified by DICAM expression, represent a pathological subset that contributes to both MS relapses and progression.

DICAM is a relatively understudied cell adhesion molecule with scarce material that is commercially available for its investigation. A PubMed search for publications with the keyword “DICAM” or its aliases (“MXRA8” and “Limitrin”) in their title yielded 14 hits as of 1 September 2021, compared to more than 500 for VLA4 and more than 400 for MCAM. To interrogate the role of DICAM in neuroinflammation, we generated and validated a monoclonal blocking antibody (clone 9E9) compatible with both human and murine DICAM. By combining this tool with various *in vitro* and *in vivo* approaches, we were able to gain valuable insight into the expression and function of DICAM on both human and murine T_H17 lymphocytes. We observed that the neutralization of DICAM hinders several of the steps leading to T_H17 lymphocyte migration across BBB-ECs, including their adhesion, in agreement with the previously described adhesive molecular properties of DICAM (45). Furthermore, we showed that pharmaceutically targeting DICAM in MOG_{35–55} active EAE experiments in C57BL/6 female mice reduced clinical disease development while impairing the infiltration of IL-17⁺ but not IFN- γ ⁺ CD4⁺ T lymphocytes into the CNS. In mouse models of different CNS viral infections (64–66) and in natalizumab-treated patients with MS who developed John Cunningham polyomavirus CNS infections (67–69), the presence of IFN- γ ⁺ CD4⁺ T lymphocytes in the CNS was reported as key for resistance against or clearance of the virus. By sparing the migration of IFN- γ ⁺ CD4⁺ T lymphocytes into the CNS, our data thus suggest that, unlike natalizumab, an anti-DICAM monoclonal antibody might indeed be capable of alleviating MS symptoms without severely compromising the host’s protective CNS immunosurveillance. Last, in TCR1640 passive EAE models where female and male SJL mice develop diseases reflective of RRMS and PMS, respectively (29, 58, 59, 70), we observed that administering clinically relevant doses of the anti-DICAM antibody attenuated both relapses and progression, and improved remission and recovery. Together, our findings suggest that blocking DICAM with a monoclonal antibody is a potentially safe and beneficial therapeutic strategy to selectively suppress the trafficking of disease-inducing leukocytes into the CNS in both RRMS and PMS.

We also report the expression of DICAM on BBB-ECs and its up-regulation in inflammation, in line with its expression profile on ECs and epithelial cells in peripheral tissues (45, 50, 71). Because DICAM on epithelial cells was described to regulate angiogenesis and stabilize cellular junctions,

it is likely that it plays similar functions also on BBB-ECs (50, 71). In this regard, DICAM on BBB-ECs would be reminiscent of other MS-related trafficking molecules like ALCAM and JAM-L, which have been shown to play double functions as junctional proteins and mediators of CNS immune cell trafficking (28, 30, 55, 72). Together, these notions establish DICAM as a marker of BBB-ECs and as a conserved component of cellular barriers' response to inflammation. Whether the latter represents a safety concern for pharmaceutical off-target side effects in human disease remains to be defined.

Although the scope of our study did not include deciphering the signaling events or transcription factors leading to DICAM expression in CD4⁺ T lymphocytes, our current observations lay the groundwork for future attempts at solving this question. By showing that DICAM expression is specifically induced by T_H17-polarizing conditions, whereas *RORC* expression is induced by other cytokine combinations as well, we provide indirect evidence that the molecular regulation of DICAM expression in T_H17-differentiating CD4⁺ T lymphocytes occurs upstream or in parallel to that of *RORC*. We further speculate that the intracellular signaling events leading to DICAM expression in CD4⁺ T lymphocytes likely involve the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/AKT/mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway, which was demonstrated to coincidentally induce DICAM expression in peripheral ECs (50), regulate RORγt nuclear translocation during T_H17 differentiation (73), and promote the increased migration activity of T_H17 lymphocytes in children with the autoimmune inflammatory disease lupus nephritis (74). It would therefore be intriguing to explore whether the PI3K/AKT/mTOR pathway underlies the up-regulation of DICAM in patients with MS in light of its emergence as a possible contributor to disease (75, 76).

Our study has limitations. First, it did not explore the expression of DICAM on immune cell subpopulations other than CD4⁺ T lymphocytes or its involvement in their migration into the CNS during autoimmune neuroinflammation. Second, it did not directly evaluate the health risks associated with pharmaceutically targeting DICAM, for example, by measuring its impact on antiviral responses in models of CNS infection. Third, it did not feature head-to-head *in vitro* or *in vivo* comparisons of the clinical efficacy of DICAM blocking monoclonal antibody with that of VLA4 blocking monoclonal antibodies such as natalizumab or its murine equivalents. Addressing these

limitations in future works will be essential for adapting DICAM blocking monoclonal antibody for human testing.

In conclusion, despite its efficacy for treating RRMS, the drawbacks associated with natalizumab generate an important need for a superior replacement. Ideally, the next-generation anti-CNS trafficking therapies ought to be effective for both RRMS and PMS while causing minimal adverse events. In this study, we identified DICAM as a T_H17 trafficking molecule that promoted their migration across the human and murine BBB. We showed that DICAM expression was up-regulated in circulation in patients with active RRMS and PMS disease courses and in MS brain lesions. Last, we demonstrated in four different EAE models that blocking DICAM with a monoclonal antibody attenuated autoimmune neuroinflammation. Overall, this study provides proof of concept that pharmaceutically targeting DICAM is a potentially effective therapeutic avenue to treat all forms of MS.

Materials and methods

Study design

The main goals of this study were to characterize the expression of the cell adhesion molecule DICAM, to investigate its role in mediating the migration of T_H17 lymphocytes across the BBB, and to evaluate the impact of blocking DICAM using a monoclonal antibody on autoimmune neuroinflammation. The former was accomplished using a combination of complementary approaches that include LC-MS/MS, qPCR, Western blot, flow cytometry, and confocal microscopy performed on *in vitro* differentiated CD4⁺ T lymphocytes, PBMCs, primary cultures of human BBB-ECs, or frozen tissue sections from patients with MS or control donors. To define the role and contribution of DICAM, we performed *in vitro* adhesion, *in vitro* flow adhesion, and *in vitro* migration assays, as well as *in vivo* two-photon laser scanning microscopy experiments and EAE models. The treatment and daily assessment of EAE clinical scores were performed by a blinded investigator. Where applicable, all experiments featured at least three technical or biological replicates and were conducted at least as three independent experiments. The

technical and biological replicates of each experiment are stated in figure legends. The primary data are reported in data file S1.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using GraphPad Prism 6.0 and R software (The R Foundation for Statistical Computing, www.R-project.org). Results are presented as means \pm SEM or as descriptive illustrations, representative images, density plots, linear regressions, histograms, or box-and-whisker plots. Paired or unpaired Student's *t* tests, Wilcoxon-Mann-Whitney tests, or one-way analysis of variance (ANOVA) tests were performed followed by the appropriate post hoc test when more than two groups were compared. Only *P* values ≤ 0.05 were considered statistically significant. Not significant (ns) was sometimes stated to emphasize the lack of statistical significance when comparing two groups of data.

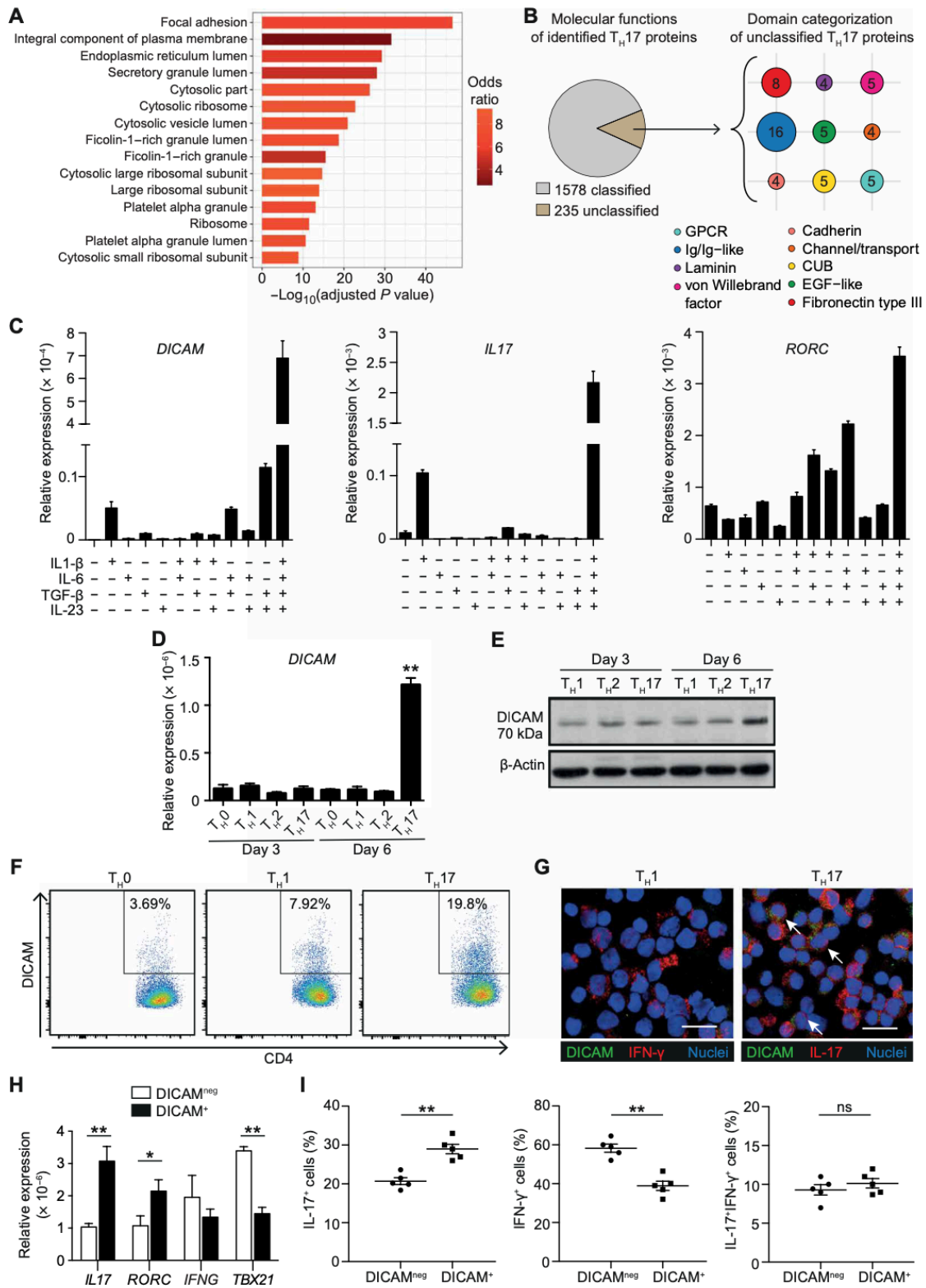


Fig. 1. *DICAM* is a cell adhesion molecule that is strongly associated with the human T_H17 phenotype

Fig. 1. DICAM is a cell adhesion molecule that is strongly associated with the human T_H17 phenotype. (A and B) Mass spectrometry analysis allowed the identification of 1813 proteins harvested from *in vitro* differentiated T_H17 lymphocytes from six healthy donors. (A) Gene enrichment of the 1813 proteins is shown as analyzed on the basis of cellular component. (B) The left pie chart shows gene classification of the 1813 proteins according to molecular function; the right panel shows categorization of the 235 T_H17 proteins with unclassified molecular functions based on conserved domains. (C) *DICAM*, *IL17*, and *RORC* mRNA expression is shown in CD4⁺ T lymphocytes stimulated *in vitro* for 6 days with combinations of IL-1 β , IL-6, TGF- β , and IL-23 cytokines, relative to *18S* and as measured by qPCR; $n = 3$ in triplicates. (D) *DICAM* mRNA expression relative to *18S*, and (E) protein expression is shown in T_H0, T_H1, T_H2, and T_H17 cells differentiated *in vitro* for 3 or 6 days, as measured by qPCR ($n \geq 4$) and Western blot (representative of $n = 5$), respectively; $**P < 0.01$ by one-way ANOVA with Fisher's least significant difference (LSD) post hoc test. (F) Representative density plots of DICAM surface expression are shown for T_H0, T_H1, and T_H17 cells differentiated *in vitro* for 6 days, as measured by flow cytometry; $n = 3$. (G) Representative images are shown of T_H1 and T_H17 cells differentiated *in vitro* for 6 days and immunostained for DICAM (green), IFN- γ or IL-17 (red), and nuclei (TOPRO-3, blue), as acquired by confocal microscopy; arrows indicate DICAM and IL-17 double-positive cells; scale bars, 25 μm ; $n = 3$. (H) *IL17*, *RORC*, *IFNG*, and *TBX21* mRNA expression relative to *18S*, and (I) frequencies (means \pm SEM) of IL-17 or IFN- γ expression are shown in DICAM⁺ versus DICAM^{neg} FACS-sorted T_H17 cells differentiated *in vitro* for 6 days, as measured by qPCR and flow cytometry, respectively; $n = 3$ to 5; not significant (ns), $*P < 0.05$, and $**P < 0.01$, by (H) one-way ANOVA with Fisher's LSD post hoc test or (I) Wilcoxon-Mann-Whitney test.

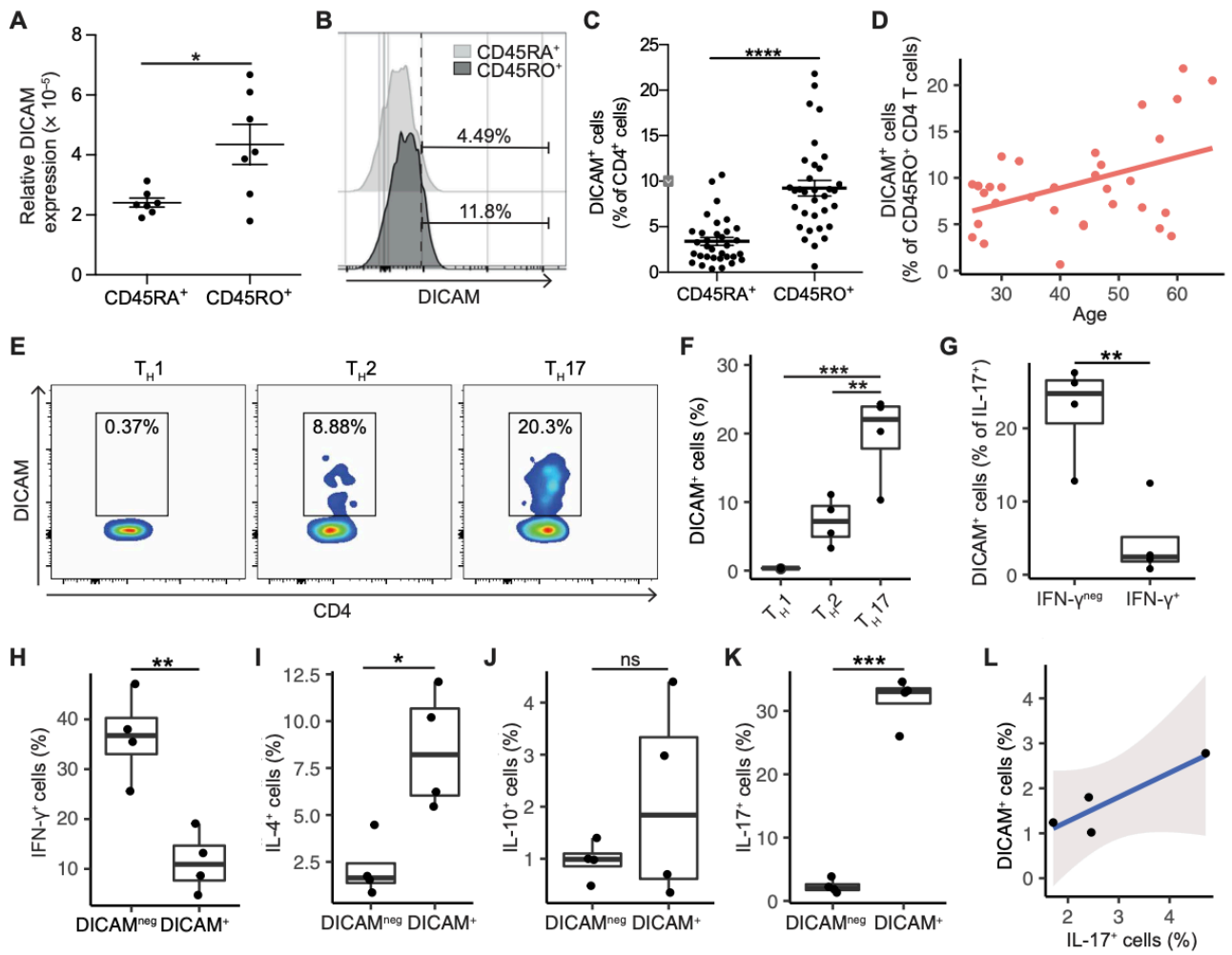


Fig. 2. DICAM is preferentially expressed on circulating IL-17⁺ memory CD4⁺ T lymphocytes.

Fig. 2. DICAM is preferentially expressed on circulating IL-17⁺ memory CD4⁺ T lymphocytes. (A) *DICAM* mRNA expression relative to *18S* is shown in *ex vivo* CD45RA⁺ (naïve) and CD45RO⁺ (memory) CD4⁺ T lymphocytes isolated from healthy controls (HC), as measured by qPCR; $n = 6$; $**P < 0.01$ by paired *t* test. (B) Representative histogram, (C) quantifications (means \pm SEM), and (D) correlation with donor age (years old) are shown for the frequency of DICAM surface expression on *ex vivo* CD45RA⁺ or CD45RO⁺ CD4⁺ T cells isolated from HC, as measured by flow cytometry; $n = 33$; $****P < 0.0001$ by paired *t* test. (E) Representative density plots and (F and G) box-and-whisker plots show the frequency of DICAM surface expression on *ex vivo* memory IFN- γ ⁺ (T_H1), IL-4⁺ (T_H2), IL-17⁺ (T_H17), IFN- γ ^{neg} T_H17, and IFN- γ ⁺ T_H17 lymphocytes isolated from HC, as measured by flow cytometry; $n = 4$; $**P < 0.01$ and $***P < 0.001$, by one-way ANOVA with Tukey's post hoc test. (H to K) Box-and-whisker plots show frequencies of (H) IFN- γ , (I) IL-4, (J) IL-10, and (K) IL-17 expression on *ex vivo* DICAM⁺ versus DICAM^{neg} memory CD4⁺ T lymphocytes; $n = 4$; ns, $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, and $***P < 0.001$, by Student's *t* test. (L) A correlation of the frequencies of IL-17 and DICAM expression on *ex vivo* memory CD4⁺ T lymphocytes isolated from HC is shown per donor; $n = 4$.

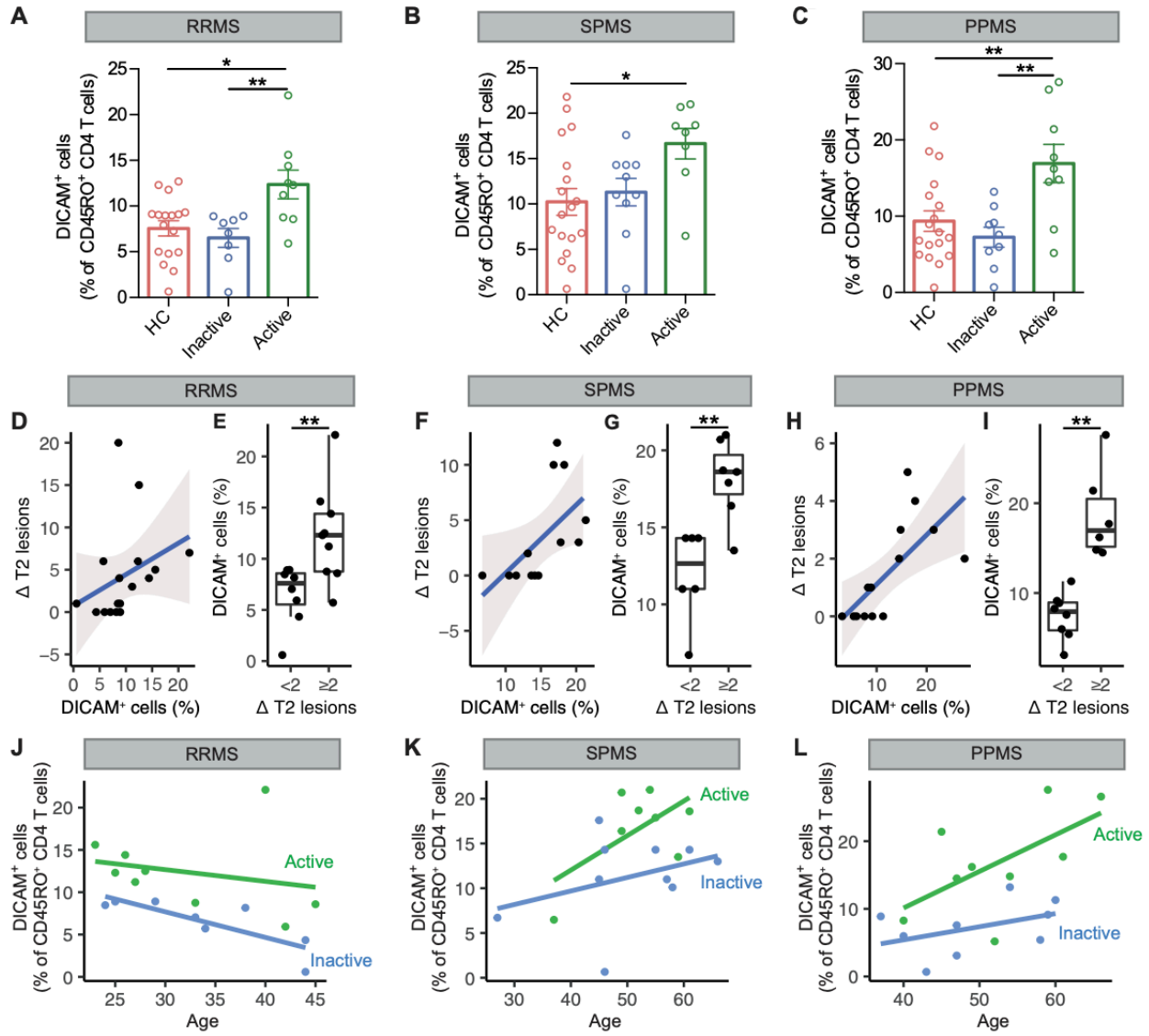


Fig. 3. DICAM expression on memory CD4⁺ T lymphocytes in the peripheral blood of patients with MS is correlated with active disease courses.

Fig. 3. DICAM expression on memory CD4⁺ T lymphocytes in the peripheral blood of patients with MS is correlated with active disease courses. (A to C) Frequency (means \pm SEM) of DICAM surface expression on *ex vivo* CD45RO⁺ (memory) CD4⁺ T lymphocytes isolated from patients with different forms of MS and age-/sex-matched HCs was measured by flow cytometry; * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$, by one-way ANOVA with Bonferroni's post hoc test. (A) Relapsing-remitting MS (RRMS) was defined as active when patients had ≥ 1 relapse in the 5 years before blood draw, or otherwise as inactive; $n = 9$ patients with active RRMS, $n = 8$ patients with inactive RRMS, and $n = 17$ HC. (B and C) Secondary progressive MS (SPMS) and primary-progressive MS (PPMS) were defined as active when patients experienced a Δ EDSS of ≥ 1 over the 5 years before blood draw, or otherwise as inactive. (B) $n = 8$ patients with active SPMS, $n = 10$ patients with inactive SPMS, and $n = 18$ HC. (C) $n = 9$ patients with active PPMS, $n = 9$ patients with inactive PPMS, and $n = 18$ HC. (D to I) Frequency of DICAM surface expression is shown for *ex vivo* memory CD4⁺ T cells isolated from patients with different forms of MS, as measured by flow cytometry, (D, F, and H) correlated with Δ T2 lesions, and (E, G, and I) quantified (box-and-whisker plots) in patients with < 2 versus ≥ 2 Δ T2 lesions, all assessed by MRI in patients with MS at the time of the blood draw versus 1 to 2 years later. $n = 17$ patients with RRMS are shown in (D) and (E); $n = 13$ patients with SPMS are shown in (F) and (G); and $n = 14$ patients with PPMS are shown in (H) and (I). Data in (E), (G), and (I) were compared by Student's *t* test; ** $P < 0.01$. (J to L) Correlations are shown for the frequencies of DICAM surface expression on *ex vivo* memory CD4⁺ T lymphocytes isolated from the patients with MS described in (A) to (C) with age (years old) at blood draw.

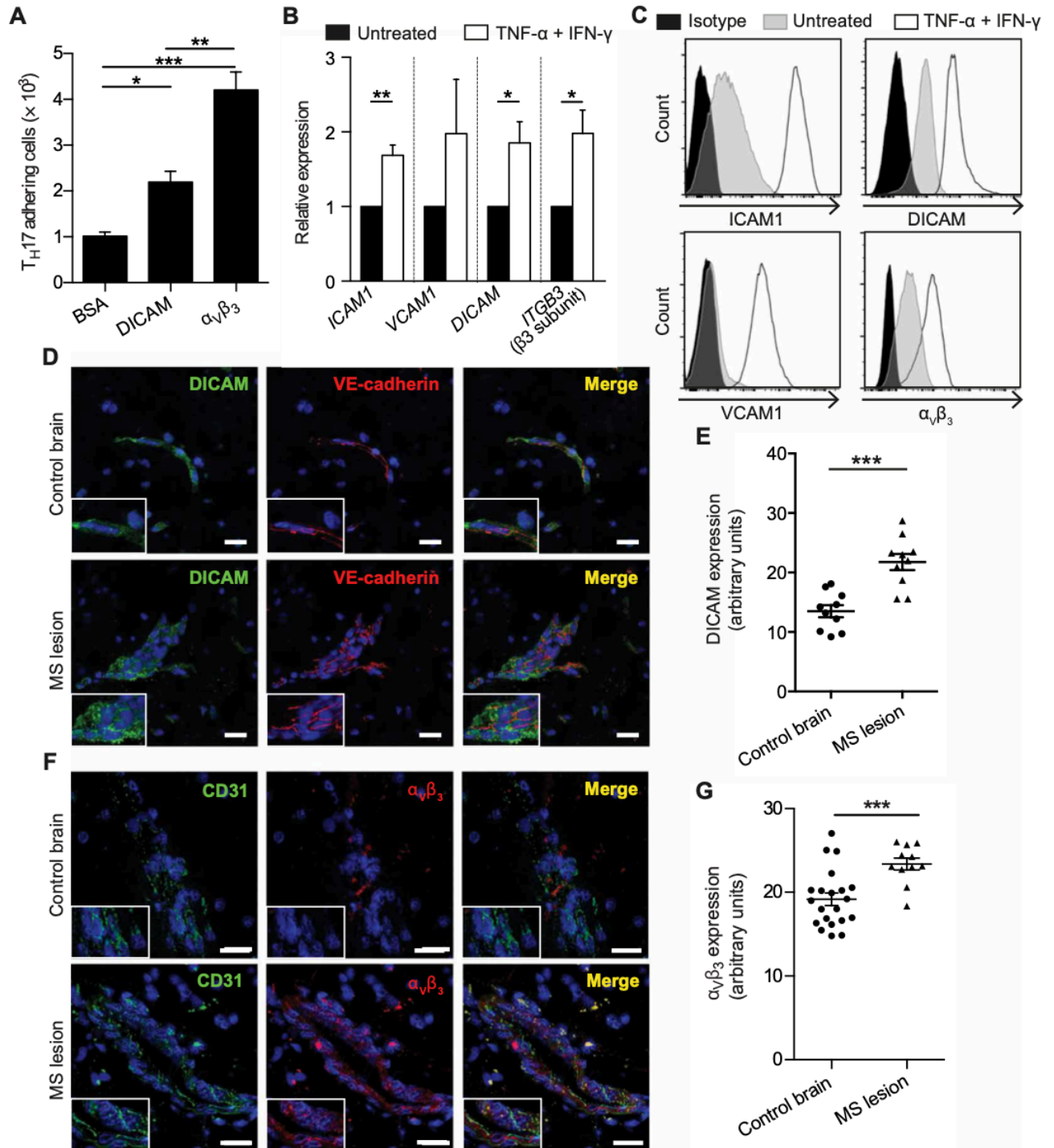


Fig. 4. The expression of DICAM ligands on blood-brain barrier endothelial cells is up-regulated under inflammatory conditions and in MS lesions.

Fig. 4. The expression of DICAM ligands on blood-brain barrier endothelial cells is up-regulated under inflammatory conditions and in MS lesions. (A) Absolute numbers (means \pm SEM) of human *in vitro* differentiated T_H17 lymphocytes adherent to plate-bound bovine serum albumin, DICAM, or $\alpha_v\beta_3$ are shown; $n = 3$; $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, and $***P < 0.001$, by one-way ANOVA with Tukey's post hoc test. (B) *ICAM1*, *VCAM1*, *DICAM*, and *ITGB3* (β_3 subunit) mRNA expression is shown for primary cultures of human BBB-ECs under resting conditions (black) or after stimulation with IFN- γ and tumor necrosis factor (TNF)- α (white), relative to mRNA abundance under resting conditions; $n = 3$ in triplicate; $*P < 0.05$ and $**P < 0.01$ by Student's *t* test. (C) Representative histograms of *ICAM1*, *DICAM*, *VCAM1*, and $\alpha_v\beta_3$ expression on BBB-ECs are shown under resting conditions (gray), after stimulation with IFN- γ and TNF- α (white), or upon incubation with isotype control (black), as analyzed by flow cytometry; representative of $n = 4$. (D and F) Representative images (scale bars, 25 μm) and (E and G) quantification (means \pm SEM) of the *in situ* expression of (E) *DICAM* and (G) $\alpha_v\beta_3$ on brain microvessels in control or MS lesion tissue sections immunostained for (D) *DICAM* (green) and VE-cadherin (red), or (F) $\alpha_v\beta_3$ (red) and CD31 (green), plus nuclei (TOPRO-3, blue) and as captured by confocal microscopy; $n \geq 10$ pictures from seven control brains and $n = 11$ pictures from two MS brains. $***P < 0.001$ by Student's *t* test.

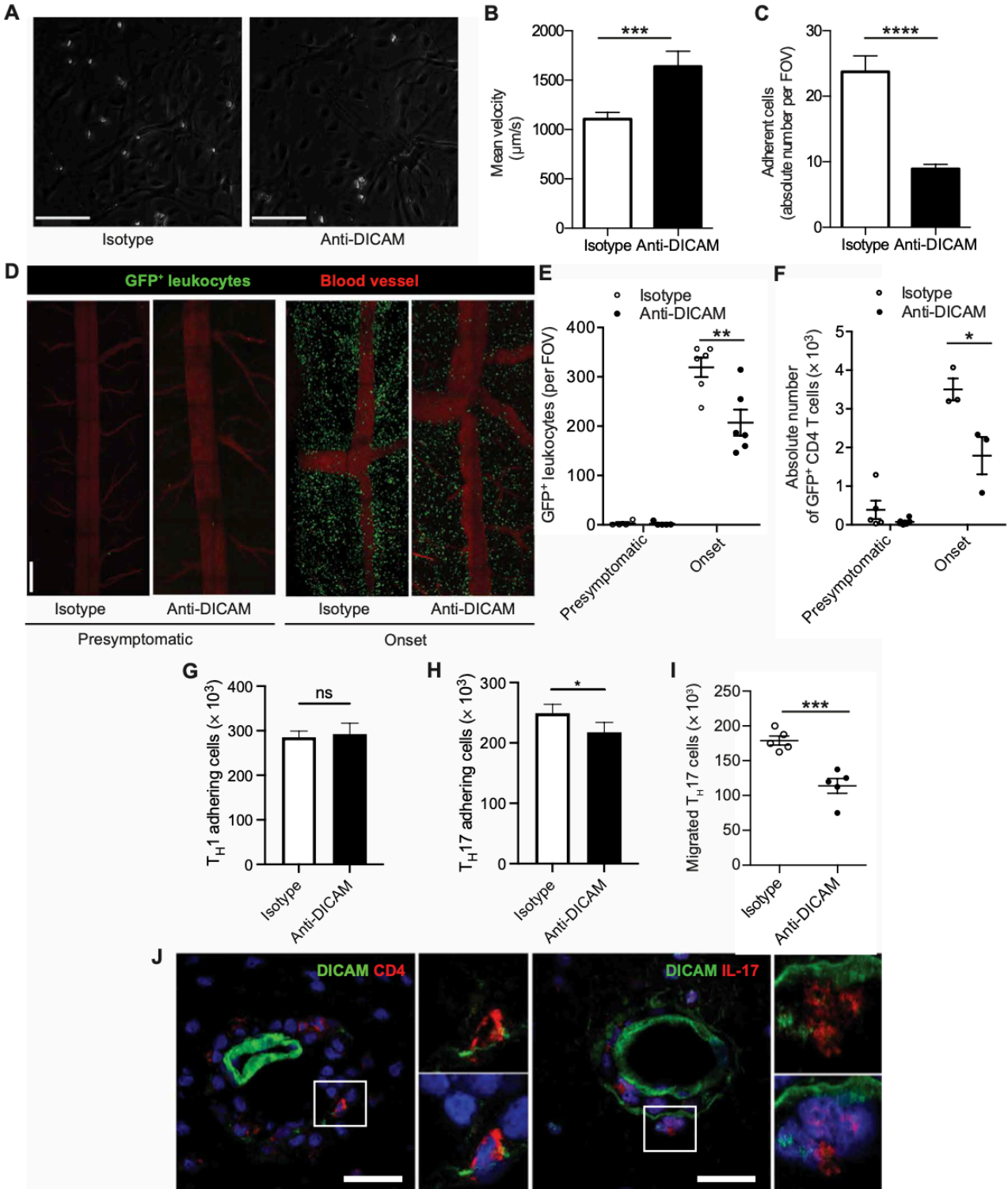


Fig. 5. DICAM mediates the trafficking of T_H17 lymphocytes across BBB-ECs in EAE and MS.

Fig. 5. DICAM mediates the trafficking of T_H17 lymphocytes across BBB-ECs in EAE and MS. (A to C) Adhesion of murine *in vitro* differentiated T_H17 lymphocytes on primary cultures of BBB-ECs is shown after preincubation with anti-DICAM antibody (20 µg/ml) or isotype control (IgG1) for 1 hour, as assessed during *in vitro* flow adhesion assay; representative of *n* = 3. (A) Representative images of T_H17 cells (white dots) adhering to BBB-ECs after 10 min of constant flow are shown; scale bars, 120 µm. (B) Velocity (means ± SEM) of T_H17 cells flowing over the BBB-ECs is shown; *n* ≥ 111 cells per group. (C) Absolute number (means ± SEM) of adherent T_H17 cells per field of view (FOV) is shown. (B and C) ****P* < 0.001 and *****P* < 0.0001, by Student's *t* test. (D to F) Spinal cord infiltration in passive EAE was analyzed at the presymptomatic phase (3 to 4 days after disease induction; d.p.i.) and at disease onset (4 to 7 d.p.i.), after daily intravenous injections of anti-DICAM antibody (200 µg per dose; five total injections) or isotype control (IgG1) from days 2 to 6. (D) Representative images and (E) absolute number (means ± SEM) show green fluorescent protein (GFP)-positive leukocytes (green) that have infiltrated the spinal cord parenchyma through leptomeningeal vessels (red), as captured by intravital two-photon microscopy; *n* = 4 to 6 mice per group; ***P* < 0.01 by one-way ANOVA with Bonferroni's post hoc test. (F) Absolute number (means ± SEM) of spinal cord-infiltrating GFP⁺ CD4⁺ T cells is shown, as analyzed by flow cytometry; *n* = 3 to 6 mice per group; **P* < 0.05 by one-way ANOVA with Bonferroni's post hoc test. (G to I) Absolute numbers (means ± SEM) of *in vitro* differentiated human T_H1 or T_H17 lymphocytes that (G and H) adhered to or (I) migrated across primary cultures of human BBB-ECs are shown after preincubation with anti-DICAM antibody (20 µg/ml) or isotype control (IgG1) for 1 hour; *n* = 3 to 5; ns, not significant, **P* < 0.05, and ****P* < 0.001, by paired *t* test. (J) Representative images of MS brain perivascular infiltrates, immunostained for CD4 or IL-17 (red), DICAM (green), and nuclei (TOPRO-3, blue) are shown; scale bars, 50 µm; *n* = 3 donors.

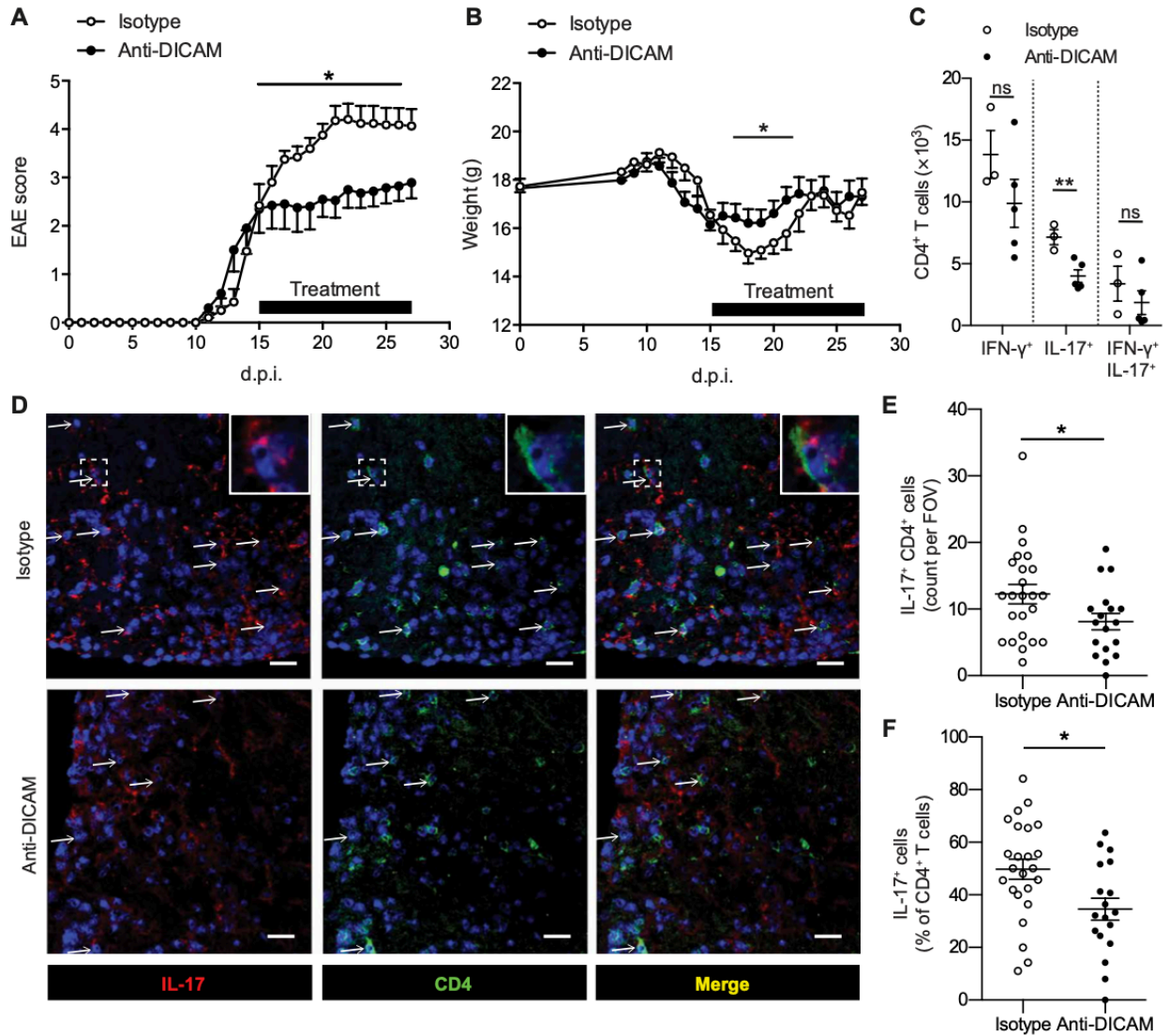


Fig. 6. Therapeutically blocking DICAM reduces EAE disease severity and T_H17 infiltration into the CNS.

Fig. 6. Therapeutically blocking DICAM reduces EAE disease severity and T_H17 infiltration into the CNS. C57BL/6 mice were immunized with MOG₃₅₋₅₅ and intraperitoneally injected with anti-DICAM antibody (200 µg per dose; seven total injections) or isotype control (IgG1) every other day, starting after disease onset. **(A)** EAE clinical score (means ± SEM) and **(B)** weight (means ± SEM) were measured daily by a blinded investigator; black bar indicates treatment window; representative of three independent experiments; *n* = 10 mice per group; **P* < 0.05 by Wilcoxon-Mann-Whitney test comparing areas under the curve. **(C)** The absolute number (means ± SEM) of IFN-γ⁺, IL-17⁺, and IFN-γ⁺ IL-17⁺ CD4⁺ T lymphocytes that infiltrated the CNS at peak of disease is shown, as analyzed by flow cytometry; *n* = 3 to 5 mice per group; ***P* < 0.01 by Student's *t* test. **(D)** Representative images, **(E)** absolute number (means per FOV ± SEM) of IL-17⁺ CD4⁺ T cells, and **(F)** frequencies (means per FOV ± SEM) of CD4⁺ T cells that expressed IL-17 are shown for spinal cord tissue sections collected at peak of disease and immunostained for IL-17 (red), CD4 (green), and nuclei (TOPRO-3, blue), as captured by confocal microscopy; *n* > 18 images from seven total mice. **(D)** Arrows indicate IL-17⁺ CD4⁺ double-positive cells; scale bars, 20 µm. **(E and F)** **P* < 0.05 by Student's *t* test.

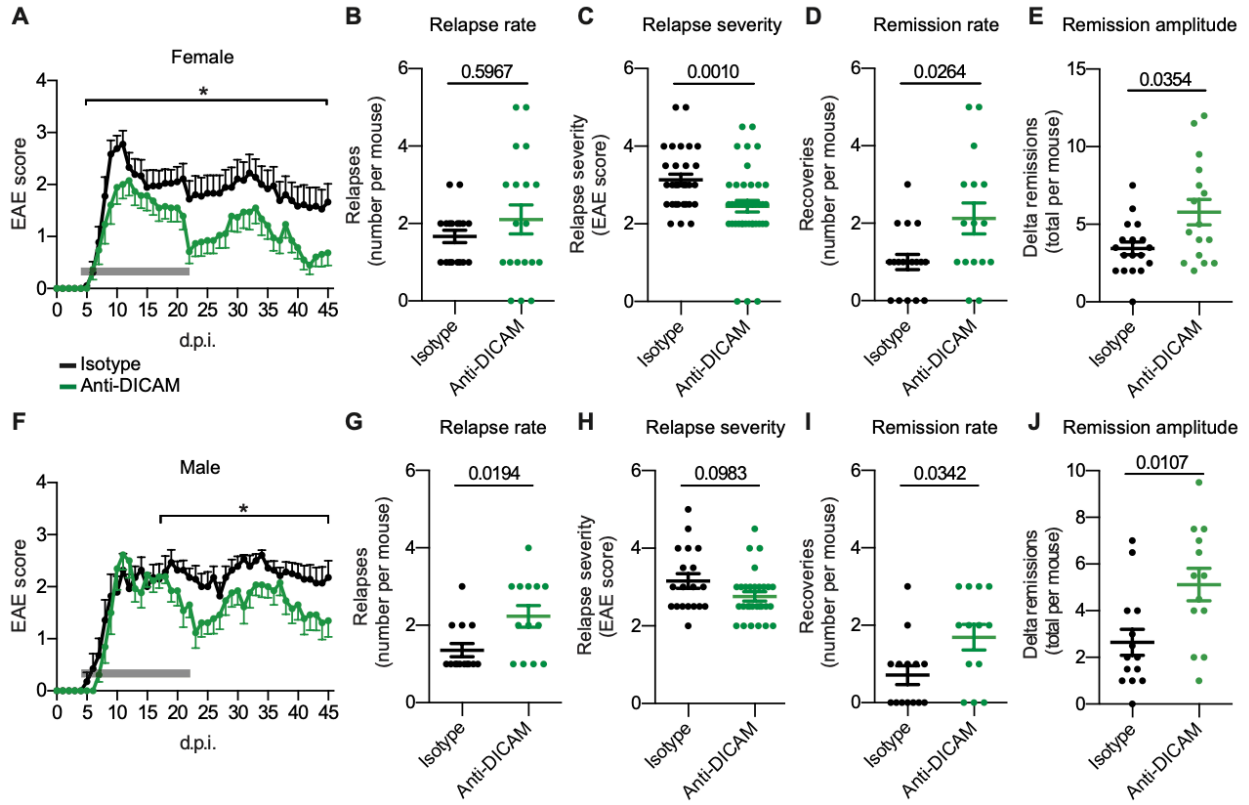


Fig. 7. Pharmacologically targeting DICAM with clinically relevant antibody dosage alleviates relapsing-remitting and progressive EAE symptoms.

Fig. 7. Pharmacologically targeting DICAM with clinically relevant antibody dosage alleviates relapsing-remitting and progressive EAE symptoms. (A to J) TCR1640 passive EAE was induced by adoptively transferring immune cells from female and male TCR1640-transgenic mice into (A to E) female and (F to J) male naïve SJL littermates, respectively; all animals were intraperitoneally injected with anti-DICAM antibody (400 ng per dose; 10 total injections) or isotype control (IgG1) every other day from days 4 to 22. (A and F) EAE clinical scores (means \pm SEM) were measured daily by a blinded investigator; gray bars indicate treatment window; pooled from three independent experiments with $n \geq 13$ animals per group; $*P < 0.05$ by Wilcoxon-Mann-Whitney test comparing areas under the curve. (B to E and G to J) Quantification (means \pm SEM) of (B and G) relapse rate (number of relapses defined as increases of ≥ 2 in score), (C and H) relapse severity (maximum relapse score), (D and I) remission rate (number remissions defined as decreases to a score ≤ 1 after a relapse), and (E and J) remission amplitude (Δ decrease in score after a relapse) is shown; P values shown were calculated by Wilcoxon-Mann-Whitney test.

References and notes

1. GBD 2016 multiple sclerosis collaborators, Global, regional, and national burden of multiple sclerosis 1990–2016: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet Neurol.* **18**, 269–285 (2019).
2. T. Kuhlmann, S. Ludwin, A. Prat, J. Antel, W. Brück, H. Lassmann, An updated histological classification system for multiple sclerosis lesions. *Acta Neuropathol.* **133**, 13–24 (2017).
3. H. Kebir, K. Kreymborg, I. Ifergan, A. Dodelet-Devillers, R. Cayrol, M. Bernard, F. Giuliani, N. Arbour, B. Becher, A. Prat, Human TH17 lymphocytes promote blood-brain barrier disruption and central nervous system inflammation. *Nat. Med.* **13**, 1173–1175 (2007).
4. I. M. Stromnes, L. M. Cerretti, D. Liggitt, R. A. Harris, J. M. Goverman, Differential regulation of central nervous system autoimmunity by TH1 and TH17 cells. *Nat. Med.* **14**, 337–342 (2008).
5. J. S. Tzartos, M. A. Friese, M. J. Craner, J. Palace, J. Newcombe, M. M. Esiri, L. Fugger, Interleukin-17 production in central nervous system-infiltrating T cells and glial cells is associated with active disease in multiple sclerosis. *Am. J. Pathol.* **172**, 146–155 (2008).
6. H. Kebir, I. Ifergan, J. I. Alvarez, M. Bernard, J. Poirier, N. Arbour, P. Duquette, A. Prat, Preferential recruitment of interferon-gamma-expressing TH17 cells in multiple sclerosis. *Ann. Neurol.* **66**, 390–402 (2009).
7. L. Legroux, N. Arbour, Multiple sclerosis and T lymphocytes: An entangled story. *J. Neuroimmune Pharmacol.* **10**, 528–546 (2015).
8. D. Matusevicius, P. Kivisäkk, B. He, N. Kostulas, V. Ozenci, S. Fredrikson, H. Link, Interleukin-17 mRNA expression in blood and CSF mononuclear cells is augmented in multiple sclerosis. *Mult. Scler.* **5**, 101–104 (1999).
9. G. Frisullo, V. Nociti, R. Iorio, A. K. Patanella, A. Marti, M. Caggiula, M. Mirabella, P. A. Tonali, A. P. Batocchi, IL17 and IFN γ production by peripheral blood mononuclear cells from clinically isolated syndrome to secondary progressive multiple sclerosis. *Cytokine* **44**, 22–25 (2008).

10. L. Durelli, L. Conti, M. Clerico, D. Boselli, G. Contessa, P. Ripellino, B. Ferrero, P. Eid, F. Novelli, T-helper 17 cells expand in multiple sclerosis and are inhibited by interferon-beta. *Ann. Neurol.* **65**, 499–509 (2009).
11. L. J. Edwards, R. A. Robins, C. S. Constantinescu, Th17/Th1 phenotype in demyelinating disease. *Cytokine* **50**, 19–23 (2010).
12. V. Brucklacher-Waldert, K. Stuermer, M. Kolster, J. Wolthausen, E. Tolosa, Phenotypical and functional characterization of T helper 17 cells in multiple sclerosis. *Brain* **132**, 3329–3341 (2009).
13. Z. Babaloo, F. Babaie, M. Farhoodi, M. R. Aliparasti, B. Baradaran, S. Almasi, A. Hoseini, Interleukin-17A and interleukin-17F mRNA expression in peripheral blood mononuclear cells of patients with multiple sclerosis. *Iran. J. Immunol.* **7**, 202–209 (2010).
14. A. K. Huber, L. Wang, P. Han, X. Zhang, S. Ekholm, A. Srinivasan, D. N. Irani, B. M. Segal, Dysregulation of the IL-23/IL-17 axis and myeloid factors in secondary progressive MS. *Neurology* **83**, 1500–1507 (2014).
15. Y. Li, H. Wang, Y. Long, Z. Lu, X. Hu, Increased memory Th17 cells in patients with neuromyelitis optica and multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.* **234**, 155–160 (2011).
16. J. Romme Christensen, L. Börnsen, R. Ratzer, F. Piehl, M. Khademi, T. Olsson, P. S. Sørensen, F. Sellebjerg, Systemic inflammation in progressive multiple sclerosis involves follicular T-helper, Th17- and activated B-cells and correlates with progression. *PLOS ONE* **8**, e57820 (2013).
17. E. Peelen, J. Damoiseaux, J. Smolders, S. Knippenberg, P. Menheere, J. W. C. Tervaert, R. Hupperts, M. Thewissen, Th17 expansion in MS patients is counterbalanced by an expanded CD39+ regulatory T cell population during remission but not during relapse. *J. Neuroimmunol.* **240-241**, 97–103 (2011).
18. S. A. Ghaffari, M. Nemati, H. Hajghani, H. Ebrahimi, A. Sheikhi, A. Jafarzadeh, Circulating concentrations of interleukin (IL)-17 in patients with multiple sclerosis: Evaluation of the effects of gender, treatment, disease patterns and IL-23 receptor gene polymorphisms. *Iran J. Neurol.* **16**, 15–25 (2017).

19. C. Larochelle, R. Cayrol, H. Kebir, J. I. Alvarez, M.-A. Lécuyer, I. Ifergan, É. Viel, L. Bourbonnière, D. Beauseigle, S. Terouz, L. Hachehouche, S. Gendron, J. Poirier, C. Jobin, P. Duquette, K. Flanagan, T. Yednock, N. Arbour, A. Prat, Melanoma cell adhesion molecule identifies encephalitogenic T lymphocytes and promotes their recruitment to the central nervous system. *Brain* **135**, 2906–2924 (2012).
20. U. Bühler, V. Fleischer, F. Luessi, A. Rezk, P. Belikan, C. Graetz, R. Gollan, C. Wolf, J. Lutz, A. Bar-Or, V. Siffrin, F. Zipp, Role of IL-17-producing lymphocytes in severity of multiple sclerosis upon natalizumab treatment. *Mult. Scler.* **23**, 567–576 (2017).
21. S. Kalra, C. Lowndes, L. Durant, R. C. Strange, A. Al-Araji, C. P. Hawkins, S. J. Curnow, Th17 cells increase in RRMS as well as in SPMS, whereas various other phenotypes of Th17 increase in RRMS only. *Mult. Scler J. Exp. Transl. Clin.* **6**, 205521731989969 (2020).
22. J. Huppert, D. Closhen, A. Croxford, R. White, P. Kulig, E. Pietrowski, I. Bechmann, B. Becher, H. J. Luhmann, A. Waisman, C. R. W. Kuhlmann, Cellular mechanisms of IL-17-induced blood-brain barrier disruption. *FASEB J.* **24**, 1023–1034 (2010).
23. K. Venken, N. Hellings, K. Hensen, J.-L. Rummens, P. Stinissen, Memory CD4+CD127high T cells from patients with multiple sclerosis produce IL-17 in response to myelin antigens. *J. Neuroimmunol.* **226**, 185–191 (2010).
24. S.-C. Tang, X.-H. Fan, Q.-M. Pan, Q.-S. Sun, Y. Liu, Decreased expression of IL-27 and its correlation with Th1 and Th17 cells in progressive multiple sclerosis. *J. Neurol. Sci.* **348**, 174–180 (2015).
25. C. Larochelle, J. I. Alvarez, A. Prat, How do immune cells overcome the blood-brain barrier in multiple sclerosis? *FEBS Lett.* **585**, 3770–3780 (2011).
26. M. Charabati, J.-M. Rabanel, C. Ramassamy, A. Prat, Overcoming the brain barriers: From immune cells to nanoparticles. *Trends Pharmacol. Sci.* **41**, 42–54 (2020).
27. R. Daneman, A. Prat, The blood-brain barrier. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **7**, a020412 (2015).

28. R. Cayrol, K. Wosik, J. L. Berard, A. Dodelet-Devillers, I. Ifergan, H. Kebir, A. S. Haqqani, K. Kreymborg, S. Krug, R. Moumdjian, A. Bouthillier, B. Becher, N. Arbour, S. David, D. Stanimirovic, A. Prat, Activated leukocyte cell adhesion molecule promotes leukocyte trafficking into the central nervous system. *Nat. Immunol.* **9**, 137–145 (2008).
29. C. Larochelle, M.-A. Lécuyer, J. I. Alvarez, M. Charabati, O. Saint-Laurent, S. Ghannam, H. Kebir, K. Flanagan, T. Yednock, P. Duquette, N. Arbour, A. Prat, Melanoma cell adhesion molecule-positive CD8 T lymphocytes mediate central nervous system inflammation. *Ann. Neurol.* **78**, 39–53 (2015).
30. L. Michel, C. Grasmuck, M. Charabati, M.-A. Lécuyer, S. Zandee, T. Dhaeze, J. I. Alvarez, R. Li, S. Larouche, L. Bourbonnière, R. Moumdjian, A. Bouthillier, B. Lahav, P. Duquette, A. Bar-Or, J. L. Gommerman, E. Peelen, A. Prat, Activated leukocyte cell adhesion molecule regulates B lymphocyte migration across central nervous system barriers. *Sci. Transl. Med.* **11**, eaaw0475 (2019)
31. C. H. Polman, P. W. O'Connor, E. Havrdova, M. Hutchinson, L. Kappos, D. H. Miller, J. T. Phillips, F. D. Lublin, G. Giovannoni, A. Wajgt, M. Toal, F. Lynn, M. A. Panzara, A. W. Sandrock, A randomized, placebo-controlled trial of natalizumab for relapsing multiple sclerosis. *N. Engl. J. Med.* **354**, 899–910 (2006).
32. R. A. Rudick, W. H. Stuart, P. A. Calabresi, C. Confavreux, S. L. Galetta, E.-W. Radue, F. D. Lublin, B. Weinstock-Guttman, D. R. Wynn, F. Lynn, M. A. Panzara, A. W. Sandrock; SENTINEL Investigators, Natalizumab plus interferon beta-1a for relapsing multiple sclerosis. *N. Engl. J. Med.* **354**, 911–923 (2006).
33. E. Havrdova, S. Galetta, M. Hutchinson, D. Stefoski, D. Bates, C. H. Polman, P. W. O'Connor, G. Giovannoni, J. T. Phillips, F. D. Lublin, A. Pace, R. Kim, R. Hyde, Effect of natalizumab on clinical and radiological disease activity in multiple sclerosis: A retrospective analysis of the Natalizumab Safety and Efficacy in Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis (AFFIRM) study. *Lancet Neurol.* **8**, 254–260 (2009).

34. R. Kapoor, P.-R. Ho, N. Campbell, I. Chang, A. Deykin, F. Forrestal, N. Lucas, B. Yu, D. L. Arnold, M. S. Freedman, M. D. Goldman, H.-P. Hartung, E. K. Havrdová, D. Jeffery, A. Miller, F. Sellebjerg, D. Cadavid, D. Mikol, D. Steiner; ASCEND Investigators, Effect of natalizumab on disease progression in secondary progressive multiple sclerosis (ASCEND): A phase 3, randomised, double-blind, placebo-controlled trial with an open-label extension. *Lancet Neurol.* **17**, 405–415 (2018).
35. C. Larochelle, I. Metz, M.-A. Lécuyer, S. Terouz, M. Roger, N. Arbour, W. Brück, A. Prat, Immunological and pathological characterization of fatal rebound MS activity following natalizumab withdrawal. *Mult. Scler.* **23**, 72–81 (2017).
36. A. Gueguen, P. Roux, R. Deschamps, A. Moulignier, C. Bensa, J. Savatovsky, F. Heran, O. Gout, Abnormal inflammatory activity returns after natalizumab cessation in multiple sclerosis. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **85**, 1038–1040 (2014).
37. P. S. Sorensen, N. Koch-Henriksen, T. Petersen, M. Ravnborg, A. Oturai, F. Sellebjerg, Recurrence or rebound of clinical relapses after discontinuation of natalizumab therapy in highly active MS patients. *J. Neurol.* **261**, 1170–1177 (2014).
38. A. Vidal-Jordana, M. Tintoré, C. Tur, F. Pérez-Miralles, C. Auger, J. Río, C. Nos, G. Arrambide, M. Comabella, I. Galán, J. Castilló, J. Sastre-Garriga, A. Rovira, X. Montalban, Significant clinical worsening after natalizumab withdrawal: Predictive factors. *Mult. Scler.* **21**, 780–785 (2015).
39. G. Bloomgren, S. Richman, C. Hotermans, M. Subramanyam, S. Goelz, A. Natarajan, S. Lee, T. Plavina, J. V. Scanlon, A. Sandroek, C. Bozic, Risk of natalizumab-associated progressive multifocal leukoencephalopathy. *N. Engl. J. Med.* **366**, 1870–1880 (2012).
40. P. O'Connor, A. Goodman, L. Kappos, F. Lublin, C. Polman, R. A. Rudick, K. Hauswirth, L. M. Cristiano, F. Forrestal, P. Duda, Long-term safety and effectiveness of natalizumab redosing and treatment in the STRATA MS Study. *Neurology* **83**, 78–86 (2014).
41. H. Butzkueven, L. Kappos, F. Pellegrini, M. Trojano, H. Wiendl, R. N. Patel, A. Zhang, C. Hotermans, S. Belachew; TYSABRI Observational Program (TOP) Investigators, Efficacy and safety

of natalizumab in multiple sclerosis: Interim observational programme results. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **85**, 1190–1197 (2014).

42. O. Stüve, C. M. Marra, K. R. Jerome, L. Cook, P. D. Cravens, S. Cepok, E. M. Frohman, J. T. Phillips, G. Arendt, B. Hemmer, N. L. Monson, M. K. Racke, Immune surveillance in multiple sclerosis patients treated with natalizumab. *Ann. Neurol.* **59**, 743–747 (2006).

43. R. Brandstadter, I. Katz Sand, The use of natalizumab for multiple sclerosis. *Neuropsychiatr. Dis. Treat.* **13**, 1691–1702 (2017).

44. T. Yonezawa, A. Ohtsuka, T. Yoshitaka, S. Hirano, H. Nomoto, K. Yamamoto, Y. Ninomiya, Limitrin, a novel immunoglobulin superfamily protein localized to glia limitans formed by astrocyte endfeet. *Glia* **44**, 190–204 (2003).

45. Y.-K. Jung, J.-S. Jin, J.-H. Jeong, H.-N. Kim, N.-R. Park, J.-Y. Choi, DICAM, a novel dual immunoglobulin domain containing cell adhesion molecule interacts with α v β 3 integrin. *J. Cell. Physiol.* **216**, 603–614 (2008).

46. S. M. Weis, D. A. Cheresh, α v integrins in angiogenesis and cancer. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **1**, a006478 (2011).

47. S. Huang, R. I. Endo, G. R. Nemerow, Upregulation of integrins α v β 3 and α v β 5 on human monocytes and T lymphocytes facilitates adenovirus-mediated gene delivery. *J. Virol.* **69**, 2257–2263 (1995).

48. D. M. Elizondo, T. E. Andargie, K. M. Marshall, A. M. Zariwala, M. W. Lipscomb, Dendritic cell expression of ADAM23 governs T cell proliferation and cytokine production through the α (v) β (3) integrin receptor. *J. Leukoc. Biol.* **100**, 855–864 (2016).

49. C. Larochelle, T. Uphaus, B. Broux, E. Gowing, M. Paterka, L. Michel, N. Dudvarski Stankovic, F. Bicker, F. Lemaître, A. Prat, M. H. H. Schmidt, F. Zipp, EGFL7 reduces CNS inflammation in mouse. *Nat. Commun.* **9**, 819 (2018).

50. S.-W. Han, Y.-K. Jung, E.-J. Lee, H.-R. Park, G.-W. Kim, J.-H. Jeong, M.-S. Han, J.-Y. Choi, DICAM inhibits angiogenesis via suppression of AKT and p38 MAP kinase signalling. *Cardiovasc. Res.* **98**, 73–82 (2013).
51. S. Han, H.-R. Park, E.-J. Lee, J.-A. Jang, M.-S. Han, G.-W. Kim, J.-H. Jeong, J.-Y. Choi, F. Beier, Y. K. Jung, Dicam promotes proliferation and maturation of chondrocyte through Indian hedgehog signaling in primary cilia. *Osteoarthr. Cartil.* **26**, 945–953 (2018).
52. Y.-K. Jung, S.-W. Han, G.-W. Kim, J.-H. Jeong, H.-J. Kim, J.-Y. Choi, DICAM inhibits osteoclast differentiation through attenuation of the integrin $\alpha V\beta 3$ pathway. *J. Bone Miner. Res.* **27**, 2024–2034 (2012).
53. E. Y. Chen, C. M. Tan, Y. Kou, Q. Duan, Z. Wang, G. V. Meirelles, N. R. Clark, A. Ma'ayan, Enrichr: Interactive and collaborative HTML5 gene list enrichment analysis tool. *BMC Bioinformatics* **14**, 128 (2013).
54. M. V. Kuleshov, M. R. Jones, A. D. Rouillard, N. F. Fernandez, Q. Duan, Z. Wang, S. Koplev, S. L. Jenkins, K. M. Jagodnik, A. Lachmann, M. G. McDermott, C. D. Monteiro, G. W. Gundersen, A. Ma'ayan, Enrichr: A comprehensive gene set enrichment analysis web server 2016 update. *Nucleic Acids Res.* **44**, W90–W97 (2016).
55. J. I. Alvarez, H. Kebir, L. Cheslow, M. Charabati, M. Chabarati, C. Larochelle, A. Prat, JAML mediates monocyte and CD8 T cell migration across the brain endothelium. *Ann. Clin. Transl. Neurol.* **2**, 1032–1037 (2015).
56. K. Ebnet, Junctional adhesion molecules (JAMs): Cell adhesion receptors with pleiotropic functions in cell physiology and development. *Physiol. Rev.* **97**, 1529–1554 (2017).
57. A. B. Nair, S. Jacob, A simple practice guide for dose conversion between animals and human. *J. Basic Clin. Pharm.* **7**, 27–31 (2016).
58. B. Pöllinger, G. Krishnamoorthy, K. Berer, H. Lassmann, M. R. Bösl, R. Dunn, H. S. Domingues, A. Holz, F. C. Kurschus, H. Wekerle, 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 (2009).

59. T. Dhaeze, C. Lachance, L. Tremblay, C. Grasmuck, L. Bourbonnière, S. Larouche, O. Saint-Laurent, M.-A. Lécuyer, R.-M. Rébillard, S. Zandee, A. Prat, Sex-dependent factors encoded in the immune compartment dictate relapsing or progressive phenotype in demyelinating disease. *JCI Insight* **4**, e124885 (2019).

60. K. Flanagan, K. Fitzgerald, J. Baker, K. Regnstrom, S. Gardai, F. Bard, S. Mocci, P. Seto, M. You, C. Larochelle, A. Prat, S. Chow, L. Li, C. Vandever, W. Zago, C. Lorenzana, C. Nishioka, J. Hoffman, R. Botelho, C. Willits, K. Tanaka, J. Johnston, T. Yednock, Laminin-411 is a vascular ligand for MCAM and facilitates TH17 cell entry into the CNS. *PLOS ONE* **7**, e40443 (2012).

61. T. Schneider-Hohendorf, J. Rossaint, H. Mohan, D. Böning, J. Breuer, T. Kuhlmann, C. C. Gross, K. Flanagan, L. Sorokin, D. Vestweber, A. Zarbock, N. Schwab, H. Wiendl, VLA-4 blockade promotes differential routes into human CNS involving PSGL-1 rolling of T cells and MCAM-adhesion of TH17 cells. *J. Exp. Med.* **211**, 1833–1846 (2014).

62. J. van Langelaar, R. M. van der Vuurst de Vries, M. Janssen, A. F. Wierenga-Wolf, I. M. Spilt, T. A. Siepman, W. Dankers, G. M. G. M. Verjans, H. E. de Vries, E. Lubberts, R. Q. Hintzen, M. M. van Luijn, T helper 17.1 cells associate with multiple sclerosis disease activity: Perspectives for early intervention. *Brain* **141**, 1334–1349 (2018).

63. P. M. I. A. Doss, M. Umair, J. Baillargeon, R. Fazazi, N. Fudge, I. Akbar, A. P. Yeola, J. B. Williams, M. Leclercq, C. Joly-Beauparlant, P. Beauchemin, G. F. Ruda, M. Alpaugh, A. C. Anderson, P. E. Brennan, A. Droit, H. Lassmann, C. S. Moore, M. Rangachari, Male sex chromosomal complement exacerbates the pathogenicity of Th17 cells in a chronic model of central nervous system autoimmunity. *Cell Rep.* **34**, 108833 (2021).

64. P. D. Murray, D. B. McGavern, L. R. Pease, M. Rodriguez, Cellular sources and targets of IFN- γ -mediated protection against viral demyelination and neurological deficits. *Eur. J. Immunol.* **32**, 606–615 (2002).

65. S. A. Stohlman, D. R. Hinton, B. Parra, R. Atkinson, C. C. Bergmann, CD4 T cells contribute to virus control and pathology following central nervous system infection with neurotropic mouse hepatitis virus. *J. Virol.* **82**, 2130–2139 (2008).
66. V. K. Baxter, D. E. Griffin, Interferon-gamma modulation of the local T cell response to alphavirus encephalomyelitis. *Viruses* **12**, 113 (2020).
67. L. Aly, S. Yousef, S. Schippling, I. Jelcic, P. Breiden, J. Matschke, R. Schulz, S. Bofill-Mas, L. Jones, V. Demina, M. Linnebank, G. Ogg, R. Girones, T. Weber, M. Sospedra, R. Martin, Central role of JC virus-specific CD4+ lymphocytes in progressive multi-focal leucoencephalopathy- immune reconstitution inflammatory syndrome. *Brain* **134**, 2687–2702 (2011).
68. I. Jelcic, I. Jelcic, C. Kempf, F. Largey, R. Planas, S. Schippling, H. Budka, M. Sospedra, R. Martin, Mechanisms of immune escape in central nervous system infection with neurotropic JC virus variant. *Ann. Neurol.* **79**, 404–418 (2016).
69. D. Pavlovic, M. A. Patel, A. C. Patera, I. Peterson; Progressive Multifocal Leukoencephalopathy Consortium, T cell deficiencies as a common risk factor for drug associated progressive multifocal leukoencephalopathy. *Immunobiology* **223**, 508–517 (2018).
70. J. I. Alvarez, O. Saint-Laurent, A. Godschalk, S. Terouz, C. Briels, S. Larouche, L. Bourbonnière, C. Laroche, A. Prat, Focal disturbances in the blood-brain barrier are associated with formation of neuroinflammatory lesions. *Neurobiol. Dis.* **74**, 14–24 (2015).
71. S.-W. Han, J. M. Kim, Y. Lho, H. J. Cho, Y.-K. Jung, J.-A. Kim, H. Lee, Y.-J. Lee, E. S. Kim, DICAM attenuates experimental colitis via stabilizing junctional complex in mucosal barrier. *Inflamm. Bowel Dis.* **25**, 853–861 (2019).
72. M.-A. Lécuyer, O. Saint-Laurent, L. Bourbonnière, S. Larouche, C. Laroche, L. Michel, M. Charabati, M. Abadier, S. Zandee, N. Haghayegh Jahromi, E. Gowing, C. Pittet, R. Lyck, B. Engelhardt, A. Prat, Dual role of ALCAM in neuroinflammation and blood-brain barrier homeostasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **114**, E524–E533 (2017).
73. Y. Kurebayashi, S. Nagai, A. Ikejiri, M. Ohtani, K. Ichiyama, Y. Baba, T. Yamada, S. Egami, T. Hoshii, A. Hirao, S. Matsuda, S. Koyasu, PI3K-Akt-mTORC1-S6K1/2 axis controls Th17

differentiation by regulating Gfi1 expression and nuclear translocation of ROR γ . *Cell Rep.* **1**, 360–373 (2012).

74. S. Kshirsagar, M. Riedl, H. Billing, B. Tönshoff, S. Thangavadivel, C. Steuber, H. Staude, G. Wechselberger, M. Edelbauer, Akt-dependent enhanced migratory capacity of Th17 cells from children with lupus nephritis. *J. Immunol.* **193**, 4895–4903 (2014).

75. S. Mammana, P. Bramanti, E. Mazzon, E. Cavalli, M. S. Basile, P. Fagone, M. C. Petralia, J. A. McCubrey, F. Nicoletti, K. Mangano, Preclinical evaluation of the PI3K/Akt/mTOR pathway in animal models of multiple sclerosis. *Oncotarget* **9**, 8263–8277 (2018).

76. S. Giacoppo, F. Pollastro, G. Grassi, P. Bramanti, E. Mazzon, Target regulation of PI3K/Akt/mTOR pathway by cannabidiol in treatment of experimental multiple sclerosis. *Fitoterapia* **116**, 77–84 (2017).

77. I. Ifergan, K. Wosik, R. Cayrol, H. Kebir, C. Auger, M. Bernard, A. Bouthillier, R. Moudjian, P. Duquette, A. Prat, Statins reduce human blood-brain barrier permeability and restrict leukocyte migration: Relevance to multiple sclerosis. *Ann. Neurol.* **60**, 45–55 (2006).

78. A. S. Haqqani, J. F. Kelly, D. B. Stanimirovic, Quantitative protein profiling by mass spectrometry using label-free proteomics. *Methods Mol. Biol.* **439**, 241–256 (2008).

79. A. J. Thompson, B. L. Banwell, F. Barkhof, W. M. Carroll, T. Coetzee, G. Comi, J. Correale, F. Fazekas, M. Filippi, M. S. Freedman, K. Fujihara, S. L. Galetta, H.-P. Hartung, L. Kappos, F. D. Lublin, R. A. Marrie, A. E. Miller, D. H. Miller, X. Montalban, E. M. Mowry, P. S. Sorensen, M. Tintore, A. L. Traboulsee, M. Trojano, B. M. J. Uitdehaag, S. Vukusic, E. Waubant, B. G. Weinshenker, S. C. Reingold, J. A. Cohen, Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. *Lancet Neurol.* **17**, 162–173 (2018).

80. C. Podjaski, J. I. Alvarez, L. Bourbonnière, S. Larouche, S. Terouz, J. M. Bin, M.-A. Lécuyer, O. Saint-Laurent, C. Larochelle, P. J. Darlington, N. Arbour, J. P. Antel, T. E. Kennedy, A. Prat, Netrin 1 regulates blood-brain barrier function and neuroinflammation. *Brain* **138**, 1598–1612 (2015).

81. C. L. Pittet, J. Newcombe, J. P. Antel, N. Arbour, The majority of infiltrating CD8 T lymphocytes in multiple sclerosis lesions is insensitive to enhanced PD-L1 levels on CNS cells. *Glia* **59**, 841–856 (2011).

82. C. Schläger, T. Litke, A. Flügel, F. Odoardi, In vivo visualization of (Auto)Immune processes in the central nervous system of rodents. *Methods Mol. Biol.* **1304**, 117–129 (2016)

Acknowledgments: We are grateful to M. Blain (McGill University) for assisting with antibody purification and to J. Strauss (University Medical Center Göttingen) for help with the two-photon intravital microscopy experiments. We also thank the CR-CHUM’s animal facility led by H. Héon, imaging platform led by A. Cleret-Buhot, flow cytometry platform led by D. Gauchat, and their entire staff for their expertise and enthusiastic support throughout this project. **Funding:** This study was supported by funding from the Multiple Sclerosis Society of Canada (MSSC; A.P.), the International Progressive MS Alliance (A.P., F.J.Q., and J.P.A.), the European Research Area Networks Neuroscience Research (ERA-Net Neuron; A.P. and A.F.), and the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG, German Research Foundation, FL 377/4-1; A.F.). During the completion of this study, M.C. and C.G. held scholarships from the MSSC; A.P.F. held scholarships from the CIHR; H.K. held scholarships from the FRQS; S.G. held scholarships from the MSSC and the Fondation pour l’Aide à la Recherche sur la Sclérose en Plaques (ARSEP); M.-A.L., R.-M.R., C.H., E.G., E.P., and S.Z. were supported by a joint FRQS-EndMS fellowship. A.P. holds the T1 Canada Research Chair in Multiple Sclerosis and is funded by the Canada Institutes of Health Research, the Multiple Sclerosis Society of Canada, the International Progressive MS Alliance, and the Canadian Foundation for Innovation. **Author contributions:** M.C., C.G., S.G., and A.P. designed the study. M.C., C.G., S.G., L.B., A.P.F., M.-A.L., H.K., R.-M.R., C.H., and E.G. performed or analyzed the *in vitro* experiments. M.C., C.G., S.G., A.P.F., H.K., O.F., C.P., and S.Z. performed or analyzed the *in situ* experiments. M.C., C.G., S.G., L.B., M.-A.L., R.-M.R., and S.L. performed or analyzed *in vivo* experiments. L.B., R.-M.R., S.L., B.L., R.M., A.B., M.G., P.D., R.C., C.L., and A.P. were involved in the collection of human samples and clinical characterization of patients. M.C., C.G., O.T., and A.-F.M. performed bioinformatic and statistical analyses. M.C., C.G., and A.P. prepared the figures

and wrote the manuscript. E.P., F.J.Q., J.P.A., A.F., C.L., N.A., and S.Z. reviewed the manuscript.

Competing interests: S.G. and A.P. are inventors on patents and patent applications related to DICAM-specific antibodies and uses thereof (US10428144B2, WO2016095046A1, EP3233919B1, and CA2971364A1). H.K., R.C., C.L., N.A., and A.P. are inventors on patents and patent applications related to MCAM modulation and uses thereof (CA2676962C, AU2009212789B2, US8293468B2, and US9017682B2). E.P. is currently an employee of Immunic AG and owns stock options of the parent company of Immunic AG. **Data and materials availability:** All data associated with this study are present in the paper or the Supplementary Materials.

Supplementary materials

www.science.org/doi/10.1126/scitranslmed.abj0473

Materials and Methods

Human Cell Isolation and Culture

To isolate immune cells, peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were collected from blood samples as previously described (29) after obtaining informed consent in accordance with institutional guidelines (Centre Hospitalier de l'Université de Montréal [CHUM] research ethic committee approval number BH07.001, 20.332). Commercially available magnetic-activated cell sorting (MACS) kits (Miltenyi) were used according to the manufacturer's instructions to isolate CD4⁺ T lymphocytes, naïve CD45RA⁺ CD4⁺ T lymphocytes, memory CD45RO⁺ CD4⁺ T lymphocytes and CD14⁺ monocytes. CD4⁺ T cell stimulation and polarization were performed as previously published (6, 19). Briefly, T lymphocytes (0.5 to 1 x 10⁶ cells/mL) were cultured for 6 days unless specified otherwise in X-VIVO 15 MEDIUM (Lonza) supplemented with GlutaMax (1X, Thermo Fisher Scientific) and penicillin-streptomycin (100 U/mL and 100 µg/mL respectively, Thermo Fisher Scientific), either with autologous monocytes at a 2:1 ratio and soluble anti-CD3 (final concentration 2.5 µg/mL, clone OKT3, eBioscience), or on plate-bound anti-CD3 (2.5 µg/mL incubated overnight at 4°C, clone OKT3, eBioscience) with soluble anti-CD28 (2 µg/mL, CD28.2, BD Biosciences). For the duration of the culture, T cells were either stimulated with recombinant

human (rh) interleukin (IL)-1 β (12.5 ng/ml, R&D Systems), rh IL-6 (25 ng/mL, R&D Systems), rh transforming growth factor (TGF)- β 1 (5 ng/mL, R&D Systems) and rh IL-23 (10 or 25 ng/mL, R&D Systems), or differentiated to T_H17 with rh IL-23 (25 ng/mL, R&D Systems), anti-IL-4 antibody (5 μ g/mL, clone 3007, R&D Systems, or clone 11B11, Bio X Cell) and anti-interferon (IFN)- γ antibody (5 μ g/mL, clone K3.53, R&D Systems, or clone B133.5, Bio X Cell), to T_H2 with rh IL-4 (200 ng/mL, R&D Systems), anti-IFN- γ antibody (5 μ g/mL) and anti-IL-12 p70 antibody (5 μ g/mL, clone 24910, R&D Systems, or clone 20C2, Bio X Cell), or to T_H1 with rh IL-12 (10 ng/mL, R&D Systems) and anti-IL-4 antibody (5 μ g/mL).

Blood-brain barrier endothelial cells were isolated from nonepileptic surgical human central nervous system material and cultured as per published protocol (3, 28, 77). Informed consent was obtained prior to surgeries in accordance with institutional guidelines (Centre Hospitalier de l'Université de Montréal [CHUM] research ethic committee approval number BH07.001, 20.332). To induce inflammation, confluent primary cultures were treated for 18 hours with rh tumor necrosis factor (TNF)- α (100 U/mL, Thermo Fisher Scientific) and rh IFN- γ (100 U/mL, Thermo Fisher Scientific).

Proteomic Analysis

Human memory CD4⁺CD45RO⁺ T lymphocytes were harvested after 6 days in culture in serum-free medium under T_H17-polarizing conditions. Prior to protein extraction, cells were washed twice in phosphate-buffered saline (PBS). Cell pellets were resuspended in denaturing buffer (50mM Tris-HCl, pH 8.5, 0.1% SDS) and the suspension sonicated in short 10-second bursts followed by 30-second intervals on ice for cooling, until obtention of a homogeneous sample. Debris was cleared by centrifugation (10,000g for 10 minutes at 4°C) and proteins concentrated with 10 volumes cold acetone for 1 hour at -20°C. After centrifugation (5000g for 10 minutes at 4°C), the supernatant was discarded and pellet stored at -80°C. Proteomics analysis was carried out by nanoflow liquid chromatography-tandem mass spectrometry as previously described (28, 78). Gene Set Enrichment Analysis (GSEA), function classification and domain categorization were performed using the GO Cellular Component 2018, GO Molecular Function 2018 and InterPro Domains 2019 databases (53, 54).

Classification of Patients with Multiple Sclerosis

Patients with multiple sclerosis (MS) were classified as relapsing-remitting MS (RRMS), secondary progressive MS (SPMS), or primary progressive MS (PPMS) at the time of sample collection according to McDonald's 2017 revised criteria (79). Active versus inactive RRMS were defined as based on whether the patient experienced one or more relapses in the 5 years prior to blood collection. Active versus inactive SPMS/PPMS were determined according to the Δ expanded disability status scale (EDSS) experienced by the patient over the 5 years prior to blood collection; active and inactive refer to Δ EDSS ≥ 1 and < 1 , respectively. Magnetic resonance imaging (MRI) T2 lesions were quantified by experienced neuroradiologists, as per routine clinical protocols, at the time of the blood draw (± 6 months) and 1-2 years post-blood collection to determine the Δ T2 lesions.

RNA Isolation and Real Time Quantitative Polymerase Chain Reaction (PCR)

RNA isolation and real time quantitative PCR were conducted on human blood-brain barrier endothelial cells (BBB ECs) and T lymphocytes as previously published (19, 72, 80, 81). Relative gene expression was determined using TaqMan fluorescein amidites-labeled probes for *DICAM*, *ICAM1*, *VCAM1*, *ITGB3* ($\beta 3$ subunit), *IL17*, *IFNG*, *RORC*, and *TBX21*, as well as for 2'-chloro-7'-phenyl-1,4-dichloro-6-carboxy-fluorescein (VIC)-labeled ribosomal *18S* probe (Thermo Fisher Scientific). Quantitative PCR was performed in a QuantStudio 7 Flex real-time PCR system (Thermo Fisher Scientific).

Anti-Dual Immunoglobulin domain containing Cell Adhesion Molecule (DICAM) Antibody Generation and Purification

The DICAM clone 9E9 hybridoma was generated by ImmunoPrecise. The hybridoma cell line was cultured in RPMI-1640 (Wisent) with fetal bovine serum (FBS, 10%, Sigma-Aldrich) and β -mercaptoethanol (55nM, Sigma-Aldrich), HyClone SG 200 solution (2mM, Thermo Fisher Scientific), HyClone sodium pyruvate (1mM, Thermo Fisher Scientific), penicillin-streptomycin (100 U/mL and 100 μ g/mL respectively, Thermo Fisher Scientific). The antibody in the collected supernatant was purified using a protein G Sepharose (Pharmacia) affinity chromatography column. Purified DICAM antibody and isotype control antibodies (IgG1, Bio X Cell) were either

directly used or coupled to Alexa Fluor 647, using the SeTau-647-di-NHS (Seta biomedical) for mouse cell flow cytometry experiments or the eBioscience antibody coupling service for human cell flow cytometry experiments.

Flow Cytometry

Extracellular and intracellular staining were conducted as previously described (29, 30). Briefly, Fc receptors were blocked by incubating human and mouse cells with mouse IgG isotype control (Thermo Fisher Scientific) or anti-mouse CD16/CD32 (BD Biosciences), respectively, for 20 minutes at 4°C. Cells were subsequently incubated with LIVE/DEAD fixable Aqua dead cell stain kit (Thermo Fisher Scientific) as per manufacturer's instructions, and surface antigen targeting antibodies for 20 to 30 minutes at 4°C. For intracellular staining, cells were stimulated prior to Fc blocking with 1µg/mL ionomycin and 20 ng/mL phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) in the presence of 2µg/mL brefeldin A (all from Sigma-Aldrich), for 5 hours at 37°C. After staining for surface antigens, cells were fixed and permeabilized using BD Cytofix/Cytoperm (BD Biosciences) per manufacturer's instructions and incubated with cytokine targeting antibodies for 20 to 30 minutes at 4°C. Lastly, cell acquisition was done on the same day using a BD LSRII cytometer (BD Biosciences), Beckman Coulter Cytoflex S or BD FORTESSA cytometer (BD Biosciences). Cell analysis was performed using BD FACSDiva software (BD Biosciences), CytExpert (Beckman Coulter) or FlowJo software (FlowJo, LLC). Our gating strategy excluded doublets (using classical gating strategy) and dead cells. Positive gates were defined using isotype and fluorescence minus one (FMO) control.

Antibodies used for human cells included intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 phycoerythrin (PE) (BD Biosciences), vascular cell adhesion molecule (VCAM)-1 fluorescein isothiocyanate (FITC) (BD Biosciences), DICAM Alexa Fluor 647 (clone 9E9, custom-labelled by eBioscience), $\alpha\text{v}\beta_3$ integrin allophycocyanin (APC) (R&D Systems), CD45RA FITC (BD Biosciences), CD45RO APC-Cy7 (BioLegend), CD45RO PE (BD Biosciences) CD4 peridinin- chlorophyll-protein (PerCP)-Cy5.5 (BD Biosciences), CD4 Pacific Blue (BD Biosciences), CD3 Brilliant Ultraviolet 496 (BD Biosciences), IL-17 Alexa Fluor 488 (eBioscience), IFN- γ Alexa Fluor 700 (BD Biosciences), IL-4 PerCP-Cy5.5 (BD Biosciences), IL-10 PE-CF594 (BD Biosciences), or corresponding isotype controls (all from BD

Biosciences). For mouse cells, we used CD3 Brilliant Violet 605, CD4 PE-Cy7, and CD45 PercP-Cy5.5, IL-17 FITC and IFN- γ PE (all from BD Biosciences).

Immunostaining

For immunocytostaining, *in vitro* polarized human T_H17 cells were stimulated for 5 hours at 37°C with 1 μ g/mL ionomycin and 20 ng/mL PMA in the presence of 2 μ g/mL brefeldin A (all from Sigma-Aldrich). Samples were then cytopun in 25% glycerol. Immunocytostaining was performed on frozen cytopun slides as previously described (6, 30).

Human brain biopsies and autopsies were surgically collected from donors after obtaining informed consent and ethical approval (CR-CHUM research ethic committee approval number BH07.001, 20.332-YP). Tissue blocks were frozen in 2-methylbutane and cryosectioned (7 μ m thick) prior to staining. For this study, we analyzed frozen tissue blocks from 5 patients with MS (33- and 49-year-old females with RRMS; 26-year-old male with RRMS; 48- and 65-year-old males with SPMS) and 7 controls (31-, 34-, 37- and 53-year-old female controls; 34-, 42- and 67-year-old male controls). All patients were previously diagnosed with MS according to the revised 2017 revised criteria (79). MS lesions were classified using Luxol Fast Blue/Haematoxylin & Eosin staining and Oil Red O staining as previously published (2).

For murine tissues, C57BL/6 mice immunized with myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG)₃₅₋₅₅ were euthanized at peak of disease (day 19). Spinal cords were surgically removed, frozen in optimal cutting temperature compound and cryosectioned (7 μ m thick) for further staining procedures, as previously described (6, 72, 80).

For immunohistostaining, frozen tissue sections were air dried, fixed in ice-cold acetone for 10 minutes, delipidized in 70% ethanol for 5 minutes, hydrated in PBS, blocked with 10% species-specific serum (all from Thermo Fisher Scientific) of the secondary antibody host, and incubated in 3% species-specific serum containing primary antibodies overnight at 4°C. The next day, the slides were washed with PBS Tween-20 (0.05%, Sigma-Aldrich), incubated in PBS containing secondary antibodies for 1 hour at room temperature, washed again and mounted using Mowiol reagent.

For human sections co-stained for $\alpha_v\beta_3$ and CD31, each pair of primary and respective secondary antibodies were added sequentially. Briefly, they were first stained for $\alpha_v\beta_3$, and prior to mounting, they were re-incubated in 10% species-specific serum, washed in PBS Tween-20, incubated with anti-CD31 primary antibody for 1 hour at room temperature, washed, incubated with respective secondary antibody, washed, and finally mounted in Mowiol reagent containing TO-PRO-3 (1:300, Thermo Fisher Scientific). Each experiment included negative controls (secondary antibodies only).

For mouse sections, sequential immunostainings were performed for each pair of primary and respective secondary antibodies. Sections were stained for IL-17 overnight at 4°C, the following day the sections were washed and blocked with 0.3% H₂O₂ (Sigma-Aldrich), followed by incubation with donkey-anti rat biotin (pre-adsorbed for mouse, 1:500, Jackson Immunoresearch), Streptavidin-horseradish peroxidase (HRP, 1:1000, BD Biosciences) and Tyramide Alexa Fluor 647 (Thermo Fisher Scientific) per manufacturers' instructions. Subsequently, sections were incubated with anti-CD4 FITC for 1 hour at room temperature and washed with PBS Tween-20. Nuclei were stained with 4',6-diamidino-2-phénylindole (DAPI) (1:500, Sigma-Aldrich) for 10 minutes at room temperature and were finally mounted in Mowiol with one drop of ProLong Gold Antifade Mounting reagent (Thermo Fisher Scientific). Negative controls were included with secondary antibodies incubation only.

We used the following primary antibodies for human sections: mouse anti-CD4 (1:70, BD Biosciences), mouse anti-IL-17 (1:50, R&D systems), goat anti-DICAM (1:30, Santa Cruz), mouse anti-VE-cadherin (1:50, BD Biosciences), mouse anti- $\alpha_v\beta_3$ (1:200, Millipore) and mouse anti-CD31 FITC (1:200, BD Biosciences). The following primary antibodies were used for murine sections: rat anti-CD4 (1:70, BD Biosciences) and rat anti-IL-17 (1:30, BioLegend). The following secondary antibodies were used for both human and murine sections: donkey anti-goat Alexa Fluor 488 (1:350, Jackson Labs), donkey anti-goat Cy3 (1:400, Jackson Labs), donkey anti-rabbit Rhodamine Red-X (1:500, Jackson Labs), donkey anti-mouse Cy3 (1:200, Jackson Labs), goat anti-mouse Alexa Fluor 488 (1:400, Jackson Labs), donkey anti-mouse Cy3 (1:200, Jackson Labs) and donkey anti-rat Cy3 (1:300, Jackson Labs), donkey anti-rat biotin (1:500, cross-adsorbed for mouse, Jackson Labs), Streptavidin-HRP (1:1000, BD Biosciences), Tyramide Alexa Fluor 647 (Thermo Scientific).

Images (z-stacks) were acquired using a Leica SP5 confocal microscope with Leica LAS AF software. Images were processed using Fiji and LAS X. All acquisition settings were kept the same within each experiment.

In Vitro Adhesion to Plate-Bound Ligands

Experiments were conducted as previously described (49). Briefly, plates were coated with 10 µg/mL bovine serum albumin (BSA), DICAM or $\alpha_v\beta_3$ integrin (all from R&D systems) overnight at 4°C. *In vitro* differentiated human T_H1 or T_H17 cells, labelled with 5, 6-Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE) (Molecular Probes, Thermo Fisher Scientific) according to manufacturer's protocol were then transferred to the coated wells in triplicates at 100,000 cells per well. After an incubation period of 3 hours at 37°C, non-adherent cells were removed, wells were gently washed and fluorescence was measured (Synergy 4, Biotek).

In Vitro Flow Adhesion on Murine Blood-Brain Barrier Endothelial Cells

Experiments were conducted as previously described (19, 30, 72), with the exception of using murine T_H17 lymphocytes and primary cultures of murine BBB ECs. Murine T_H17 lymphocytes were generated *in vitro* by isolating CD4⁺ T lymphocytes from C57BL/6 mouse splenocytes using MACS kits (Miltenyi) and culturing them for 3 days at 37°C, in RPMI-1640 (Wisent) supplemented with FBS (10%, Sigma-Aldrich), GlutaMax (1X, Thermo Fisher Scientific), penicillin-streptomycin (100 U/mL and 100 µg/mL respectively, Thermo Fisher Scientific), non-essential amino acids (1X, Sigma-Aldrich), sodium pyruvate (1 mM, Thermo Fisher Scientific), HEPES (0.01 M, Wisent) and β -mercaptoethanol (50 µM, Sigma-Aldrich), on plate-bound anti-CD3 (10 µg/mL incubated for 2-3 hours at 37°C, clone 145-2C11, Bio X Cell) in presence of anti-CD28 (2 µg/mL, clone 37.51, BD Biosciences), recombinant mouse (rm) IL-6 (20 ng/mL, R&D Systems), rm IL-23 (20 ng/mL, R&D Systems), rh TGF- β (4 ng/mL, R&D Systems), and anti-IFN- γ (20 µg/mL, clone XMG1.2, Bio X Cell).

Intravital Two-Photon Laser Scanning Microscopy

C57BL/6 mice with passive experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) were anesthetized by 1 mg/kg Medetomidin hydrochloride (Dorbene vet) and 100 mg/kg ketamine and then placed on a custom-built heated stage. Body temperature was monitored with a rectal temperature probe (Telemeter Electronic GmbH) and was kept at 36 to 37 °C. Oxygen was delivered through a

mask placed in front of the snout. Anesthesia was maintained using 1.2% vol. isoflurane and further injections of anesthetic, as needed. The surgery and imaging of the spinal cord was performed as previously described (82). For the visualization of T lymphocytes entry into the spinal cord, the animals were imaged in several separate experiments starting at day 3 post-transfer until day 7. Three independent transfer experiments were conducted. Blood vessels were visualized by intravenous injection of fluorescently labeled 2,000-kDa dextran before intravital two-photon microscopy (2-PM) recordings. The 2-PM was performed using an LSM710/Axio Examiner Z1 microscope (Carl Zeiss Microimaging) combined with a >2.5-watt Ti:Sapphire Chameleon Vision II Laser device (Coherent GmbH). The excitation wavelength was tuned to 880 nm and routed through a 20× Plan-APOCHROMAT water immersion objective with N.A. 0.95 (Carl Zeiss Microimaging). Excited fluorescence was detected with non-descanned detectors equipped with 442/46, 483/32, 525/50, 550/49, 607/70, 624/40, and 680/26 nm band-pass filters (Semrock Inc). The microscope was operated with Zen 2009 software (Carl Zeiss). Four-dimensional (x, y, z, and t) image stacks were analyzed with Imaris 7.1.1 software (Bitplane).

In Vitro Adhesion on Human Blood-Brain Barrier Endothelial Cells

In vitro differentiated human T_H1 or T_H17 cells were pre-treated with anti-DICAM antibody (20 µg/mL, clone 9E9) or isotype (20 µg/mL, Bio X Cell) for 1 hour, and transferred to wells coated with confluent monolayers of primary cultures of human BBB ECs. After an incubation period of about 18 hours at 37°C, unadhered T lymphocytes were removed by slowly aspirating the culture media and gently washing the BBB ECs monolayers with warm PBS. To dislodge adhering T lymphocytes from BBB ECs, cells were incubated in warm PBS containing EDTA (2 mM) for 10 minutes at 37°C, then in warm PBS-EDTA containing trypsin (0.025%) for 40 seconds, and lastly in human serum to stop the reaction. Detached T cells were counted using a hemocytometer.

In Vitro Migration Across Human Blood-Brain Barrier Endothelial Cells

We conducted these experiments as previously described (3, 28, 30, 77). Briefly, *in vitro* differentiated human T_H17 cells were pre-treated with anti-DICAM antibody (20 µg/mL, clone 9E9) or isotype (20 µg/mL, Bio X Cell) for 1 hour, transferred to the top compartment of our Boyden chamber featuring a confluent monolayer of primary cultures of human BBB ECs, and left

overnight. The migrated cells in the bottom compartment were collected and quantified on the following day using a hemocytometer.

Experimental Autoimmune Encephalomyelitis

For the active MOG₃₅₋₅₅ EAE model, C57BL/6 female mice were purchased from Jackson Laboratories. The experiments were approved by the Animal Care Committee of the CR-CHUM in accordance with the guidelines of the Canadian Council on Animal Care (approval number N19036APs). Induction, scoring and pathology of EAE was performed as previously described (6, 19, 29). Briefly, female C57BL/6 mice were immunized subcutaneously with MOG₃₅₋₅₅ (200 µg, MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGK, Alpha Diagnostic) in a 100µl emulsion of incomplete Freund's adjuvant supplemented with Mycobacterium tuberculosis (4 mg/mL, Thermo Fisher Scientific). Pertussis toxin (400 ng, List Labs) was injected intraperitoneally on days 0 and 2. After disease onset, animals were injected intraperitoneally with either 200 µg of anti-DICAM antibody (clone 9E9) or isotype (Bio X Cell), every other day (7 total injections). Disease was monitored as follows: 0 = normal; 1 = limp tail; 2 = slow righting-reflex; 3 = paralysis of one hindlimb (monoparalysis); 4 = paralysis of both hindlimbs (paraparalysis); 5 = moribund (sacrifice). Clinical disease in mice was assessed by an investigator blinded to the treatment group. Lastly, brain and spinal cords were surgically harvested after intracardiac perfusion from mice at peak of disease (day 19) to allow flow cytometry analysis and immunofluorescence as previously described (6).

Passive MOG₃₅₋₅₅ EAE was used for the analysis of spinal cord infiltration by intravital two-photon microscopy and flow cytometry, C57BL/6 and C57BL/6-Tg(CAG-EGFP)10sb/J (<https://www.jax.org/strain/003291>) female mice were purchased from Jackson Laboratories. Active EAE was induced in "Act-GFP" mice by subcutaneous injections of MOG₃₅₋₅₅ (75µg, MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGK) in a 150µL emulsion of incomplete Freund's adjuvant supplemented with Mycobacterium tuberculosis (0.5 mg/mL, Thermo Fisher Scientific). Pertussis toxin (200 ng, Sigma-Aldrich) was administered intraperitoneally on days 0 and 2. Draining lymph nodes were harvested on day 10 post-immunization, and leukocytes were cultured for 3 days at 37°C, in RPMI-1640 (Wisent) supplemented with FBS (10%, Sigma-Aldrich), GlutaMax (1X, Thermo Fisher Scientific), penicillin-streptomycin (100 U/mL and 100 µg/mL respectively, Thermo Fisher Scientific), non-essential amino acids (1X, Sigma-Aldrich), sodium pyruvate (1 mM, Thermo Fisher

Scientific), HEPES (0.01 M, Wisent) and β -mercaptoethanol (50 μ M, Sigma-Aldrich), in presence of MOG₃₅₋₅₅ (20 μ g/mL), rm IL-6 (20 ng/mL, R&D Systems), rm IL-12 (3 ng/mL, R&D Systems), rm IL-23 (20 ng/mL, R&D Systems) and rh TGF- β (4 ng/mL, R&D Systems). 2.5×10^6 cells were then transferred intravenously into naïve C57BL/6 recipient mice to induce passive EAE. The recipient mice were injected intravenously with either 200 μ g anti-DICAM antibody (9E9 clone) or isotype control (Bio X Cell) every day from day 2 to day 6 post-transfer (5 injections). Clinical disease was assessed using the same scale as for active EAE experiments. Intravital two-photon microscopy and flow cytometry analyses were performed as previously described on mice at the pre-symptomatic phase (3 to 4 days post-adoptive transfer) and at disease onset (4 to 7 days post-adoptive transfer). For the investigation of prophylactically administered anti-DICAM antibody in passive EAE in C57BL/6 mice, the same protocol was used but with the following modifications. Only female C57BL/6 mice were used. 10×10^6 *in vitro* reactivated splenocytes were intraperitoneally transferred into naïve recipient mice to induce disease. The recipient animals were injected intraperitoneally with either 200 μ g anti-DICAM antibody (9E9 clone) or isotype control (Bio X Cell), every other day from day 8 (pre-symptomatic phase) onwards (7 total injections).

For the TCR1640 passive EAE models, disease was induced and monitored as previously described (59). Briefly, splenocytes were harvested from 8 to 17-week-old female and male TCR1640 mice before the development of spontaneous disease, stimulated in T_H1/T_H17 conditions for 4 days, and transferred into 10 to 12-week-old naïve female and male SJL wildtype littermates. Anti-DICAM antibody (clone 9E9) or isotype (Bio X Cell) were injected intraperitoneally at 400 ng per dose every other day from day 4 onwards (10 total injections). Clinical disease in mice was assessed by an investigator blinded to the treatment group. The following clinical parameters were also used to analyze disease development in individual mice. Relapses were defined as increases of ≥ 2 in clinical score without remission. Relapse severity refers to the maximum clinical score reached during a relapse. Remissions were defined as decreases back to clinical score ≤ 1 following a relapse. Remission amplitude refers to the delta decrease from each relapse max score (relapse severity) to lowest subsequent score.

Supplementary figures

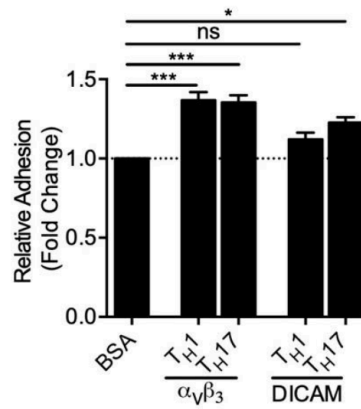


Fig. S1. T_H17 and T_H1 cells adhere to DICAM and $\alpha_v\beta_3$ *in vitro*.

Relative adhesion (fold change \pm SEM) of human *in vitro* differentiated T_H1 and T_H17 lymphocytes to BSA, DICAM or $\alpha_v\beta_3$ are shown; $n = 3$; not significant (ns), $*P < 0.05$ and $***P < 0.001$, by one-way analysis of variance (ANOVA) with Tukey's post hoc test.

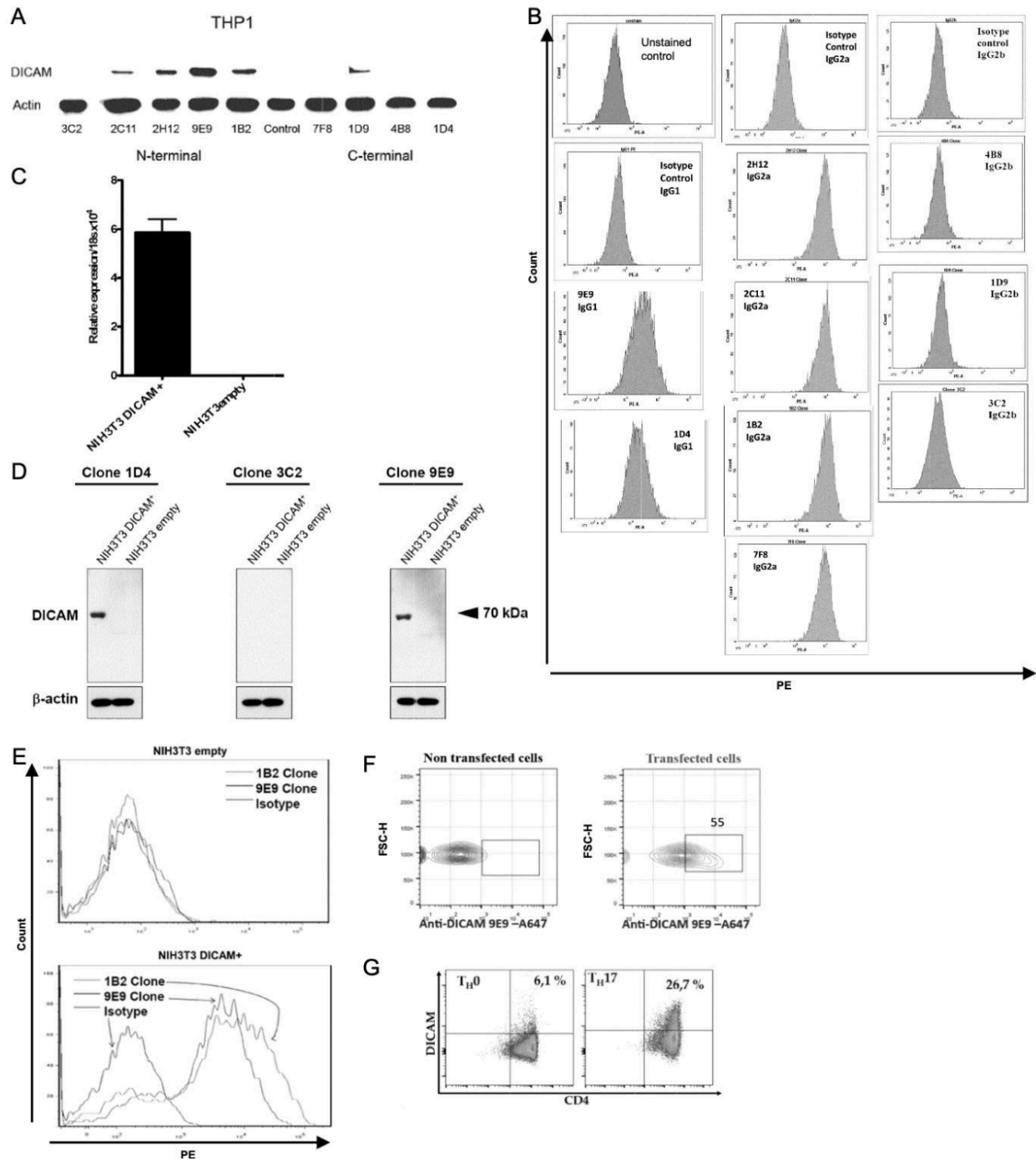


Fig. S2. Validation of anti-DICAM monoclonal antibody.

(A) Hybridoma antibody clones efficacy to bind DICAM was assessed by western blot. THP-1 cell lysates (30 μ g) were loaded on 12% SDS-PAGE gel, electrophoresed for 90 minutes at 100V, and transferred to PVDF membranes. Supernatants from hybridoma clone 3C2, 2C11, 2H12, 9E9, and 1B2 (N-terminal DICAM epitope 57-71) or clone 7F8, 1D9, 4B8 and 1D4 (C-terminal DICAM

epitope 372-385) were incubated at 4 °C (50 µg/ml) for 12 hours. Secondary antibody is goat anti-mouse pan-IgG coupled HRP (1:2000 dilution). Actin is shown as a loading control. Data shown are representative of $n = 4$. **(B)** Hybridoma antibody clone screening by flow cytometry is shown using THP-1 cells. THP-1 cells were immunostained with anti-DICAM clones 2H12, 1B2, 9E9, 1D4, 1D9 3C2 and 7F8 or respective isotype controls (5 µg in 100 µl) at 4 °C for 45 minutes. Data shown are representative of $n = 4$. **(C to F)** Characterization of anti-DICAM monoclonal antibody clones 1B2 and 9E9 is shown. NIH3T3 cells were transfected with a human DICAM-encoding vector (pCMV6-neo-DICAM) or with an empty vector (pCMV6-neo). **(C)** DICAM mRNA expression was assessed by qPCR in NIH3T3 cells transfected with DICAM-encoding vector (NIH3T3 DICAM⁺) or empty vector (NIH3T3 empty). **(D)** DICAM expression was assessed by western blot using anti-DICAM clones 1D4, 3C2 and 9E9. **(E)** Analysis of anti-DICAM clones' efficacy to stain DICAM on NIH3T3 DICAM⁺ versus NIH3T3 empty cells is shown as assessed by flow cytometry; data shown are representative of $n = 4$. **(F)** Analysis of anti-DICAM clone 9E9 efficacy to stain DICAM is shown on NS0 cells transfected versus non transfected with a DICAM-encoding vector, as assessed by flow cytometry. **(G)** DICAM staining is shown on T_H0 and T_H17 lymphocytes using fluorochrome-coupled 9E9 anti-DICAM antibody, as analyzed by flow cytometry. $n \geq 5$.

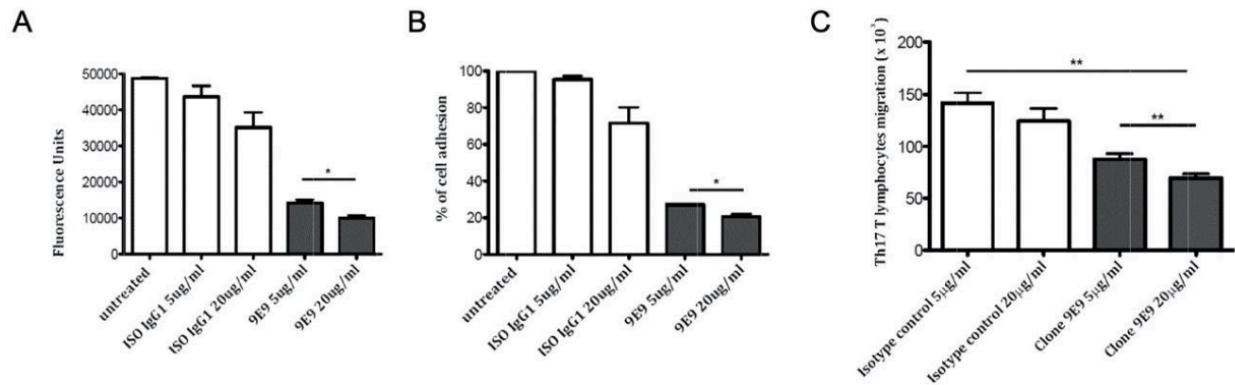


Fig. S3. Anti-DICAM 9E9 clone blocks the adhesion and migration of T_H17 lymphocytes.

(A and B) T_H17 lymphocytes were stained with CFSE and pre-incubated with anti-DICAM 9E9 clone (5 or 20 $\mu\text{g/ml}$) or isotype control (IgG1 at 5 or 20 $\mu\text{g/ml}$). T_H17 lymphocytes were added to plates pre-coated with $\alpha_V\beta_3$ (10 $\mu\text{g/ml}$) for 3 hours at 37 °C. After five washes, adherence of T_H17 lymphocytes to $\alpha_V\beta_3$ was assessed by (A) quantifying CFSE fluorescence and (B) counting adhering cells. (C) Quantification of T_H17 cells that migrated through *in vitro* human BBB ECs pre-incubated with anti-DICAM blocking antibody (9E9 at 5 or 20 $\mu\text{g/ml}$) or isotype control (IgG1 at 5 or 20 $\mu\text{g/ml}$) is shown. Data shown are representative of 5 independent experiments performed in triplicate. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ by Student's *t* test.

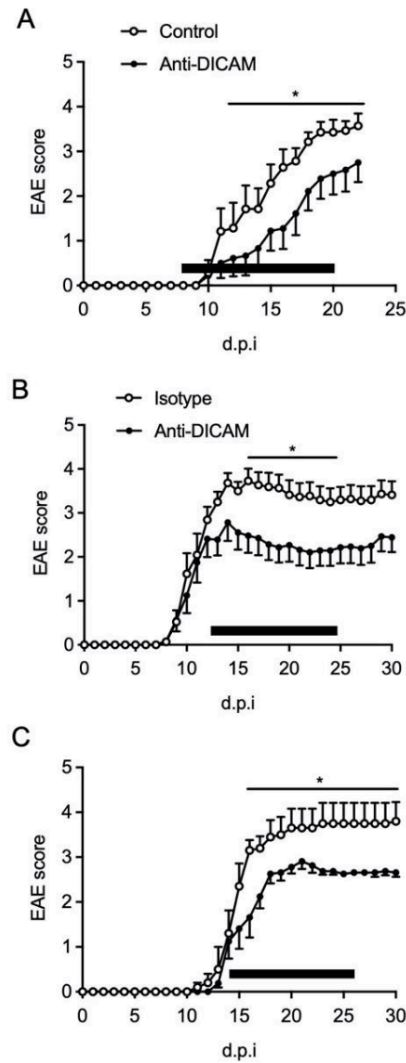


Fig. S4. Prophylactically and therapeutically blocking DICAM alleviates EAE disease severity.

(A) Clinical scores (mean \pm SEM) are shown for passive EAE in C57BL/6 mice that were injected intraperitoneally with anti-DICAM antibody (200 μ g per dose; 7 total injections) or isotype control (IgG1) every other day, starting at day 8 before disease onset (prophylactic paradigm); $n = 7$ to 9 mice per group. **(B and C)** Clinical score (mean \pm SEM) are shown for active EAE in C57BL/6 mice immunized with MOG₃₅₋₅₅ and injected intraperitoneally with anti-DICAM antibody (200 μ g per dose; 7 total injections) or isotype control (IgG1) every other day, starting after disease onset (therapeutic paradigm); independent experiments; $n = 5$ to 14 mice per group. Black bars indicate treatment window. (A to C) $*P < 0.05$ by Wilcoxon-Mann-Whitney test comparing areas under the curve.

	OR	2.5%	97.5%	Z value	P value
Patients with RRMS					
DICAM frequency alone	1.92	0.96	3.81	1.86	0.06
DICAM frequency with age	5.56	0.93	33.08	1.88	0.06
Patients with SPMS					
DICAM frequency alone	1.34	0.99	1.81	1.89	0.06
DICAM frequency with age	1.37	1.01	1.88	2.00	0.05
Patients with PPMS					
DICAM frequency alone	1.38	1.03	1.84	2.14	0.03
DICAM frequency with age	1.45	1.03	2.04	2.11	0.03

Table S1. Associations between DICAM frequency on memory CD4⁺ T lymphocytes and disease activity in patients with different forms of MS.

The multivariate logistic regression analysis was performed without (alone) or with age as a confounding factor. Shown are odd ratio (OR), 95% confidence intervals (2.5% and 97.5% percentiles), standardized estimate (z value) and P value.

Chapitre 4 – Discussion

La SEP est une maladie neurologique complexe pour laquelle l'étiologie multifactorielle demeure difficile à caractériser. Malgré ce manque de consensus, c'est une maladie unanimement définie comme neuroinflammatoire et dans laquelle le système immunitaire est considéré comme jouant un rôle central. En effet, deux paradigmes sont considérés dans les causes du développement de la maladie : *outside-in*, où une réaction immunitaire en périphérie entraînerait une auto-immunité contre la myéline par la similarité des motifs/antigènes reconnus, et la théorie *inside-out*, où une blessure intra-SNC entraînerait la présentation d'antigène du soi aux cellules immunitaires (Morgan et al., 2020). Que ce soit l'une, l'autre ou une combinaison des deux paradigmes qui soit à l'origine de la maladie, il n'en est pas moins que le passage des cellules immunitaires de la périphérie vers le SNC est une étape cruciale de la pathologie. De nombreuses cellules immunitaires contribuent à la formation des lésions comme le suggère leur présence dans celles-ci. Les lymphocytes T CD8⁺ sont la catégorie de lymphocyte la plus représentée au sein des lésions. Les lymphocytes B et T CD4⁺ font aussi partie de ses infiltrats et semblent y jouer un rôle pathogénique en participant à la propagation de l'inflammation.

Argument majeur de leur contribution au sein du SNC, les thérapies comme le natalizumab et le fingolimod, qui limitent leur entrée dans ce compartiment en les séquestrant en périphérie, sont des thérapies efficaces pour réduire l'activité de la maladie (Cohen et al., 2010; Kappos et al., 2010; Polman et al., 2006; Rudick et al., 2006). Le natalizumab cible VLA-4, molécule clé dans la migration des lymphocytes à travers les barrières du SNC (Villar et al., 2012; Warnke et al., 2015; Yednock et al., 1992). Parce que l'expression de VLA-4 par les leucocytes est ubiquitaire, le natalizumab entraîne aussi une réduction de la surveillance immunitaire au sein du SNC. Ainsi, une infection au virus JC est parfois recensée. Celle-ci peut être fatale pour certaines personnes traitées. De plus, lorsque le risque d'infection secondaire est trop élevé, l'arrêt du traitement peut mener à des rebonds cliniques sévères (Killestein et al., 2010).

Ainsi, notre équipe travaille depuis plus de 15 ans à identifier des cibles thérapeutiques potentielles bloquant spécifiquement en périphérie les cellules encéphalitogéniques, permettant ainsi de conserver une surveillance immunitaire du SNC fonctionnelle.

Le rôle d'ALCAM dans la migration des lymphocytes B vers le SNC en SEP

La première partie de cette thèse se concentre sur le rôle de la molécule ALCAM dans la migration des lymphocytes B. C'est à la suite d'une analyse protéomique des microdomaines membranaires des cellules endothéliales inflammées de la barrière hémato-encéphalique que la molécule ALCAM a pu être identifiée (Cayrol et al., 2008). Ces microdomaines aussi nommés radeaux lipidiques sont connus pour leur rôle de plateforme faisant le lien entre les protéines transmembranaires et le réseau protéique intracellulaire. Au niveau de la barrière hémato-encéphalique, ces domaines peuvent jouer le rôle de plateforme membranaire impliquée dans la migration des lymphocytes (Dodelet-Devillers et al., 2009). Ainsi, les travaux de Cayrol donnèrent suite à plusieurs études dans notre laboratoire, explorant le rôle d'ALCAM dans le maintien de la barrière hémato-encéphalique et la migration des leucocytes à travers les barrières du SNC (Cayrol et al., 2008; Lecuyer et al., 2017; Lyck et al., 2017).

ALCAM est une molécule exprimée par plusieurs types cellulaires impliqués dans la pathologie de la SEP. D'abord, elle est présente entre autres au niveau des vaisseaux sanguins parenchymateux où elle est exprimée par les cellules endothéliales qui la constitue et ce, d'autant plus dans un contexte inflammatoire (Cayrol et al., 2008). Au-delà de son expression à la membrane des cellules endothéliales, ALCAM est exprimée par les monocytes et les lymphocytes B (Cayrol et al., 2008). Les travaux présentés ici dans le premier manuscrit sont alors effectués dans le but de comprendre le rôle potentiel d'ALCAM dans la migration des lymphocytes B à travers les barrières du SNC.

En résumé, nous avons montré qu'ALCAM est préférentiellement exprimé par des lymphocytes B mémoires activés *ex vivo*. Les lymphocytes B ALCAM⁺ ont un profil pro-inflammatoire révélé par

la sécrétion des cytokines IL-6, GM-CSF et TNF- α . De plus, ALCAM est exprimée à la membrane des lymphocytes B activés *in vitro*. Dans un contexte neuroinflammatoire *in vivo*, nous avons montré que la proportion de lymphocytes B ALCAM⁺ corrèle avec la sévérité des symptômes d'EAE et ce, dans des modèles EAE lymphocytes B dépendants ainsi que lymphocytes T dépendants. Ensuite, grâce à l'utilisation de modèles *in vitro* et *in vivo*, nous avons montré qu'ALCAM participe à la migration des lymphocytes B à travers les barrières hémato-encéphalique et hémato-méningée du SNC. L'administration d'un anticorps monoclonal bloquant ALCAM entraîne, non seulement une réduction de l'infiltration des lymphocytes B dans le SNC des souris, mais aussi une réduction significative des symptômes qu'elles expérimentent. Pour finir, la proportion de lymphocytes B qui exprime ALCAM est augmentée chez les personnes atteintes de SEP et elle représente la majorité des lymphocytes B infiltrant les lésions de SEP.

ALCAM est exprimée par des lymphocytes B au profil pathogénique

En premier lieu, nos résultats montrent qu'ALCAM est plutôt exprimée par les lymphocytes B activés qui possèdent un profil mémoire. Ces résultats sont confirmés par des travaux effectués en 2018 qui ont montré que l'expression d'ALCAM par les lymphocytes B mémoires était plus importante que celle des cellules transitionnelles et naïves (McWilliam et al., 2018). Dans un second temps, nous avons démontré que les lymphocytes B ALCAM⁺ sécrètent des niveaux importants de TNF- α , d'IL-6 et de GM-CSF. Ces trois cytokines sont sécrétées par les lymphocytes B dans leur état activé et sont activatrices des lymphocytes T, des cellules myéloïdes et des lymphocytes B eux-mêmes. De nombreuses publications soulignent leur contribution dans la SEP. D'après la littérature, chez les personnes atteintes de SEP, les lymphocytes B périphériques ont un profil effecteur pro-inflammatoire et sécrètent des niveaux anormalement élevés d'IL-6, de LT- α , de TNF- α et de GM-CSF (Bar-Or et al., 2010; Barr et al., 2012; Duddy et al., 2007; Li, Rezk, Miyazaki, et al., 2015; McWilliam et al., 2018). De plus, les cytokines pro-inflammatoires sont connues pour être majoritairement produites par les lymphocytes B mémoires parmi les sous-types de B (Li, Rezk, Miyazaki, et al., 2015; McWilliam et al., 2018). Ainsi, les lymphocytes B ALCAM⁺ appartiennent à cette catégorie de lymphocytes B mémoires au profil pro-inflammatoire.

Parmi ces cytokines, le TNF- α est une cytokine pro-inflammatoire sécrétée très tôt pendant l'inflammation jouant un rôle clé dans l'induction de la cascade de cytokines pro-inflammatoires. Le TNF- α est déjà connue pour son rôle pathogénique dans plusieurs maladies auto-immunes comme la polyarthrite rhumatoïde ou les maladies inflammatoires de l'intestin (discuté dans Udalova et al., 2016). Elle fut d'ailleurs identifiée comme étant une cible thérapeutique efficace pour traiter ces maladies. L'IL-6 quant à elle, est une cytokine qui peut induire une différenciation des lymphocytes T naïfs en T_H17 par son inhibition des lymphocytes T_{reg} (Kimura & Kishimoto, 2010; Korn et al., 2008; Schneider et al., 2013). Il s'avère d'ailleurs que l'efficacité du rituximab (thérapie anti-CD20) pourrait en partie être due à une ablation des lymphocytes B sécrétant de l'IL-6 (Barr et al., 2012). Enfin, dans le cadre de maladie chronique inflammatoire, le GM-CSF est une cytokine clé dans la communication entre les lymphocytes pathogéniques et les phagocytes pénétrant le tissu (discuté dans Becher et al., 2016). Elle fut d'ailleurs démontrée comme actrice de la neuroinflammation par son rôle sur l'expansion, l'inflammation et l'infiltration des cellules myéloïdes vers le SNC (Spath et al., 2017; Vogel et al., 2015). Ces résultats indiquent donc que les lymphocytes B ALCAM⁺ ont un profil plutôt pathogénique de cellule mémoire pro-inflammatoire, suggérant qu'ALCAM serait une cible adéquate pour viser cette sous-catégorie de lymphocytes B.

Parmi les rôles que les lymphocytes B peuvent jouer, ils ont le potentiel d'être régulateurs de l'immunité par la sécrétion de cytokines telles que l'IL-10, le TGF- β et l'IL-35 (Rosser & Mauri, 2015). Parmi les sous-populations de lymphocytes B régulateurs sont les lymphocytes B transitionnels CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi}. Nos résultats montrent ici que cette sous-population de lymphocyte B n'exprime qu'en faible proportion la molécule ALCAM (environ 10 %) par rapport aux lymphocytes B mémoires et activés (environ 80 %). En SEP, ce sont les lymphocytes B mémoires et activés qui sont considérés comme pathogènes par leur action de cellules présentatrices d'antigène et de cellules sécrétrices de cytokines (discuté dans Cencioni et al., 2021; DiSano et al., 2021; Jelcic et al., 2018). Ainsi, cibler ALCAM dans la SEP permettrait de cibler les lymphocytes B pathogéniques tout en épargnant les lymphocytes B régulateurs, potentiellement bénéfiques dans la pathologie.

ALCAM est surexprimée par les lymphocytes B périphériques de patients atteints de SEP

Comme mentionné précédemment, ALCAM est une molécule exprimée par une grande variété de cellules parmi lesquelles sont les cellules souches hématopoïétiques et mésenchymateuses, les cellules stromales de la moelle osseuse, les cellules épithéliales, les cellules endothéliales des barrières hémato-encéphalique et hémato-méningée, les neurones, les monocytes, les cellules myéloïdes progénitrices, les lymphocytes B et les cellules tumorales (Arai et al., 2002; Cayrol et al., 2008; Ferragut et al., 2021; Munsterberg et al., 2020; Ohneda et al., 2001). Elle est initialement connue pour son rôle dans l'hématopoïèse, l'inflammation, la propagation des tumeurs et l'activation des lymphocytes T (Darvishi et al., 2020; Ferragut et al., 2021; Hassan et al., 2004; Weidle et al., 2010; Zimmerman et al., 2006). Exprimée à la membrane cellulaire, ALCAM exerce son activité par son interaction de façon homotypique avec elle-même ou de façon hétérotypique avec CD6, notamment connu pour son rôle de molécule co-stimulatrice exprimée par les lymphocytes T CD4⁺ (Swart, 2002; van Kempen et al., 2001). L'implication d'ALCAM et de son ligand CD6 dans la SEP est d'ailleurs soutenue par l'identification de variant de ses deux molécules prédisposant à la maladie (De Jager et al., 2009; Kofler et al., 2011; Wagner et al., 2014; Wagner et al., 2013). De façon intéressante, lorsqu'on étudie l'expression d'ALCAM dans un contexte humain de SEP, on observe qu'elle est exprimée par une plus grande proportion de lymphocytes B du sang périphérique des personnes atteintes des formes cyclique et secondaire progressive que dans un contexte sain. Ainsi, le contexte inflammatoire de la maladie semble propice à une surexpression d'ALCAM par plusieurs acteurs clés de la pathologie, dont font partie les lymphocytes B comme nos résultats le montrent, mais aussi les cellules endothéliales de la barrière hémato-encéphalique comme précédemment observé dans les lésions actives de SEP (Cayrol et al., 2008). Ainsi, le contexte inflammatoire de la SEP augmenterait la possibilité d'une interaction homotypique ALCAM-ALCAM entre les cellules endothéliales des vaisseaux cérébraux et les lymphocytes B périphériques potentiellement infiltrant. Constituant une limite, notre étude ne présente pas le profil d'expression d'ALCAM par les sous-populations de lymphocytes B du sang périphérique de personnes atteintes de SEP. Mais étant donné les observations faites sur les lymphocytes B périphériques de contrôles sains, nos résultats suggèrent qu'ALCAM y serait plutôt

exprimé par un sous-type de lymphocytes B effecteurs au potentiel pathogénique. Cela dit, une étude plus complète des types et sous-types cellulaires qui expriment ALCAM dans le sang périphérique des patients atteints de SEP cyclique et progressives, serait nécessaire pour mieux caractériser les cellules qui seraient ciblées par une thérapie neutralisant ALCAM.

ALCAM participe à la migration des lymphocytes B à travers les barrières du SNC

Le rôle d'ALCAM dans la migration cellulaire est aujourd'hui un mécanisme connu dans plusieurs contextes. C'est le cas en cancérologie où les études rapportent qu'ALCAM participe aux premières étapes de métastase dans plusieurs types de cancers (Darvishi et al., 2020). Cette activité d'ALCAM est attribuée à son rôle dans l'adhérence des cellules métastatiques aux cellules endothéliales du cerveau, y favorisant leur entrée (Munsterberg et al., 2020; Soto et al., 2014), et pour son rôle dans la progression tumorale (von Lersner et al., 2019). Dans la même lignée, les études menées par notre laboratoire ont mis en évidence son rôle dans la migration de cellules immunitaires (monocytes et lymphocytes T CD4⁺) *in vitro*, à travers les cellules endothéliales de la barrière héméo-encéphalique et *in vivo*, vers le SNC dans un contexte neuroinflammatoire (Cayrol et al., 2008; Lyck et al., 2017). Dans ce manuscrit, nous nous sommes alors intéressés au rôle d'ALCAM dans la migration d'une catégorie de leucocytes jouant un rôle central dans la physiopathologie de la SEP, les lymphocytes B. En premier lieu, nous avons observé une réduction du roulement, de l'adhérence et de la migration des lymphocytes B murins KO pour ALCAM sur et à travers les cellules endothéliales du SNC. Les mêmes observations ont été faites lorsque des cellules humaines sont utilisées en pré-incubant les lymphocytes B avec un anticorps bloquant ALCAM. Les expériences de migration dans les chambres de Boyden (en contexte statique) ont montré qu'ALCAM joue un rôle dans l'étape de diapédèse des lymphocytes B à travers les cellules endothéliales de la barrière héméo-encéphalique. Ce sont des observations qui avaient déjà été faites dans le laboratoire dans le contexte de migration des monocytes et des lymphocytes T CD4⁺ (Cayrol et al., 2008). D'un autre côté, les expériences d'adhérence dans un flux dynamique sur les cellules endothéliales ont montré que bloquer ALCAM entraîne une

diminution du nombre de monocytes et de lymphocytes B qui roulent et adhèrent aux cellules endothéliales mais ceci n'est pas vrai pour les lymphocytes T CD4⁺ (Lyck et al., 2017). Ces observations suggèrent donc que l'interaction homotypique ALCAM-ALCAM qui est possible entre monocytes/lymphocytes B et cellules endothéliales participe aux étapes de roulement et d'adhérence là où l'interaction de CD6 avec ALCAM entre lymphocytes T CD4⁺ et cellules endothéliales ne serait pas impliquée. Ces expériences suggèrent que les cinétiques des interactions homotypique (ALCAM-ALCAM) et hétérotypique (ALCAM-CD6) d'ALCAM diffèrent. Ce sont des observations qui ont déjà été faites dans une étude en microscopie de force atomique où il est décrit que les interactions hétérotypique et homotypique de la molécule ALCAM ont des cinétiques et des propriétés physiques différentes (Te Riet et al., 2007).

Dans le laboratoire, il a été montré qu'ALCAM est un acteur important dans le maintien de l'intégrité de la barrière hémato-encéphalique. Elle est d'ailleurs exprimée au niveau des jonctions serrées des cellules endothéliales de la barrière (Lecuyer et al., 2017). Plus précisément, ALCAM est présente au niveau des radeaux lipidiques qui sont une structure membranaire impliquée dans le maintien des jonctions serrées et dans l'extravasation des cellules immunitaires (Cayrol et al., 2008; Dodelet-Devillers et al., 2009; Manes & Viola, 2006). C'est un domaine membranaire où l'on retrouve d'autres molécules impliquées dans l'adhérence et la migration des leucocytes comme ICAM-1, VCAM-1, MCAM ou sélectine E (Carman & Springer, 2004; Dodelet-Devillers et al., 2009; Kiely et al., 2003). Nous avons pu démontrer ici que les lymphocytes B périphériques exprimant ALCAM co-expriment les molécules VLA-4 (ligand de VCAM-1) et LFA-1 (ligand d'ICAM-1) dans un contexte sain ainsi que chez les patients atteints de SEP cyclique. Considérant qu'ALCAM et ces molécules d'adhérences se retrouvent au niveau des radeaux lipidiques, leur co-expression à la surface des lymphocytes B suggère leur collaboration via des interactions directes ou indirectes. Dans ce sens, les radeaux lipidiques sont des structures impliquées dans le recrutement des molécules d'adhérences et la polarisation cellulaire lors des contacts cellule-cellule (Manes & Viola, 2006). Il serait intéressant d'explorer alors par exemple en western blot si ALCAM se localise au niveau des radeaux lipidiques de lymphocytes B avec d'autres molécules clés (ex. VLA-4) de la migration de lymphocytes B à travers les cellules endothéliales de la barrière.

Bloquer ALCAM *in vivo* réduit l'infiltration au SNC des lymphocytes B et la sévérité de la maladie chez les souris EAE.

Ensuite, afin de comprendre le rôle d'ALCAM dans un contexte *in vivo*, nous avons exploré dans plusieurs modèles d'EAE quels étaient les effets d'un traitement bloquant ALCAM sur la sévérité de la maladie et le blocage des lymphocytes B hors du SNC. Les travaux déjà effectués dans le laboratoire ont montré qu'injecter un anticorps anti-ALCAM dès le début des symptômes des souris EAE induites avec le MOG₃₅₋₅₅ (lymphocyte T dépendante) réduit la sévérité de la maladie et l'étendue des lésions de la moelle épinière des souris (Cayrol et al., 2008). Ces résultats suggèrent qu'ALCAM contribue aux dommages du SNC médiés par les cellules immunitaires. De la même manière, nous avons effectué des injections de l'anticorps anti-ALCAM à partir du début des symptômes dans le contexte d'une EAE lymphocyte B dépendante (EAE-rhMOG). Nous avons observé, non seulement une réduction de la sévérité de la maladie chez les animaux traités, mais aussi, celle-ci est accompagnée d'une réduction de la proportion de lymphocytes B infiltrés dès le début de la maladie dans les méninges en microscopie intravitale 2-photon et dans le SNC par une analyse en cytométrie de flux. Par ces expérimentations, nous avons pu montrer qu'ALCAM participe à la migration des lymphocytes B vers le SNC dans un contexte neuroinflammatoire et que sa neutralisation permet de réduire les symptômes. En revanche, notre étude ne permet pas de faire un lien direct entre ces deux résultats bien qu'ils semblent être corrélés. Pour aller plus loin, il serait donc intéressant d'explorer par quels mécanismes exacts la neutralisation d'ALCAM chez les animaux permet de réduire la neuroinflammation. Contribue-t-elle à la neuroinflammation par son expression à la membrane des lymphocytes B, des monocytes, des cellules endothéliales de la barrière ou une combinaison de celles-ci ? Et est-ce que c'est via une interaction en périphérie ou au sein du SNC ? Ces questions restent en suspens.

ALCAM est, en effet, une molécule co-stimulatrice et est impliquée dans la synapse immunologique entre lymphocyte T et cellule présentatrice d'antigène (Hassan et al., 2004; Zimmerman et al., 2006). C'est pourquoi il n'est pas exclu qu'ALCAM participe à la synapse immunologique entre lymphocytes B et T en périphérie et au sein des infiltrats méningés de SEP.

Elle participerait alors à la propagation de la réponse auto-immune et au maintien de la neuroinflammation. Les travaux de Dr Romain Cayrol ont tout de même déjà montré que bloquer ALCAM n'influence pas la co-stimulation des lymphocytes T par les monocytes *in vitro* (Cayrol et al., 2008). Mais ceci n'a pas été confirmé avec les lymphocytes B.

Comme déjà mentionné, certains variants des gènes codants pour ALCAM et son ligand CD6 sont prédisposants pour la maladie de la SEP (De Jager et al., 2009; Kofler et al., 2011; Wagner et al., 2014; Wagner et al., 2013). Nous avons voulu explorer comment ALCAM contribue à la physiopathologie de la SEP en nous concentrant sur son rôle de molécule d'adhérence à la surface des lymphocytes B. Nos résultats démontrent qu'ALCAM est impliqué dans le passage des lymphocytes B à travers deux points d'entrée des leucocytes vers le SNC : la barrière hémocéphalique et la barrière hémoméningée. En effet, nous avons pu démontrer que les lymphocytes B exprimant ALCAM se retrouvent dans les infiltrats de cellules immunitaires parenchymateux et méningés que ce soit chez les souris EAE ou chez les patients atteints de SEP. Par ailleurs, nous avons décrit que les lymphocytes B migrent plus facilement à travers les cellules endothéliales de la barrière hémoméningée que hémocéphalique *in vitro*, et que bloquer ALCAM réduit leur migration à travers les cellules endothéliales de ces deux barrières. Ces résultats vont de pair avec de précédents résultats démontrant qu'ALCAM est exprimée en plus grande proportion par les cellules endothéliales méningées par rapport aux cellules endothéliales hémocéphaliques (Lyck et al., 2017). Ensemble, ces résultats indiquent qu'ALCAM participerait à la migration des lymphocytes B vers les infiltrats méningés et contribuerait possiblement à leur accumulation dans les structures de type lymphoïdes dans la SEP. Dans les infiltrats leucocytaires méningés, la présence des lymphocytes B est associée à une augmentation de l'inflammation méningée qui elle-même est corrélée au niveau d'activation des microglies et de démyélinisation corticale (Ahmed et al., 2022; Choi et al., 2012; Haider et al., 2016; Howell et al., 2011; Lucchinetti et al., 2011; Magliozzi et al., 2007; Magliozzi et al., 2010; Serafini et al., 2004). Ainsi, bloquer ALCAM en périphérie pourrait potentiellement réduire la quantité de lymphocytes B pathogéniques dans les infiltrats cellulaires et les structures de type lymphoïdes des méninges de patients, réduisant ainsi la propagation de l'inflammation dans le SNC.

Par-delà les lymphocytes B, ALCAM est impliquée dans la migration des monocytes et des lymphocytes T CD4⁺ vers le SNC où ils sont connus pour leur contribution à l'inflammation parenchymateuse en SEP (Bogie et al., 2014; Cayrol et al., 2008; Lyck et al., 2017; Prineas & Parratt, 2021). CD6, son ligand, est exprimé par une grande proportion des lymphocytes T CD4⁺, leur permettant d'interagir avec ALCAM à la surface des cellules endothéliales de la barrière héméo-encéphalique. Monocytes et lymphocytes T CD4⁺ sont d'ailleurs aussi deux types cellulaires retrouvés dans les infiltrats méningés caractéristiques de SEP et associés à la formation de lésions (Ahmed et al., 2022; Reali et al., 2020). Ainsi, une thérapie anti-ALCAM aurait le potentiel de bloquer l'accès au SNC des lymphocytes T CD4⁺ effecteurs et des monocytes en plus de celui des lymphocytes B pathogéniques et ce, sans affecter la portion de lymphocytes B régulateurs nécessaires à l'immunosurveillance du SNC. L'effet synergique du blocage d'ALCAM sur la migration de cette variété de types cellulaires pathogéniques pendant la maladie pourrait ralentir voire stopper la formation de lésions cérébrales à la fois corticales et de la substance blanche. Mais notre étude, bien qu'enrichissante laisse beaucoup de zones obscures sur la possibilité de cibler ALCAM sans effets secondaires. Comme précédemment mentionné, ALCAM peut incarner de nombreux rôles moléculaires dans l'organisme et est exprimée par une grande variété de types cellulaires parmi lesquels sont les cellules souches hématopoïétiques et mésenchymateuses. Son rôle dans des mécanismes fondamentaux comme l'hématopoïèse et l'angiogenèse en fait donc à ce jour une cible thérapeutique non envisageable pour la SEP.

Le rôle de DICAM dans la migration des lymphocytes T_H17

Le second manuscrit présenté dans cette thèse découle de travaux effectués dans le cadre de recherche sur les lymphocytes T_H17 et leur contribution en SEP. Les lymphocytes T_H17 sont influencés par un ensemble de paramètres microbiens, nutritifs, métaboliques et génétiques (Pawlak et al., 2020). Ce sont des cellules qui, dans un contexte perturbant leur homéostasie, sont capables d'adopter un phénotype pathogénique. Elles deviennent alors actrices clés de certaines maladies auto-immunes comme la SEP. C'est dans ce contexte que les T_H17 sont capables de franchir la barrière héméo-encéphalique et pénètrent le SNC (Heng et al., 2022; Ifergan et al., 2008;

Kebir et al., 2007). Elles sont alors une source locale de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-17(A) et l'IL-17F, de chimiokines et peuvent produire des molécules cytolytiques comme le granzyme B (Kebir et al., 2007). Un des grands objectifs de cette thèse est de caractériser de potentielles cibles thérapeutiques pour bloquer de façon spécifique les cellules pathogéniques hors du SNC tout en gardant une immunosurveillance cérébrale fonctionnelle. Nous avons donc cherché à comprendre si DICAM est une molécule d'adhérence qui serait une bonne candidate. Le second manuscrit présenté ici a permis d'identifier la molécule d'adhérence DICAM comme actrice dans la migration des T_H17 vers le SNC durant la SEP.

À l'étude en spectrométrie de masse des protéines que ces cellules expriment, nous avons d'abord identifié la molécule d'adhérence DICAM comme molécule potentiellement impliquée dans la migration cellulaire des lymphocytes T_H17. À la suite de cette découverte, l'objectif des travaux présentés ici était de caractériser le rôle de DICAM dans la migration des lymphocytes T_H17 vers le SNC pendant la SEP. En premier lieu, notre étude démontre que parmi les sous-catégories de lymphocytes T CD4⁺ effecteurs, DICAM semble être particulièrement associée au phénotype de cellules T_H17 *ex vivo* ou lorsqu'elles sont générées *in vitro* à partir de lymphocytes T CD4⁺ de contrôles sains. Explorant son expression chez les patients atteints de SEP, nous avons observé que la fréquence de lymphocytes T CD4⁺ mémoires exprimant DICAM est augmentée dans le sang périphérique des patients dans une phase active de leur maladie cyclique ou en progression. De plus, DICAM et son ligand $\alpha\text{v}\beta_3$ sont surexprimés par les cellules endothéliales humaines de la barrière hémato-encéphalique dans un contexte d'inflammation *in vitro* mais aussi *in situ* dans les lésions cérébrales de SEP. Ensuite, grâce à une combinaison d'expériences *in vitro* et *in vivo* chez la souris, nous avons pu démontrer que DICAM participe au roulement, à l'arrêt et à la migration des lymphocytes T_H17 à travers les cellules endothéliales de la barrière. Nous avons d'ailleurs identifié des lymphocytes T CD4⁺ et plus spécifiquement sécrétrices d'IL-17 co-exprimant DICAM dans les lésions cérébrales de SEP. Enfin, en administrant un anticorps monoclonal anti-DICAM à des souris, nous avons observé les effets bénéfiques de son blocage sur la sévérité de la maladie dans plusieurs modèles d'EAE modélisant différentes formes de SEP.

DICAM est préférentiellement exprimée par les lymphocytes T_H17

DICAM est connue pour être exprimée par de nombreuses lignées cellulaires de cellules endothéliales, de cellules épithéliales et de monocytes (Jung et al., 2008; Yonezawa et al., 2003). Nos travaux ont ici permis d'ajouter les cellules T_H17 comme cellules pouvant exprimer DICAM à leur membrane. Les sous-catégories de lymphocytes T CD4⁺ effecteurs sont connues pour avoir différentes implications dans la pathologie de la SEP (Heng et al., 2022; Moser et al., 2020; Stromnes et al., 2008). C'est pourquoi nous avons exploré le profil d'expression de DICAM sur ses différentes catégories de lymphocytes T effecteurs. Les résultats ont mis en évidence que l'expression de DICAM est associée à un profil T_H17 contrairement aux autres sous-types de lymphocytes T effecteurs que sont les T_H1, les T_H2 et les T_H17.1. Les lymphocytes T_H17 sont des acteurs clés de la pathologie de la SEP où elles sont soupçonnées d'atteindre le SNC et d'y activer les microglies, les macrophages et les astrocytes (Kebir et al., 2009; Kebir et al., 2007; van Langelaar et al., 2018). De façon intéressante, les T_H1 de patients SEP semblent avoir la capacité de réagir aux expositions virales comme celle au virus JC contrairement aux T_H17.1 qui sont plutôt réactifs aux peptides de la myéline (Paroni et al., 2017). Autrement dit, les T_H1 en SEP semblent jouer un rôle d'immunosurveillance alors que les T_H17.1, cellules étroitement liées aux T_H17, seraient plutôt pathogéniques. En lien avec ses observations, il a été montré que le traitement natalizumab (anti-VLA-4) bloque drastiquement l'entrée des cellules T_H1 dans le SNC des souris EAE (Rothhammer et al., 2011). Il est donc possible que l'absence de T_H1 au cerveau chez les personnes traitées soit l'une des raisons pour lesquelles l'immunosurveillance est compromise. Contrairement au natalizumab, un traitement anti-DICAM permettrait de bloquer plutôt la pénétration des T_H17 vers le SNC et ceci, sans obstruer la présence des T_H1 dans le tissu. Ainsi, une telle thérapie n'altérerait pas l'immunosurveillance menée par les T_H1 réduisant éventuellement le risque de LMP.

DICAM est surexprimée par les lymphocytes T CD4⁺ mémoires périphériques de patients atteints de SEP actives

En outre, les lymphocytes T_H17 sont des cellules réputées pour leur aspect pathogénique dans la physiopathologie des SEP cyclique et progressive (Brucklacher-Waldert et al., 2009; Durelli et al., 2009; Kalra et al., 2020; Kebir et al., 2007; Li et al., 2011; Matusevicius et al., 1999; Romme Christensen et al., 2013; Stromnes et al., 2008). Nombreux sont les arguments soutenant leur implication. De façon surprenante, les T_H17 circulants, contrairement aux T_H1 et aux T_H17.1, augmentent en nombre à la fois chez les personnes atteintes de SEP cyclique et progressives par rapport aux contrôles sains (Kalra et al., 2020; Moser et al., 2020). Ainsi, les cellules T_H17.1 considérées comme les plus pathogéniques pendant la SEP cyclique sont peut-être des acteurs de l'inflammation aigüe là où les T_H17 seraient plutôt impliqués dans la propagation des dommages sur des périodes plus étendues. Restreindre l'entrée des T_H17 en ciblant DICAM a le potentiel d'être une thérapie efficace à la fois pour les personnes atteintes de la forme cyclique, mais aussi des formes progressives.

Nous avons donc ensuite confirmé que l'expression de DICAM par les lymphocytes T CD4⁺ mémoires périphériques est associée à un contexte inflammatoire chez les personnes atteintes de SEP cyclique et progressive. En effet, la proportion de cellules T CD4⁺ exprimant DICAM dans les formes actives de SEP cyclique et progressive, est plus élevée que dans les formes inactives et les contrôles sains. Bien que nous n'ayons pas caractérisé dans un contexte de SEP, quel sous-type de lymphocytes T CD4⁺ effecteurs précisément exprime DICAM, nous faisons l'hypothèse que de la même manière que chez les contrôles sains, ce sont les T_H17 qui l'expriment. L'augmentation de la proportion de T_H17 dans le sang périphérique des personnes atteintes des formes cyclique et progressive (Kalra et al., 2020; Moser et al., 2020) est suspectée alors d'être à l'origine de l'augmentation de la proportion de DICAM observée. Cela dit, des expériences supplémentaires sont nécessaires pour caractériser en profondeur les types cellulaires qui expriment DICAM dans le sang périphérique des patients SEP. Cette caractérisation est indispensable pour déterminer l'ampleur d'un traitement visant DICAM et de potentiels effets secondaires.

DICAM et son ligand $\alpha_V\beta_3$ sont surexprimés par les cellules endothéliales de la barrière héméo-encéphalique dans un contexte inflammatoire

DICAM est initialement connue pour son interaction avec l'intégrine $\alpha_V\beta_3$ et de façon homotypique avec elle-même (Jung et al., 2008). Dans le cadre de nos travaux, nous avons montré que les lymphocytes T_H17 sont capables d'adhérer à DICAM et $\alpha_V\beta_3$. De façon intéressante, nos résultats indiquent que les lymphocytes T_H17 adhèrent mieux à $\alpha_V\beta_3$ que DICAM. Les travaux de Jung et al., avaient exposé l'interaction hétérotypique de DICAM avec $\alpha_V\beta_3$ comme la principale interaction intercellules de DICAM (Jung et al., 2008). En effet, leurs expériences n'ont pas permis d'identifier une interaction trans- (intercellules)-homotypique de DICAM alors que celle-ci est possible de façon cis (intracellule)-homotypique. Considérant ces observations, nos résultats indiquent que les lymphocytes T_H17 interagissent en plus grand nombre avec $\alpha_V\beta_3$ du fait de leur expression de la molécule DICAM. D'un autre côté, les cellules T_H17 , déjà connues pour leur expression de l'intégrine $\alpha_V\beta_3$ (Du et al., 2016), adhèreraient par interaction hétérotypique à DICAM. Cela dit, nos travaux ne permettent pas de conclure sur la nature de l'interaction entre DICAM et lui-même intercellules qui pourrait éventuellement médier l'adhérence des T_H17 .

Pour aller plus loin, nous avons décrit que DICAM et $\alpha_V\beta_3$ sont exprimés par les cellules endothéliales de la barrière héméo-encéphalique à la fois dans des conditions *in vitro* inflammatoires et *in situ* au niveau des vaisseaux de lésions de SEP. Ce sont des résultats qui complètent ceux observés dans une étude récente où DICAM est surexprimée dans un contexte d'inflammation induit *in vitro* via un traitement aux TNF- α et IFN- γ sur une lignée de cellules épithéliales (Han et al., 2019). Aussi, une nouvelle étude indique que par son expression au niveau des pieds astrocytaires, déjà décrite par le passé (Yonezawa et al., 2003), elle joue un rôle dans le maintien de la barrière héméo-encéphalique dans un modèle expérimental de névrite optique (Chun et al., 2021). Ainsi, les indices de l'implication de DICAM dans le maintien des barrières du SNC se multiplient bien qu'aucune étude, à ma connaissance, ne s'y soit encore intéressée dans un cadre neuroinflammatoire comme la SEP. Nos travaux, cantonnés au rôle de DICAM dans la migration des T_H17 à travers la barrière héméo-encéphalique, n'ont pas exploré cette avenue. Cela

dit, comprendre le rôle de DICAM dans le maintien de l'intégrité des barrières du SNC est d'un grand intérêt considérant que la perturbation de la barrière est un événement majeur de la physiopathologie de la SEP.

Dans un autre contexte inflammatoire, DICAM est présente au niveau d'une autre barrière physiologique qu'est la barrière muqueuse. En effet, Han et ses collègues ont montré que DICAM est présente au niveau des jonctions serrées des cellules épithéliales de cette barrière et qu'elle y est surexprimée dans un modèle de souris de colite expérimentale inflammatoire (Han et al., 2019). Leurs travaux sur des souris KO pour DICAM ont permis de caractériser le rôle de DICAM dans le maintien de cette barrière. Étant exprimée par les cellules épithéliales de nombreux tissus (Jung et al., 2008), il est raisonnable de soupçonner que DICAM est exprimée à la jonction serrée des cellules épithéliales des plexus choroïdes et qu'elle y joue un rôle de maintien de la barrière sang-LCR. Explorer cette possibilité serait très intéressant considérant que les plexus choroïdes sont une voie d'entrée majeure des lymphocytes au sein du SNC durant la SEP (Kooij & de Vries, 2015; Kooij et al., 2014; Reboldi et al., 2009; Vercellino et al., 2008).

DICAM participe à la migration des lymphocytes T_H17 à travers les cellules endothéliales de la barrière hémocéphalique

Le rôle de molécule d'adhérence de DICAM fut d'abord décrit par Jung et ses collègues (Jung et al., 2008) et fut confirmé dans une étude décrivant son rôle dans la migration des cellules endothéliales HUVEC (de l'anglais : *human umbilical vein endothelial cells*) dans le cadre de l'angiogenèse (Han et al., 2013). Dans cette lignée, nos travaux ont permis de montrer que DICAM participe à l'adhérence, l'arrêt et la migration des T_H17 sur et à travers les cellules endothéliales de la barrière hémocéphalique. Nos travaux récents, en préparation pour publication, ont montré que DICAM est une molécule aussi exprimée par une grande proportion de monocytes en périphérie (et d'autant plus chez les patients SEP aux formes progressives) et que la bloquer permettrait de réduire leur arrêt et leur migration *in vitro* sur et à travers des cellules endothéliales des barrières hémocéphalique et hémoméningée. C'est pourquoi, bloquer DICAM *in vivo* pourrait non seulement empêcher les T_H17 pathogéniques de pénétrer le SNC, mais

aussi les monocytes. Comme précédemment mentionné, les monocytes sont des cellules qui ont un rôle central dans l'inflammation du SNC en SEP (Prineas & Parratt, 2021) et sont aujourd'hui considérées comme une cible thérapeutique prometteuse pour la SEP (discuté dans Bogie et al., 2014).

Bloquer DICAM in vivo entraîne une réduction de la sévérité de l'EAE progressive et cyclique

Un anticorps monoclonal anti-DICAM (référé comme clone 9E9) a été développé dans le laboratoire. Cet anticorps monoclonal bloquant nous a permis dans ce manuscrit de tester le potentiel thérapeutique de cibler DICAM. Nos expériences indiquent que bloquer DICAM chez la souris est efficace pour réduire la sévérité de la maladie chez des animaux EAE présentant une forme progressive ou cyclique de la maladie. C'est dans ces circonstances, en traitant des animaux EAE avec un anticorps anti-VLA-4 que Yednock et ses collègues, il y a trente ans, découvraient pour la première fois le potentiel d'un tel anticorps pour réduire l'infiltration des leucocytes dans le SNC, en faisant par la suite, une thérapie prometteuse pour la SEP (Yednock et al., 1992).

Dans le cas de l'anticorps anti-DICAM, la réduction des symptômes en EAE est associée à une réduction de l'infiltration des lymphocytes T_H17 dans le SNC des animaux au pic de la maladie. Ces résultats indiquent que bloquer DICAM pourrait être une thérapie efficace par la réduction de l'infiltration cérébrale de lymphocytes pathogéniques T_H17 , et ce, à la fois pour la forme cyclique et les formes progressives de la maladie. En effet, nombre de publications soutiennent l'implication des cellules T_H17 dans chacune des formes de SEP (Brucklacher-Waldert et al., 2009; Buhler et al., 2017; Capone et al., 2019; Dos Passos et al., 2016; Durelli et al., 2009; Hedegaard et al., 2008; Kalra et al., 2020; Kebir et al., 2007; Moser et al., 2020). D'autant plus qu'on suspecte que l'efficacité du natalizumab et des anti-CD20 soit en partie due à leur effet sur le blocage en périphérie ou la déplétion de cellules T_H17 exprimant CD20 chez les personnes traitées (Buhler et al., 2017; Gingele et al., 2018).

Cependant, encore de nombreuses interrogations demeurent quant au mode d'action de l'anticorps monoclonal anti-DICAM. En premier lieu, nous n'avons pas exploré quel est l'effet de cet anticorps bloquant sur l'intégrité, non seulement de la barrière hémato-encéphalique, mais aussi des autres barrières, comme la barrière intestinale où DICAM joue un rôle (Chun et al., 2021; Han et al., 2019). D'après nos résultats, même si l'anticorps anti-DICAM venait à avoir perturbé l'intégrité de la barrière hémato-encéphalique *in vivo*, c'est un phénomène minime par rapport à l'effet bloquant la migration des T_H17 vers le SNC. La prochaine étape, déjà entamée dans le laboratoire, est d'explorer le potentiel de l'anticorps anti-DICAM pour bloquer le passage des autres cellules pathogéniques, comme les monocytes, à travers les barrières du SNC en neuroinflammation. Aussi, il serait d'un grand intérêt de comprendre comment le traitement anti-DICAM modifie *in vivo* les propriétés des barrières du SNC, la migration des leucocytes et la formation des lésions.

Cette publication est donc la première brique d'une recherche plus vaste sur l'implication de DICAM dans la physiopathologie de la SEP. Mais, ces résultats nous permettent d'entrevoir le potentiel d'une telle thérapie pour la SEP.

Chapitre 5 – Conclusion

La formation des lésions en SEP est le fruit d'une combinaison complexe de mécanismes. D'un côté, nous avons connaissance que les cellules résidentes du SNC, pour certaines cibles des attaques délétères, contribuent à la physiopathologie. Mais incontestablement, actrices au cœur de la SEP, ce sont les cellules immunitaires périphériques qui semblent être la cible thérapeutique la plus efficace à ce jour. Dans cette thèse, basée sur l'efficacité reconnue du natalizumab et des anti-CD20 pour traiter la SEP, nous avons caractérisé le potentiel de deux molécules d'adhérences à devenir d'éventuelles cibles thérapeutiques.

Dans un premier lieu, nous avons démontré qu'ALCAM contribue à la migration des lymphocytes B mémoires activées vers le SNC. Déjà connue pour son rôle dans le maintien de la barrière hémocéphalique en SEP et pour son rôle dans la migration des lymphocytes T CD4⁺ et des monocytes à travers celle-ci. Le premier manuscrit présenté dans cette thèse complète nos connaissances sur la fonction d'ALCAM comme molécule d'adhérence. Un traitement bloquant ALCAM saurait donc faire office de thérapie efficace pour bloquer les populations de lymphocytes B pathogéniques, de lymphocytes T et de monocytes en périphérie tout en laissant la portion de cellules immunitaires responsable de l'immunosurveillance pénétrer le cerveau. Cela dit, étant donné l'implication d'ALCAM dans de nombreux mécanismes physiologiques fondamentaux, injecter un anticorps bloquant ALCAM chez des individus n'est pas envisageable.

Le second manuscrit présenté dans cette thèse fait partie des premiers travaux s'intéressant au rôle de la molécule DICAM dans un contexte neuroinflammatoire. Nous avons pu démontrer que DICAM contribue à la migration des lymphocytes T_H17 vers le SNC et qu'elle est surexprimée par ces cellules en périphérie chez les personnes atteintes de SEP cyclique et progressive. Bien qu'étant encore peu caractérisée, la contribution de DICAM dans la migration des cellules pathogéniques indique qu'elle serait une cible thérapeutique envisageable pour bloquer les cellules pathogéniques hors du SNC tout en conservant l'immunosurveillance cérébrale indispensable pour éviter des effets secondaires.

En conclusion, cette thèse contribue à l'avancer des connaissances sur les mécanismes qui régissent la migration des cellules immunitaires à travers les barrières du SNC dans un contexte neuroinflammatoire. Bien que cantonnées au contexte de la SEP, nos recherches contribuent plus globalement aux connaissances sur ce phénomène hautement régulé qui se produit dans plusieurs contextes pathologiques.

Références bibliographiques

- Abbott, N. J., Patabendige, A. A., Dolman, D. E., Yusof, S. R., & Begley, D. J. (2010). Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiol Dis*, 37(1), 13-25. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2009.07.030>
- Acosta-Rodriguez, E. V., Napolitani, G., Lanzavecchia, A., & Sallusto, F. (2007). Interleukins 1beta and 6 but not transforming growth factor-beta are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells. *Nat Immunol*, 8(9), 942-949. <https://doi.org/10.1038/ni1496>
- Acosta-Rodriguez, E. V., Rivino, L., Geginat, J., Jarrossay, D., Gattorno, M., Lanzavecchia, A., Sallusto, F., & Napolitani, G. (2007). Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17-producing T helper memory cells. *Nat Immunol*, 8(6), 639-646. <https://doi.org/10.1038/ni1467>
- Aggarwal, S., Ghilardi, N., Xie, M. H., de Sauvage, F. J., & Gurney, A. L. (2003). Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17. *J Biol Chem*, 278(3), 1910-1914. <https://doi.org/10.1074/jbc.M207577200>
- Ahmed, S. M., Fransen, N. L., Touil, H., Michailidou, I., Huitinga, I., Gommerman, J. L., Bar-Or, A., & Ramaglia, V. (2022). Accumulation of meningeal lymphocytes correlates with white matter lesion activity in progressive MS. *JCI Insight*. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.151683>
- Alon, R., & Shulman, Z. (2011). Chemokine triggered integrin activation and actin remodeling events guiding lymphocyte migration across vascular barriers. *Exp Cell Res*, 317(5), 632-641. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2010.12.007>
- 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., & Bar-Or, A. (2003). Determinants of human B cell migration across brain endothelial cells. *J Immunol*, 170(9), 4497-4505. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.170.9.4497>
- Alvarez-Sanchez, N., Cruz-Chamorro, I., Alvarez-Lopez, A. I., Lopez-Gonzalez, A., Lacalle Remigio, J. R., Lardone, P. J., Guerrero, J. M., Martinez-Lopez, A., & Carrillo-Vico, A. (2020). Seasonal

- Variations in Macrophages/Microglia Underlie Changes in the Mouse Model of Multiple Sclerosis Severity. *Mol Neurobiol*, 57(10), 4082-4089. <https://doi.org/10.1007/s12035-020-02017-x>
- Ando, D. G., Clayton, J., Kono, D., Urban, J. L., & Sercarz, E. E. (1989). Encephalitogenic T cells in the B10.PL model of experimental allergic encephalomyelitis (EAE) are of the Th-1 lymphokine subtype. *Cell Immunol*, 124(1), 132-143. [https://doi.org/10.1016/0008-8749\(89\)90117-2](https://doi.org/10.1016/0008-8749(89)90117-2)
- Arai, F., Ohneda, O., Miyamoto, T., Zhang, X. Q., & Suda, T. (2002). Mesenchymal stem cells in perichondrium express activated leukocyte cell adhesion molecule and participate in bone marrow formation. *J Exp Med*, 195(12), 1549-1563. <https://doi.org/10.1084/jem.20011700>
- Babbe, H., Roers, A., Waisman, A., Lassmann, H., Goebels, N., Hohlfeld, R., Friese, M., Schroder, R., Deckert, M., Schmidt, S., Ravid, R., & Rajewsky, K. (2000). Clonal expansions of CD8(+) T cells dominate the T cell infiltrate in active multiple sclerosis lesions as shown by micromanipulation and single cell polymerase chain reaction. *J Exp Med*, 192(3), 393-404. <https://doi.org/10.1084/jem.192.3.393>
- Baig, A. M., Khaleeq, A., Ali, U., & Syeda, H. (2020). Evidence of the COVID-19 Virus Targeting the CNS: Tissue Distribution, Host-Virus Interaction, and Proposed Neurotropic Mechanisms. *ACS Chem Neurosci*, 11(7), 995-998. <https://doi.org/10.1021/acchemneuro.0c00122>
- Bar-Or, A., Fawaz, L., Fan, B., Darlington, P. J., Rieger, A., Ghorayeb, C., Calabresi, P. A., Waubant, E., Hauser, S. L., Zhang, J., & Smith, C. H. (2010). Abnormal B-cell cytokine responses a trigger of T-cell-mediated disease in MS? *Ann Neurol*, 67(4), 452-461. <https://doi.org/10.1002/ana.21939>
- Baranzini, S. E., Jeong, M. C., Butunoi, C., Murray, R. S., Bernard, C. C., & Oksenberg, J. R. (1999). B cell repertoire diversity and clonal expansion in multiple sclerosis brain lesions. *J Immunol*, 163(9), 5133-5144. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10528220>
- Baranzini, S. E., & Oksenberg, J. R. (2017). The Genetics of Multiple Sclerosis: From 0 to 200 in 50 Years. *Trends Genet*, 33(12), 960-970. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2017.09.004>

- 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., Fillatreau, S., & Gray, D. (2012). B cell depletion therapy ameliorates autoimmune disease through ablation of IL-6-producing B cells. *J Exp Med*, *209*(5), 1001-1010. <https://doi.org/10.1084/jem.20111675>
- Bartholomaeus, I., Kawakami, N., Odoardi, F., Schlager, C., Miljkovic, D., Ellwart, J. W., Klinkert, W. E., Flugel-Koch, C., Issekutz, T. B., Wekerle, H., & Flugel, A. (2009). Effector T cell interactions with meningeal vascular structures in nascent autoimmune CNS lesions. *Nature*, *462*(7269), 94-98. <https://doi.org/10.1038/nature08478>
- Battistini, L., Piccio, L., Rossi, B., Bach, S., Galgani, S., Gasperini, C., Ottoboni, L., Ciabini, D., Caramia, M. D., Bernardi, G., Laudanna, C., Scarpini, E., McEver, R. P., Butcher, E. C., Borsellino, G., & Constantin, G. (2003). 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*(12), 4775-4782. <https://doi.org/10.1182/blood-2002-10-3309>
- Becher, B., Tugues, S., & Greter, M. (2016). GM-CSF: From Growth Factor to Central Mediator of Tissue Inflammation. *Immunity*, *45*(5), 963-973. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.10.026>
- Bell, R. D., Winkler, E. A., Sagare, A. P., Singh, I., LaRue, B., Deane, R., & Zlokovic, B. V. (2010). Pericytes control key neurovascular functions and neuronal phenotype in the adult brain and during brain aging. *Neuron*, *68*(3), 409-427. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.09.043>
- Beltran, E., Gerdes, L. A., Hansen, J., Flierl-Hecht, A., Krebs, S., Blum, H., Ertl-Wagner, B., Barkhof, F., Kumpfel, T., Hohlfeld, R., & Dornmair, K. (2019). Early adaptive immune activation detected in monozygotic twins with prodromal multiple sclerosis. *J Clin Invest*, *129*(11), 4758-4768. <https://doi.org/10.1172/JCI128475>
- Ben-Nun, A., Mendel, I., Bakimer, R., Fridkis-Hareli, M., Teitelbaum, D., Arnon, R., Sela, M., & Kerlero de Rosbo, N. (1996). The autoimmune reactivity to myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG) in multiple sclerosis is potentially pathogenic: effect of copolymer 1

- on MOG-induced disease. *J Neurol*, 243(4 Suppl 1), S14-22.
<https://doi.org/10.1007/BF00873697>
- Ben-Nun, A., Wekerle, H., & Cohen, I. R. (1981). The rapid isolation of clonable antigen-specific T lymphocyte lines capable of mediating autoimmune encephalomyelitis. *Eur J Immunol*, 11(3), 195-199. <https://doi.org/10.1002/eji.1830110307>
- Ben-Zvi, A., Lacoste, B., Kur, E., Andreone, B. J., Mayshar, Y., Yan, H., & Gu, C. (2014). Mfsd2a is critical for the formation and function of the blood-brain barrier. *Nature*, 509(7501), 507-511. <https://doi.org/10.1038/nature13324>
- Berger, J. R., Cree, B. A., Greenberg, B., Hemmer, B., Ward, B. J., Dong, V. M., & Merschhemke, M. (2018). Progressive multifocal leukoencephalopathy after fingolimod treatment. *Neurology*, 90(20), e1815-e1821. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000005529>
- Berger, J. R., & Koralnik, I. J. (2005). Progressive multifocal leukoencephalopathy and natalizumab--unforeseen consequences. *N Engl J Med*, 353(4), 414-416. <https://doi.org/10.1056/NEJMe058122>
- Berlin, C., Berg, E. L., Briskin, M. J., Andrew, D. P., Kilshaw, P. J., Holzmann, B., Weissman, I. L., Hamann, A., & Butcher, E. C. (1993). Alpha 4 beta 7 integrin mediates lymphocyte binding to the mucosal vascular addressin MAdCAM-1. *Cell*, 74(1), 185-195. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90305-a](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90305-a)
- Bettelli, E., Baeten, D., Jager, A., Sobel, R. A., & 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(9), 2393-2402. <https://doi.org/10.1172/JCI28334>
- Bettelli, E., Das, M. P., Howard, E. D., Weiner, H. L., Sobel, R. A., & Kuchroo, V. K. (1998). IL-10 is critical in the regulation of autoimmune encephalomyelitis as demonstrated by studies of IL-10- and IL-4-deficient and transgenic mice. *J Immunol*, 161(7), 3299-3306. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9759845>
- Biddison, W. E., Cruikshank, W. W., Center, D. M., Pelfrey, C. M., Taub, D. D., & Turner, R. V. (1998). CD8+ myelin peptide-specific T cells can chemoattract CD4+ myelin peptide-specific T cells: importance of IFN-inducible protein 10. *J Immunol*, 160(1), 444-448. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9552002>

- Bjornevik, K., Cortese, M., Healy, B. C., Kuhle, J., Mina, M. J., Leng, Y., Elledge, S. J., Niebuhr, D. W., Scher, A. I., Munger, K. L., & Ascherio, A. (2022). Longitudinal analysis reveals high prevalence of Epstein-Barr virus associated with multiple sclerosis. *Science*, 375(6578), 296-301. <https://doi.org/10.1126/science.abj8222>
- Bloomgren, G., Richman, S., Hotermans, C., Subramanyam, M., Goelz, S., Natarajan, A., Lee, S., Plavina, T., Scanlon, J. V., Sandrock, A., & Bozic, C. (2012). Risk of natalizumab-associated progressive multifocal leukoencephalopathy. *N Engl J Med*, 366(20), 1870-1880. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1107829>
- Bogie, J. F., Stinissen, P., & Hendriks, J. J. (2014). Macrophage subsets and microglia in multiple sclerosis. *Acta Neuropathol*, 128(2), 191-213. <https://doi.org/10.1007/s00401-014-1310-2>
- Bohler, T., Waiser, J., Schuetz, M., Neumayer, H. H., & Budde, K. (2004). FTY720 exerts differential effects on CD4+ and CD8+ T-lymphocyte subpopulations expressing chemokine and adhesion receptors. *Nephrol Dial Transplant*, 19(3), 702-713. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfg599>
- Bowen, M. A., Patel, D. D., Li, X., Modrell, B., Malacko, A. R., Wang, W. C., Marquardt, H., Neubauer, M., Pesando, J. M., Francke, U., & et al. (1995). Cloning, mapping, and characterization of activated leukocyte-cell adhesion molecule (ALCAM), a CD6 ligand. *J Exp Med*, 181(6), 2213-2220. <https://doi.org/10.1084/jem.181.6.2213>
- Brain, W. R. (1935). Disseminated Sclerosis. *Br Med J*, 2(3907), 1006. <https://doi.org/10.1136/bmj.2.3907.1006>
- Breuer, J., Korpos, E., Hannocks, M. J., Schneider-Hohendorf, T., Song, J., Zondler, L., Herich, S., Flanagan, K., Korn, T., Zarbock, A., Kuhlmann, T., Sorokin, L., Wiendl, H., & Schwab, N. (2018). Blockade of MCAM/CD146 impedes CNS infiltration of T cells over the choroid plexus. *J Neuroinflammation*, 15(1), 236. <https://doi.org/10.1186/s12974-018-1276-4>
- Brightman, M. W., & Reese, T. S. (1969). Junctions between intimately apposed cell membranes in the vertebrate brain. *J Cell Biol*, 40(3), 648-677. <https://doi.org/10.1083/jcb.40.3.648>

- Brooks, P. C., Clark, R. A., & Cheresh, D. A. (1994). Requirement of vascular integrin alpha v beta 3 for angiogenesis. *Science*, 264(5158), 569-571. <https://doi.org/10.1126/science.7512751>
- Brucklacher-Waldert, V., Stuermer, K., Kolster, M., Wolthausen, J., & Tolosa, E. (2009). Phenotypical and functional characterization of T helper 17 cells in multiple sclerosis. *Brain*, 132(Pt 12), 3329-3341. <https://doi.org/10.1093/brain/awp289>
- Brynedal, B., Duvefelt, K., Jonasdottir, G., Roos, I. M., Akesson, E., Palmgren, J., & Hillert, J. (2007). HLA-A confers an HLA-DRB1 independent influence on the risk of multiple sclerosis. *PLoS One*, 2(7), e664. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000664>
- Buhler, U., Fleischer, V., Luessi, F., Rezk, A., Belikan, P., Graetz, C., Gollan, R., Wolf, C., Lutz, J., Bar-Or, A., Siffrin, V., & Zipp, F. (2017). Role of IL-17-producing lymphocytes in severity of multiple sclerosis upon natalizumab treatment. *Mult Scler*, 23(4), 567-576. <https://doi.org/10.1177/1352458516658559>
- Bullard, D. C., Hu, X., Schoeb, T. R., Collins, R. G., Beaudet, A. L., & Barnum, S. R. (2007). Intercellular adhesion molecule-1 expression is required on multiple cell types for the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol*, 178(2), 851-857. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.2.851>
- Capone, A., Bianco, M., Ruocco, G., De Bardi, M., Battistini, L., Ruggieri, S., Gasperini, C., Centonze, D., Sette, C., & Volpe, E. (2019). Distinct Expression of Inflammatory Features in T Helper 17 Cells from Multiple Sclerosis Patients. *Cells*, 8(6). <https://doi.org/10.3390/cells8060533>
- Carbone, F., De Rosa, V., Carrieri, P. B., Montella, S., Bruzzese, D., Porcellini, A., Procaccini, C., La Cava, A., & Matarese, G. (2014). Regulatory T cell proliferative potential is impaired in human autoimmune disease. *Nat Med*, 20(1), 69-74. <https://doi.org/10.1038/nm.3411>
- Carman, C. V., & Springer, T. A. (2004). A transmigratory cup in leukocyte diapedesis both through individual vascular endothelial cells and between them. *J Cell Biol*, 167(2), 377-388. <https://doi.org/10.1083/jcb.200404129>
- Carvalho-Tavares, J., Hickey, M. J., Hutchison, J., Michaud, J., Sutcliffe, I. T., & Kubes, P. (2000). A role for platelets and endothelial selectins in tumor necrosis factor-alpha-induced

- leukocyte recruitment in the brain microvasculature. *Circ Res*, 87(12), 1141-1148.
<https://doi.org/10.1161/01.res.87.12.1141>
- Castro Dias, M., Mapunda, J. A., Vladymyrov, M., & Engelhardt, B. (2019). Structure and Junctional Complexes of Endothelial, Epithelial and Glial Brain Barriers. *Int J Mol Sci*, 20(21).
<https://doi.org/10.3390/ijms20215372>
- Cayrol, R., Wosik, K., Berard, J. L., Dodelet-Devillers, A., Ifergan, I., Kebir, H., Haqqani, A. S., Kreyborg, K., Krug, S., Moumdjian, R., Bouthillier, A., Becher, B., Arbour, N., David, S., Stanimirovic, D., & Prat, A. (2008). Activated leukocyte cell adhesion molecule promotes leukocyte trafficking into the central nervous system. *Nat Immunol*, 9(2), 137-145.
<https://doi.org/10.1038/ni1551>
- Cencioni, M. T., Mattoscio, M., Magliozzi, R., Bar-Or, A., & Muraro, P. A. (2021). B cells in multiple sclerosis - from targeted depletion to immune reconstitution therapies. *Nat Rev Neurol*, 17(7), 399-414. <https://doi.org/10.1038/s41582-021-00498-5>
- Chavez-Galan, L., Arenas-Del Angel, M. C., Zenteno, E., Chavez, R., & Lascurain, R. (2009). Cell death mechanisms induced by cytotoxic lymphocytes. *Cell Mol Immunol*, 6(1), 15-25.
<https://doi.org/10.1038/cmi.2009.3>
- Chedotal, A., Pourquie, O., & Sotelo, C. (1995). Initial tract formation in the brain of the chick embryo: selective expression of the BEN/SC1/DM-GRASP cell adhesion molecule. *Eur J Neurosci*, 7(2), 198-212. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.1995.tb01056.x>
- Choi, S. R., Howell, O. W., Carassiti, D., Magliozzi, R., Gveric, D., Muraro, P. A., Nicholas, R., Roncaroli, F., & Reynolds, R. (2012). Meningeal inflammation plays a role in the pathology of primary progressive multiple sclerosis. *Brain*, 135(Pt 10), 2925-2937.
<https://doi.org/10.1093/brain/aws189>
- Chun, B. Y., Kim, J. H., Jung, Y. K., Choi, Y. S., Kim, G., Yonezawa, T., & Suk, K. (2021). Protective Role of Limitrin in Experimental Autoimmune Optic Neuritis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 62(9), 8. <https://doi.org/10.1167/iovs.62.9.8>
- Church, M. E., Ceja, G., McGeehan, M., Miller, M. C., Farias, P., Sanchez, M. D., Swain, G. P., Assenmacher, C. A., Stopa, E. G., Vite, C. H., Bar-Or, A., & Alvarez, J. I. (2021). Meningeal B

- Cell Clusters Correlate with Submeningeal Pathology in a Natural Model of Multiple Sclerosis. *J Immunol*, 207(1), 44-54. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.2000514>
- Claes, N., Fraussen, J., Stinissen, P., Hupperts, R., & Somers, V. (2015). B Cells Are Multifunctional Players in Multiple Sclerosis Pathogenesis: Insights from Therapeutic Interventions. *Front Immunol*, 6, 642. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00642>
- Codarri, L., Gyulveszi, G., Tosevski, V., Hesske, L., Fontana, A., Magnenat, L., Suter, T., & Becher, B. (2011). RORgammat drives production of the cytokine GM-CSF in helper T cells, which is essential for the effector phase of autoimmune neuroinflammation. *Nat Immunol*, 12(6), 560-567. <https://doi.org/10.1038/ni.2027>
- Cohen, J. A., Barkhof, F., Comi, G., Hartung, H. P., Khatri, B. O., Montalban, X., Pelletier, J., Capra, R., Gallo, P., Izquierdo, G., Tiel-Wilck, K., de Vera, A., Jin, J., Stites, T., Wu, S., Aradhye, S., Kappos, L., & Group, T. S. (2010). Oral fingolimod or intramuscular interferon for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med*, 362(5), 402-415. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0907839>
- Cohen, J. A., & Chun, J. (2011). Mechanisms of fingolimod's efficacy and adverse effects in multiple sclerosis. *Ann Neurol*, 69(5), 759-777. <https://doi.org/10.1002/ana.22426>
- Cohen, J. A., Coles, A. J., Arnold, D. L., Confavreux, C., Fox, E. J., Hartung, H. P., Havrdova, E., Selmaj, K. W., Weiner, H. L., Fisher, E., Brinar, V. V., Giovannoni, G., Stojanovic, M., Ertik, B. I., Lake, S. L., Margolin, D. H., Panzara, M. A., Compston, D. A., & investigators, C.-M. I. (2012). Alemtuzumab versus interferon beta 1a as first-line treatment for patients with relapsing-remitting multiple sclerosis: a randomised controlled phase 3 trial. *Lancet*, 380(9856), 1819-1828. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)61769-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)61769-3)
- Coles, A. J., Twyman, C. L., Arnold, D. L., Cohen, J. A., Confavreux, C., Fox, E. J., Hartung, H. P., Havrdova, E., Selmaj, K. W., Weiner, H. L., Miller, T., Fisher, E., Sandbrink, R., Lake, S. L., Margolin, D. H., Oyuela, P., Panzara, M. A., Compston, D. A., & investigators, C.-M. I. (2012). Alemtuzumab for patients with relapsing multiple sclerosis after disease-modifying therapy: a randomised controlled phase 3 trial. *Lancet*, 380(9856), 1829-1839. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)61768-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)61768-1)

- Colombo, M., Dono, M., Gazzola, P., Roncella, S., Valetto, A., Chiorazzi, N., Mancardi, G. L., & Ferrarini, M. (2000). Accumulation of clonally related B lymphocytes in the cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients. *J Immunol*, *164*(5), 2782-2789. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.164.5.2782>
- Compston, A. (1983). Lymphocyte subpopulations in patients with multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, *46*(2), 105-114. <https://doi.org/10.1136/jnnp.46.2.105>
- Confavreux, C., Vukusic, S., & Adeleine, P. (2003). Early clinical predictors and progression of irreversible disability in multiple sclerosis: an amnesic process. *Brain*, *126*(Pt 4), 770-782. <https://doi.org/10.1093/brain/awg081>
- Constantinescu, C. S., Farooqi, N., O'Brien, K., & Gran, B. (2011). Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) as a model for multiple sclerosis (MS). *Br J Pharmacol*, *164*(4), 1079-1106. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01302.x>
- Coomer, B. L., & Stewart, P. A. (1985). Morphometric analysis of CNS microvascular endothelium. *Microvasc Res*, *30*(1), 99-115. [https://doi.org/10.1016/0026-2862\(85\)90042-1](https://doi.org/10.1016/0026-2862(85)90042-1)
- Corcione, A., Casazza, S., Ferretti, E., Giunti, D., Zappia, E., Pistorio, A., Gambini, C., Mancardi, G. L., Uccelli, A., & 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*(30), 11064-11069. <https://doi.org/10.1073/pnas.0402455101>
- Correale, J., Gilmore, W., McMillan, M., Li, S., McCarthy, K., Le, T., & Weiner, L. P. (1995). Patterns of cytokine secretion by autoreactive proteolipid protein-specific T cell clones during the course of multiple sclerosis. *J Immunol*, *154*(6), 2959-2968. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7533188>
- Cross, A. H., Stark, J. L., Lauber, J., Ramsbottom, M. J., & Lyons, J. A. (2006). Rituximab reduces B cells and T cells in cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients. *J Neuroimmunol*, *180*(1-2), 63-70. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2006.06.029>
- Daneman, R. (2012). The blood-brain barrier in health and disease. *Ann Neurol*, *72*(5), 648-672. <https://doi.org/10.1002/ana.23648>

- Daneman, R., & Engelhardt, B. (2017). Brain barriers in health and disease. *Neurobiol Dis*, 107, 1-3. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2017.05.008>
- Daneman, R., & Prat, A. (2015). The blood-brain barrier. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 7(1), a020412. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a020412>
- Darvishi, B., Boroumandieh, S., Majidzadeh, A. K., Salehi, M., Jafari, F., & Farahmand, L. (2020). The role of activated leukocyte cell adhesion molecule (ALCAM) in cancer progression, invasion, metastasis and recurrence: A novel cancer stem cell marker and tumor-specific prognostic marker. *Exp Mol Pathol*, 115, 104443. <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2020.104443>
- De Jager, P. L., Jia, X., Wang, J., de Bakker, P. I., Ottoboni, L., Aggarwal, N. T., Piccio, L., Raychaudhuri, S., Tran, D., Aubin, C., Briskin, R., Romano, S., International, M. S. G. C., Baranzini, S. E., McCauley, J. L., Pericak-Vance, M. A., Haines, J. L., Gibson, R. A., Naeglin, Y., Uitdehaag, B., Matthews, P. M., Kappos, L., Polman, C., McArdle, W. L., Strachan, D. P., Evans, D., Cross, A. H., Daly, M. J., Compston, A., Sawcer, S. J., Weiner, H. L., Hauser, S. L., Hafler, D. A., & Oksenberg, J. R. (2009). Meta-analysis of genome scans and replication identify CD6, IRF8 and TNFRSF1A as new multiple sclerosis susceptibility loci. *Nat Genet*, 41(7), 776-782. <https://doi.org/10.1038/ng.401>
- de Oliveira, J., Kucharska, E., Garcez, M. L., Rodrigues, M. S., Quevedo, J., Moreno-Gonzalez, I., & Budni, J. (2021). Inflammatory Cascade in Alzheimer's Disease Pathogenesis: A Review of Experimental Findings. *Cells*, 10(10). <https://doi.org/10.3390/cells10102581>
- Dehmel, T., Dobert, M., Pankratz, S., Leussink, V. I., Hartung, H. P., Wiendl, H., & Kieseier, B. C. (2014). Monomethylfumarate reduces in vitro migration of mononuclear cells. *Neurol Sci*, 35(7), 1121-1125. <https://doi.org/10.1007/s10072-014-1663-2>
- Dendrou, C. A., Fugger, L., & Friese, M. A. (2015). Immunopathology of multiple sclerosis. *Nat Rev Immunol*, 15(9), 545-558. <https://doi.org/10.1038/nri3871>
- Dhaeze, T., Lachance, C., Tremblay, L., Grasmuck, C., Bourbonniere, L., Larouche, S., Saint-Laurent, O., Lecuyer, M. A., Rebillard, R. M., Zandee, S., & Prat, A. (2019). Sex-dependent factors encoded in the immune compartment dictate relapsing or progressive phenotype in demyelinating disease. *JCI Insight*, 4(6). <https://doi.org/10.1172/jci.insight.124885>

- DiSano, K. D., Gilli, F., & Pachner, A. R. (2021). Memory B Cells in Multiple Sclerosis: Emerging Players in Disease Pathogenesis. *Front Immunol*, 12, 676686. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.676686>
- Dodelet-Devillers, A., Cayrol, R., van Horssen, J., Haqqani, A. S., de Vries, H. E., Engelhardt, B., Greenwood, J., & Prat, A. (2009). Functions of lipid raft membrane microdomains at the blood-brain barrier. *J Mol Med (Berl)*, 87(8), 765-774. <https://doi.org/10.1007/s00109-009-0488-6>
- Dos Passos, G. R., Sato, D. K., Becker, J., & Fujihara, K. (2016). Th17 Cells Pathways in Multiple Sclerosis and Neuromyelitis Optica Spectrum Disorders: Pathophysiological and Therapeutic Implications. *Mediators Inflamm*, 2016, 5314541. <https://doi.org/10.1155/2016/5314541>
- Du, F., Garg, A. V., Kosar, K., Majumder, S., Kugler, D. G., Mir, G. H., Maggio, M., Henkel, M., Lacy-Hulbert, A., & McGeachy, M. J. (2016). Inflammatory Th17 Cells Express Integrin alphavbeta3 for Pathogenic Function. *Cell Rep*, 16(5), 1339-1351. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.06.065>
- Duddy, M., Niino, M., Adatia, F., Hebert, S., Freedman, M., Atkins, H., Kim, H. J., & Bar-Or, A. (2007). Distinct effector cytokine profiles of memory and naive human B cell subsets and implication in multiple sclerosis. *J Immunol*, 178(10), 6092-6099. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.10.6092>
- Durelli, L., Conti, L., Clerico, M., Boselli, D., Contessa, G., Ripellino, P., Ferrero, B., Eid, P., & Novelli, F. (2009). T-helper 17 cells expand in multiple sclerosis and are inhibited by interferon-beta. *Ann Neurol*, 65(5), 499-509. <https://doi.org/10.1002/ana.21652>
- Eggers, E. L., Michel, B. A., Wu, H., Wang, S. Z., Bevan, C. J., Abounasr, A., Pierson, N. S., Bischof, A., Kazer, M., Leitner, E., Greenfield, A. L., Demuth, S., Wilson, M. R., Henry, R. G., Cree, B. A., Hauser, S. L., & von Budingen, H. C. (2017). Clonal relationships of CSF B cells in treatment-naive multiple sclerosis patients. *JCI Insight*, 2(22). <https://doi.org/10.1172/jci.insight.92724>
- El-Behi, M., Ciric, B., Dai, H., Yan, Y., Cullimore, M., Safavi, F., Zhang, G. X., Dittel, B. N., & Rostami, A. (2011). The encephalitogenicity of T(H)17 cells is dependent on IL-1- and IL-23-induced

- production of the cytokine GM-CSF. *Nat Immunol*, 12(6), 568-575. <https://doi.org/10.1038/ni.2031>
- Engelhardt, B., & Ransohoff, R. M. (2005). The ins and outs of T-lymphocyte trafficking to the CNS: anatomical sites and molecular mechanisms. *Trends Immunol*, 26(9), 485-495. <https://doi.org/10.1016/j.it.2005.07.004>
- Engelhardt, B., & Ransohoff, R. M. (2012). Capture, crawl, cross: the T cell code to breach the blood-brain barriers. *Trends Immunol*, 33(12), 579-589. <https://doi.org/10.1016/j.it.2012.07.004>
- Engelhardt, B., Vajkoczy, P., & Weller, R. O. (2017). The movers and shapers in immune privilege of the CNS. *Nat Immunol*, 18(2), 123-131. <https://doi.org/10.1038/ni.3666>
- Farooqi, N., Gran, B., & Constantinescu, C. S. (2010). Are current disease-modifying therapeutics in multiple sclerosis justified on the basis of studies in experimental autoimmune encephalomyelitis? *J Neurochem*, 115(4), 829-844. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2010.06982.x>
- Ferragut, F., Vachetta, V. S., Troncoso, M. F., Rabinovich, G. A., & Elola, M. T. (2021). ALCAM/CD166: A pleiotropic mediator of cell adhesion, stemness and cancer progression. *Cytokine Growth Factor Rev*, 61, 27-37. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2021.07.001>
- Filippi, M., Bar-Or, A., Piehl, F., Preziosa, P., Solari, A., Vukusic, S., & Rocca, M. A. (2018). Multiple sclerosis. *Nat Rev Dis Primers*, 4(1), 43. <https://doi.org/10.1038/s41572-018-0041-4>
- Fillatreau, S., Sweeney, C. H., McGeachy, M. J., Gray, D., & Anderton, S. M. (2002). B cells regulate autoimmunity by provision of IL-10. *Nat Immunol*, 3(10), 944-950. <https://doi.org/10.1038/ni833>
- Flanagan, K., Fitzgerald, K., Baker, J., Regnstrom, K., Gardai, S., Bard, F., Mocci, S., Seto, P., You, M., Larochelle, C., Prat, A., Chow, S., Li, L., Vandevent, C., Zago, W., Lorenzana, C., Nishioka, C., Hoffman, J., Botelho, R., Willits, C., Tanaka, K., Johnston, J., & Yednock, T. (2012). Laminin-411 is a vascular ligand for MCAM and facilitates TH17 cell entry into the CNS. *PLoS One*, 7(7), e40443. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040443>

- Fontenot, J. D., Gavin, M. A., & Rudensky, A. Y. (2003). Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol*, 4(4), 330-336. <https://doi.org/10.1038/ni904>
- Fournier, A. P., Baudron, E., Wagnon, I., Aubert, P., Vivien, D., Neunlist, M., Bardou, I., & Docagne, F. (2020). Environmental enrichment alleviates the deleterious effects of stress in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Mult Scler J Exp Transl Clin*, 6(4), 2055217320959806. <https://doi.org/10.1177/2055217320959806>
- Fox, R. J., Miller, D. H., Phillips, J. T., Hutchinson, M., Havrdova, E., Kita, M., Yang, M., Raghupathi, K., Novas, M., Sweetser, M. T., Vigiuetta, V., Dawson, K. T., & Investigators, C. S. (2012). Placebo-controlled phase 3 study of oral BG-12 or glatiramer in multiple sclerosis. *N Engl J Med*, 367(12), 1087-1097. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1206328>
- Fransen, N. L., Hsiao, C. C., van der Poel, M., Engelenburg, H. J., Verdaasdonk, K., Vincenten, M. C. J., Remmerswaal, E. B. M., Kuhlmann, T., Mason, M. R. J., Hamann, J., Smolders, J., & Huitinga, I. (2020). Tissue-resident memory T cells invade the brain parenchyma in multiple sclerosis white matter lesions. *Brain*, 143(6), 1714-1730. <https://doi.org/10.1093/brain/awaa117>
- Fraussen, J., Claes, N., Van Wijmeersch, B., van Horsen, J., Stinissen, P., Hupperts, R., & Somers, V. (2016). B cells of multiple sclerosis patients induce autoreactive proinflammatory T cell responses. *Clin Immunol*, 173, 124-132. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2016.10.001>
- Frischer, J. M., Bramow, S., Dal-Bianco, A., Lucchinetti, C. F., Rauschka, H., Schmidbauer, M., Laursen, H., Sorensen, P. S., & Lassmann, H. (2009). The relation between inflammation and neurodegeneration in multiple sclerosis brains. *Brain*, 132(Pt 5), 1175-1189. <https://doi.org/10.1093/brain/awp070>
- Fritzsche, B., Haas, J., Konig, F., Kunz, P., Fritzsche, E., Poschl, J., Krammer, P. H., Bruck, W., Suri-Payer, E., & Wildemann, B. (2011). Intracerebral human regulatory T cells: analysis of CD4+ CD25+ FOXP3+ T cells in brain lesions and cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients. *PLoS One*, 6(3), e17988. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017988>
- Gay, F. W., Drye, T. J., Dick, G. W., & Esiri, M. M. (1997). The application of multifactorial cluster analysis in the staging of plaques in early multiple sclerosis. Identification and

- characterization of the primary demyelinating lesion. *Brain*, 120 (Pt 8), 1461-1483. <https://doi.org/10.1093/brain/120.8.1461>
- Gerevini, S., Capra, R., Bertoli, D., Sottini, A., & Imberti, L. (2019). Immune profiling of a patient with alemtuzumab-associated progressive multifocal leukoencephalopathy. *Mult Scler*, 25(8), 1196-1201. <https://doi.org/10.1177/1352458519832259>
- Gerrard, B., Singh, V., Babenko, O., Gauthier, I., Wee Yong, V., Kovalchuk, I., Luczak, A., & Metz, G. A. S. (2017). Chronic mild stress exacerbates severity of experimental autoimmune encephalomyelitis in association with altered non-coding RNA and metabolic biomarkers. *Neuroscience*, 359, 299-307. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2017.07.033>
- Gilsanz, A., Sanchez-Martin, L., Gutierrez-Lopez, M. D., Ovalle, S., Machado-Pineda, Y., Reyes, R., Swart, G. W., Figdor, C. G., Lafuente, E. M., & Cabanas, C. (2013). ALCAM/CD166 adhesive function is regulated by the tetraspanin CD9. *Cell Mol Life Sci*, 70(3), 475-493. <https://doi.org/10.1007/s00018-012-1132-0>
- Gingele, S., Jacobus, T. L., Konen, F. F., Hummert, M. W., Suhs, K. W., Schwenkenbecher, P., Ahlbrecht, J., Mohn, N., Muschen, L. H., Bonig, L., Alvermann, S., Schmidt, R. E., Stangel, M., Jacobs, R., & Skripuletz, T. (2018). Ocrelizumab Depletes CD20(+) T Cells in Multiple Sclerosis Patients. *Cells*, 8(1). <https://doi.org/10.3390/cells8010012>
- Giovannoni, G., Comi, G., Cook, S., Rammohan, K., Rieckmann, P., Soelberg Sorensen, P., Vermersch, P., Chang, P., Hamlett, A., Musch, B., Greenberg, S. J., & Group, C. S. (2010). A placebo-controlled trial of oral cladribine for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med*, 362(5), 416-426. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0902533>
- Giovannoni, G., Comi, G., Rammohan, K., Rieckmann, P., Dangond, F., Keller, B., Jack, D., & Vermersch, P. (2021). Long-Term Disease Stability Assessed by the Expanded Disability Status Scale in Patients Treated with Cladribine Tablets 3.5 mg/kg for Relapsing Multiple Sclerosis: An Exploratory Post Hoc Analysis of the CLARITY and CLARITY Extension Studies. *Adv Ther*, 38(9), 4975-4985. <https://doi.org/10.1007/s12325-021-01865-w>
- Giovannoni, G., Cook, S., Rammohan, K., Rieckmann, P., Sorensen, P. S., Vermersch, P., Hamlett, A., Viglietta, V., Greenberg, S., & group, C. s. (2011). Sustained disease-activity-free status in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis treated with cladribine tablets in the

- CLARITY study: a post-hoc and subgroup analysis. *Lancet Neurol*, 10(4), 329-337. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(11\)70023-0](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(11)70023-0)
- Gold, R., Kappos, L., Arnold, D. L., Bar-Or, A., Giovannoni, G., Selmaj, K., Tornatore, C., Sweetser, M. T., Yang, M., Sheikh, S. I., Dawson, K. T., & Investigators, D. S. (2012). Placebo-controlled phase 3 study of oral BG-12 for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med*, 367(12), 1098-1107. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1114287>
- Goldenberg, P. Z., Kwon, E. E., Benjamins, J. A., Whitaker, J. N., Quarles, R. H., & Prineas, J. W. (1989). Oponization of normal myelin by anti-myelin antibodies and normal serum. *J Neuroimmunol*, 23(2), 157-166. [https://doi.org/10.1016/0165-5728\(89\)90035-0](https://doi.org/10.1016/0165-5728(89)90035-0)
- Goverman, J. (2009). Autoimmune T cell responses in the central nervous system. *Nat Rev Immunol*, 9(6), 393-407. <https://doi.org/10.1038/nri2550>
- Gresle, M. M., Jordan, M. A., Stankovich, J., Spelman, T., Johnson, L. J., Laverick, L., Hamlett, A., Smith, L. D., Jokubaitis, V. G., Baker, J., Haartsen, J., Taylor, B., Charlesworth, J., Bahlo, M., Speed, T. P., Brown, M. A., Field, J., Baxter, A. G., & Butzkueven, H. (2020). Multiple sclerosis risk variants regulate gene expression in innate and adaptive immune cells. *Life Sci Alliance*, 3(7). <https://doi.org/10.26508/lsa.202000650>
- Haider, L., Zrzavy, T., Hametner, S., Hoftberger, R., Bagnato, F., Grabner, G., Trattinig, S., Pfeifenbring, S., Bruck, W., & Lassmann, H. (2016). The topography of demyelination and neurodegeneration in the multiple sclerosis brain. *Brain*, 139(Pt 3), 807-815. <https://doi.org/10.1093/brain/awv398>
- Han, S. W., Jung, Y. K., Lee, E. J., Park, H. R., Kim, G. W., Jeong, J. H., Han, M. S., & Choi, J. Y. (2013). DICAM inhibits angiogenesis via suppression of AKT and p38 MAP kinase signalling. *Cardiovasc Res*, 98(1), 73-82. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvt019>
- Han, S. W., Kim, J. M., Lho, Y., Cho, H. J., Jung, Y. K., Kim, J. A., Lee, H., Lee, Y. J., & Kim, E. S. (2019). DICAM Attenuates Experimental Colitis via Stabilizing Junctional Complex in Mucosal Barrier. *Inflamm Bowel Dis*, 25(5), 853-861. <https://doi.org/10.1093/ibd/izy373>
- Harjunpaa, H., Lloret Asens, M., Guenther, C., & Fagerholm, S. C. (2019). Cell Adhesion Molecules and Their Roles and Regulation in the Immune and Tumor Microenvironment. *Front Immunol*, 10, 1078. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01078>

- Hassan, N. J., Barclay, A. N., & Brown, M. H. (2004). Frontline: Optimal T cell activation requires the engagement of CD6 and CD166. *Eur J Immunol*, 34(4), 930-940. <https://doi.org/10.1002/eji.200424856>
- Hauser, S. L., Bar-Or, A., Comi, G., Giovannoni, G., Hartung, H. P., Hemmer, B., Lublin, F., Montalban, X., Rammohan, K. W., Selmaj, K., Traboulsee, A., Wolinsky, J. S., Arnold, D. L., Klingelschmitt, G., Masterman, D., Fontoura, P., Belachew, S., Chin, P., Mairon, N., Garren, H., Kappos, L., Opera, I., & Investigators, O. I. C. (2017). Ocrelizumab versus Interferon Beta-1a in Relapsing Multiple Sclerosis. *N Engl J Med*, 376(3), 221-234. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1601277>
- Hauser, S. L., & Cree, B. A. C. (2020). Treatment of Multiple Sclerosis: A Review. *Am J Med*, 133(12), 1380-1390 e1382. <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2020.05.049>
- Hauser, S. L., Waubant, E., Arnold, D. L., Vollmer, T., Antel, J., Fox, R. J., Bar-Or, A., Panzara, M., Sarkar, N., Agarwal, S., Langer-Gould, A., Smith, C. H., & Group, H. T. (2008). B-cell depletion with rituximab in relapsing-remitting multiple sclerosis. *N Engl J Med*, 358(7), 676-688. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0706383>
- Hausler, D., Akgun, K., Stork, L., Lassmann, H., Ziemssen, T., Bruck, W., & Metz, I. (2021). CNS inflammation after natalizumab therapy for multiple sclerosis: A retrospective histopathological and CSF cohort study. *Brain Pathol*, 31(6), e12969. <https://doi.org/10.1111/bpa.12969>
- Hayashi, T., Morimoto, C., Burks, J. S., Kerr, C., & Hauser, S. L. (1988). Dual-label immunocytochemistry of the active multiple sclerosis lesion: major histocompatibility complex and activation antigens. *Ann Neurol*, 24(4), 523-531. <https://doi.org/10.1002/ana.410240408>
- Hedegaard, C. J., Krakauer, M., Bendtzen, K., Lund, H., Sellebjerg, F., & Nielsen, C. H. (2008). T helper cell type 1 (Th1), Th2 and Th17 responses to myelin basic protein and disease activity in multiple sclerosis. *Immunology*, 125(2), 161-169. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2008.02837.x>

- Heng, A. H. S., Han, C. W., Abbott, C., McColl, S. R., & Comerford, I. (2022). Chemokine-Driven Migration of Pro-Inflammatory CD4(+) T Cells in CNS Autoimmune Disease. *Front Immunol*, *13*, 817473. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.817473>
- Holmoy, T., Vandvik, B., & Vartdal, F. (2003). T cells from multiple sclerosis patients recognize immunoglobulin G from cerebrospinal fluid. *Mult Scler*, *9*(3), 228-234. <https://doi.org/10.1191/1352458503ms906oa>
- Howell, O. W., Reeves, C. A., Nicholas, R., Carassiti, D., Radotra, B., Gentleman, S. M., Serafini, B., Aloisi, F., Roncaroli, F., Magliozzi, R., & Reynolds, R. (2011). Meningeal inflammation is widespread and linked to cortical pathology in multiple sclerosis. *Brain*, *134*(Pt 9), 2755-2771. <https://doi.org/10.1093/brain/awr182>
- Huppert, J., Closhen, D., Croxford, A., White, R., Kulig, P., Pietrowski, E., Bechmann, I., Becher, B., Luhmann, H. J., Waisman, A., & Kuhlmann, C. R. (2010). Cellular mechanisms of IL-17-induced blood-brain barrier disruption. *FASEB J*, *24*(4), 1023-1034. <https://doi.org/10.1096/fj.09-141978>
- Huseby, E. S., Liggitt, D., Brabb, T., Schnabel, B., Ohlen, C., & Goverman, J. (2001). A pathogenic role for myelin-specific CD8(+) T cells in a model for multiple sclerosis. *J Exp Med*, *194*(5), 669-676. <https://doi.org/10.1084/jem.194.5.669>
- Ifergan, I., Kebir, H., Alvarez, J. I., Marceau, G., Bernard, M., Bourbonniere, L., Poirier, J., Duquette, P., Talbot, P. J., Arbour, N., & Prat, A. (2011). Central nervous system recruitment of effector memory CD8+ T lymphocytes during neuroinflammation is dependent on alpha4 integrin. *Brain*, *134*(Pt 12), 3560-3577. <https://doi.org/10.1093/brain/awr268>
- Ifergan, I., Kebir, H., Bernard, M., Wosik, K., Dodelet-Devillers, A., Cayrol, R., Arbour, N., & Prat, A. (2008). The blood-brain barrier induces differentiation of migrating monocytes into Th17-polarizing dendritic cells. *Brain*, *131*(Pt 3), 785-799. <https://doi.org/10.1093/brain/awm295>
- Ifergan, I., Kebir, H., Terouz, S., Alvarez, J. I., Lecuyer, M. A., Gendron, S., Bourbonniere, L., Dunay, I. R., Bouthillier, A., Moundjian, R., Fontana, A., Haqqani, A., Klopstein, A., Prinz, M., Lopez-Vales, R., Birchler, T., & Prat, A. (2011). Role of Ninjurin-1 in the migration of

myeloid cells to central nervous system inflammatory lesions. *Ann Neurol*, 70(5), 751-763.

<https://doi.org/10.1002/ana.22519>

Ikeda, K., & Quertermous, T. (2004). Molecular isolation and characterization of a soluble isoform of activated leukocyte cell adhesion molecule that modulates endothelial cell function. *J Biol Chem*, 279(53), 55315-55323. <https://doi.org/10.1074/jbc.M407776200>

International Multiple Sclerosis Genetics, C., Beecham, A. H., Patsopoulos, N. A., Xifara, D. K., Davis, M. F., Kempainen, A., Cotsapas, C., Shah, T. S., Spencer, C., Booth, D., Goris, A., Oturai, A., Saarela, J., Fontaine, B., Hemmer, B., Martin, C., Zipp, F., D'Alfonso, S., Martinelli-Boneschi, F., Taylor, B., Harbo, H. F., Kockum, I., Hillert, J., Olsson, T., Ban, M., Oksenberg, J. R., Hintzen, R., Barcellos, L. F., Wellcome Trust Case Control, C., International, I. B. D. G. C., Agliardi, C., Alfredsson, L., Alizadeh, M., Anderson, C., Andrews, R., Sondergaard, H. B., Baker, A., Band, G., Baranzini, S. E., Barizzone, N., Barrett, J., Bellenguez, C., Bergamaschi, L., Bernardinelli, L., Berthele, A., Biberacher, V., Binder, T. M., Blackburn, H., Bomfim, I. L., Brambilla, P., Broadley, S., Brochet, B., Brundin, L., Buck, D., Butzkueven, H., Caillier, S. J., Camu, W., Carpentier, W., Cavalla, P., Celius, E. G., Coman, I., Comi, G., Corrado, L., Cosemans, L., Cournu-Rebeix, I., Cree, B. A., Cusi, D., Damotte, V., Defer, G., Delgado, S. R., Deloukas, P., di Sapio, A., Dilthey, A. T., Donnelly, P., Dubois, B., Duddy, M., Edkins, S., Elovaara, I., Esposito, F., Evangelou, N., Fiddes, B., Field, J., Franke, A., Freeman, C., Frohlich, I. Y., Galimberti, D., Gieger, C., Gourraud, P. A., Graetz, C., Graham, A., Grummel, V., Guaschino, C., Hadjixenofontos, A., Hakonarson, H., Halfpenny, C., Hall, G., Hall, P., Hamsten, A., Harley, J., Harrower, T., Hawkins, C., Hellenthal, G., Hillier, C., Hobart, J., Hoshi, M., Hunt, S. E., Jagodic, M., Jelcic, I., Jochim, A., Kendall, B., Kermodé, A., Kilpatrick, T., Koivisto, K., Konidari, I., Korn, T., Kronsbein, H., Langford, C., Larsson, M., Lathrop, M., Lebrun-Frenay, C., Lechner-Scott, J., Lee, M. H., Leone, M. A., Leppa, V., Liberatore, G., Lie, B. A., Lill, C. M., Linden, M., Link, J., Luessi, F., Lycke, J., Macciardi, F., Mannisto, S., Manrique, C. P., Martin, R., Martinelli, V., Mason, D., Mazibrada, G., McCabe, C., Mero, I. L., Mescheriakova, J., Moutsianas, L., Myhr, K. M., Nagels, G., Nicholas, R., Nilsson, P., Piehl, F., Pirinen, M., Price, S. E., Quach, H., Reunanen, M., Robberecht, W., Robertson, N. P., Rodegher, M., Rog, D., Salvetti, M., Schnetz-Boutaud, N. C., Sellebjerg,

- F., Selter, R. C., Schaefer, C., Shaunak, S., Shen, L., Shields, S., Siffrin, V., Slee, M., Sorensen, P. S., Sorosina, M., Sospedra, M., Spurkland, A., Strange, A., Sundqvist, E., Thijs, V., Thorpe, J., Ticca, A., Tienari, P., van Duijn, C., Visser, E. M., Vucic, S., Westerlind, H., Wiley, J. S., Wilkins, A., Wilson, J. F., Winkelmann, J., Zajicek, J., Zindler, E., Haines, J. L., Pericak-Vance, M. A., Ivinson, A. J., Stewart, G., Hafler, D., Hauser, S. L., Compston, A., McVean, G., De Jager, P., Sawcer, S. J., & McCauley, J. L. (2013). Analysis of immune-related loci identifies 48 new susceptibility variants for multiple sclerosis. *Nat Genet*, *45*(11), 1353-1360. <https://doi.org/10.1038/ng.2770>
- International Multiple Sclerosis Genetics, C., Hafler, D. A., Compston, A., Sawcer, S., Lander, E. S., Daly, M. J., De Jager, P. L., de Bakker, P. I., Gabriel, S. B., Mirel, D. B., Ivinson, A. J., Pericak-Vance, M. A., Gregory, S. G., Rioux, J. D., McCauley, J. L., Haines, J. L., Barcellos, L. F., Cree, B., Oksenberg, J. R., & Hauser, S. L. (2007). Risk alleles for multiple sclerosis identified by a genomewide study. *N Engl J Med*, *357*(9), 851-862. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa073493>
- Iolyeva, M., Karaman, S., Willrodt, A. H., Weingartner, S., Vigl, B., & Halin, C. (2013). Novel role for ALCAM in lymphatic network formation and function. *FASEB J*, *27*(3), 978-990. <https://doi.org/10.1096/fj.12-217844>
- Ivanov, I., McKenzie, B. S., Zhou, L., Tadokoro, C. E., Lepelley, A., Lafaille, J. J., Cua, D. J., & Littman, D. R. (2006). The orphan nuclear receptor ROR γ directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. *Cell*, *126*(6), 1121-1133. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.07.035>
- Jacobsen, M., Cepok, S., Quak, E., Happel, M., Gaber, R., Ziegler, A., Schock, S., Oertel, W. H., Sommer, N., & Hemmer, B. (2002). Oligoclonal expansion of memory CD8+ T cells in cerebrospinal fluid from multiple sclerosis patients. *Brain*, *125*(Pt 3), 538-550. <https://doi.org/10.1093/brain/awf059>
- Jacquot, S., & Boyer, O. (2006). [Heterogeneity and function of human B lymphocytes]. *Med Sci (Paris)*, *22*(12), 1075-1080. <https://doi.org/10.1051/medsci/200622121075>
(Heterogeneite et fonctions des lymphocytes B chez l'homme.)

- Janzer, R. C., & Raff, M. C. (1987). Astrocytes induce blood-brain barrier properties in endothelial cells. *Nature*, 325(6101), 253-257. <https://doi.org/10.1038/325253a0>
- Jelcic, I., Al Nimer, F., Wang, J., Lentsch, V., Planas, R., Jelcic, I., Madjovski, A., Ruhmann, S., Faigle, W., Frauenknecht, K., Pinilla, C., Santos, R., Hammer, C., Ortiz, Y., Opitz, L., Gronlund, H., Rogler, G., Boyman, O., Reynolds, R., Lutterotti, A., Khademi, M., Olsson, T., Piehl, F., Sospedra, M., & Martin, R. (2018). Memory B Cells Activate Brain-Homing, Autoreactive CD4(+) T Cells in Multiple Sclerosis. *Cell*, 175(1), 85-100 e123. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.08.011>
- Jung, Y. K., Jin, J. S., Jeong, J. H., Kim, H. N., Park, N. R., & Choi, J. Y. (2008). DICAM, a novel dual immunoglobulin domain containing cell adhesion molecule interacts with alphavbeta3 integrin. *J Cell Physiol*, 216(3), 603-614. <https://doi.org/10.1002/jcp.21438>
- Kalra, S., Lowndes, C., Durant, L., Strange, R. C., Al-Araji, A., Hawkins, C. P., & Curnow, S. J. (2020). Th17 cells increase in RRMS as well as in SPMS, whereas various other phenotypes of Th17 increase in RRMS only. *Mult Scler J Exp Transl Clin*, 6(1), 2055217319899695. <https://doi.org/10.1177/2055217319899695>
- Kappos, L., Antel, J., Comi, G., Montalban, X., O'Connor, P., Polman, C. H., Haas, T., Korn, A. A., Karlsson, G., Radue, E. W., & Group, F. D. S. (2006). Oral fingolimod (FTY720) for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med*, 355(11), 1124-1140. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa052643>
- Kappos, L., Radue, E. W., O'Connor, P., Polman, C., Hohlfeld, R., Calabresi, P., Selmaj, K., Agoropoulou, C., Leyk, M., Zhang-Auberson, L., Burtin, P., & Group, F. S. (2010). A placebo-controlled trial of oral fingolimod in relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med*, 362(5), 387-401. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0909494>
- Kebir, H., Ifergan, I., Alvarez, J. I., Bernard, M., Poirier, J., Arbour, N., Duquette, P., & Prat, A. (2009). Preferential recruitment of interferon-gamma-expressing TH17 cells in multiple sclerosis. *Ann Neurol*, 66(3), 390-402. <https://doi.org/10.1002/ana.21748>
- Kebir, H., Kreymborg, K., Ifergan, I., Dodelet-Devillers, A., Cayrol, R., Bernard, M., Giuliani, F., Arbour, N., Becher, B., & Prat, A. (2007). Human TH17 lymphocytes promote blood-brain

- barrier disruption and central nervous system inflammation. *Nat Med*, 13(10), 1173-1175. <https://doi.org/10.1038/nm1651>
- Kiely, J. M., Hu, Y., Garcia-Cardena, G., & Gimbrone, M. A., Jr. (2003). Lipid raft localization of cell surface E-selectin is required for ligation-induced activation of phospholipase C gamma. *J Immunol*, 171(6), 3216-3224. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.171.6.3216>
- Killestein, J., Vennegoor, A., Strijbis, E. M., Seewann, A., van Oosten, B. W., Uitdehaag, B. M., & Polman, C. H. (2010). Natalizumab drug holiday in multiple sclerosis: poorly tolerated. *Ann Neurol*, 68(3), 392-395. <https://doi.org/10.1002/ana.22074>
- Kimura, A., & Kishimoto, T. (2010). IL-6: regulator of Treg/Th17 balance. *Eur J Immunol*, 40(7), 1830-1835. <https://doi.org/10.1002/eji.201040391>
- Kivisakk, P., Imitola, J., Rasmussen, S., Elyaman, W., Zhu, B., Ransohoff, R. M., & Khoury, S. J. (2009). Localizing central nervous system immune surveillance: meningeal antigen-presenting cells activate T cells during experimental autoimmune encephalomyelitis. *Ann Neurol*, 65(4), 457-469. <https://doi.org/10.1002/ana.21379>
- Kivisakk, P., Mahad, D. J., Callahan, M. K., Sikora, K., Trebst, C., Tucky, B., Wujek, J., Ravid, R., Staugaitis, S. M., Lassmann, H., & Ransohoff, R. M. (2004). Expression of CCR7 in multiple sclerosis: implications for CNS immunity. *Ann Neurol*, 55(5), 627-638. <https://doi.org/10.1002/ana.20049>
- Kleinschmidt-DeMasters, B. K., & Tyler, K. L. (2005). Progressive multifocal leukoencephalopathy complicating treatment with natalizumab and interferon beta-1a for multiple sclerosis. *N Engl J Med*, 353(4), 369-374. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa051782>
- Koch-Henriksen, N., & Sorensen, P. S. (2010). The changing demographic pattern of multiple sclerosis epidemiology. *Lancet Neurol*, 9(5), 520-532. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(10\)70064-8](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(10)70064-8)
- Kofler, D. M., Severson, C. A., Mousissian, N., De Jager, P. L., & Hafler, D. A. (2011). The CD6 multiple sclerosis susceptibility allele is associated with alterations in CD4+ T cell proliferation. *J Immunol*, 187(6), 3286-3291. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1100626>
- Komiyama, Y., Nakae, S., Matsuki, T., Nambu, A., Ishigame, H., Kakuta, S., Sudo, K., & Iwakura, Y. (2006). IL-17 plays an important role in the development of experimental autoimmune

- encephalomyelitis. *J Immunol*, 177(1), 566-573.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.1.566>
- Konjevic Sabolek, M., Held, K., Beltran, E., Niedl, A. G., Meinl, E., Hohlfeld, R., Lassmann, H., & Dornmair, K. (2019). Communication of CD8(+) T cells with mononuclear phagocytes in multiple sclerosis. *Ann Clin Transl Neurol*, 6(7), 1151-1164.
<https://doi.org/10.1002/acn3.783>
- Kooij, G., & de Vries, H. E. (2015). The best basic science paper in multiple sclerosis in 2014: important role for the choroid plexus in the central nervous system entry of leukocytes. *Mult Scler*, 21(4), 372-373. <https://doi.org/10.1177/13524585155573095>
- Kooij, G., Kopplin, K., Blasig, R., Stuiver, M., Koning, N., Goverse, G., van der Pol, S. M., van Het Hof, B., Gollasch, M., Drexhage, J. A., Reijerkerk, A., Meij, I. C., Mebius, R., Willnow, T. E., Muller, D., Blasig, I. E., & de Vries, H. E. (2014). Disturbed function of the blood-cerebrospinal fluid barrier aggravates neuro-inflammation. *Acta Neuropathol*, 128(2), 267-277. <https://doi.org/10.1007/s00401-013-1227-1>
- Korn, T., Mitsdoerffer, M., Croxford, A. L., Awasthi, A., Dardalhon, V. A., Galileos, G., Vollmar, P., Stritesky, G. L., Kaplan, M. H., Waisman, A., Kuchroo, V. K., & Oukka, M. (2008). IL-6 controls Th17 immunity in vivo by inhibiting the conversion of conventional T cells into Foxp3+ regulatory T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(47), 18460-18465.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0809850105>
- Krieg, A. M., Yi, A. K., Matson, S., Waldschmidt, T. J., Bishop, G. A., Teasdale, R., Koretzky, G. A., & Klinman, D. M. (1995). CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature*, 374(6522), 546-549. <https://doi.org/10.1038/374546a0>
- Krishnamoorthy, G., Lassmann, H., Wekerle, H., & Holz, A. (2006). Spontaneous opticospinal encephalomyelitis in a double-transgenic mouse model of autoimmune T cell/B cell cooperation. *J Clin Invest*, 116(9), 2385-2392. <https://doi.org/10.1172/JCI28330>
- Kuhlmann, T., Ludwin, S., Prat, A., Antel, J., Bruck, W., & Lassmann, H. (2017). An updated histological classification system for multiple sclerosis lesions. *Acta Neuropathol*, 133(1), 13-24. <https://doi.org/10.1007/s00401-016-1653-y>

- Kunkl, M., Frascolla, S., Amormino, C., Volpe, E., & Tuosto, L. (2020). T Helper Cells: The Modulators of Inflammation in Multiple Sclerosis. *Cells*, 9(2). <https://doi.org/10.3390/cells9020482>
- Kurtzke, J. F. (1983). Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology*, 33(11), 1444-1452. <https://doi.org/10.1212/wnl.33.11.1444>
- Langrish, C. L., Chen, Y., Blumenschein, W. M., Mattson, J., Basham, B., Sedgwick, J. D., McClanahan, T., Kastelein, R. A., & Cua, D. J. (2005). IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J Exp Med*, 201(2), 233-240. <https://doi.org/10.1084/jem.20041257>
- Larochelle, C., Alvarez, J. I., & Prat, A. (2011). How do immune cells overcome the blood-brain barrier in multiple sclerosis? *FEBS Lett*, 585(23), 3770-3780. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2011.04.066>
- Larochelle, C., Cayrol, R., Kebir, H., Alvarez, J. I., Lecuyer, M. A., Ifergan, I., Viel, E., Bourbonniere, L., Beauseigle, D., Terouz, S., Hachehouche, L., Gendron, S., Poirier, J., Jobin, C., Duquette, P., Flanagan, K., Yednock, T., Arbour, N., & Prat, A. (2012). Melanoma cell adhesion molecule identifies encephalitogenic T lymphocytes and promotes their recruitment to the central nervous system. *Brain*, 135(Pt 10), 2906-2924. <https://doi.org/10.1093/brain/aws212>
- Larochelle, C., Lecuyer, M. A., Alvarez, J. I., Charabati, M., Saint-Laurent, O., Ghannam, S., Kebir, H., Flanagan, K., Yednock, T., Duquette, P., Arbour, N., & Prat, A. (2015). Melanoma cell adhesion molecule-positive CD8 T lymphocytes mediate central nervous system inflammation. *Ann Neurol*, 78(1), 39-53. <https://doi.org/10.1002/ana.24415>
- Lassmann, H. (2018). Multiple Sclerosis Pathology. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 8(3). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a028936>
- Lassmann, H., & Bradl, M. (2017). Multiple sclerosis: experimental models and reality. *Acta Neuropathol*, 133(2), 223-244. <https://doi.org/10.1007/s00401-016-1631-4>

- Lawrence, M. B., & Springer, T. A. (1991). Leukocytes roll on a selectin at physiologic flow rates: distinction from and prerequisite for adhesion through integrins. *Cell*, *65*(5), 859-873. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(91\)90393-d](https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90393-d)
- Lecuyer, M. A., Saint-Laurent, O., Bourbonniere, L., Larouche, S., Laroche, C., Michel, L., Charabati, M., Abadier, M., Zandee, S., Haghayegh Jahromi, N., Gowing, E., Pittet, C., Lyck, R., Engelhardt, B., & Prat, A. (2017). Dual role of ALCAM in neuroinflammation and blood-brain barrier homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *114*(4), E524-E533. <https://doi.org/10.1073/pnas.1614336114>
- Lee, D. S. W., Yam, J. Y., Grasmuck, C., Dasoveanu, D., Michel, L., Ward, L. A., Rojas, O. L., Zandee, S., Bourbonniere, L., Ramaglia, V., Bar-Or, A., Prat, A., & Gommerman, J. L. (2021). CCR6 Expression on B Cells Is Not Required for Clinical or Pathological Presentation of MOG Protein-Induced Experimental Autoimmune Encephalomyelitis despite an Altered Germinal Center Response. *J Immunol*, *207*(6), 1513-1521. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.2001413>
- Lee, S. J., & Benveniste, E. N. (1999). Adhesion molecule expression and regulation on cells of the central nervous system. *J Neuroimmunol*, *98*(2), 77-88. [https://doi.org/10.1016/S0165-5728\(99\)00084-3](https://doi.org/10.1016/S0165-5728(99)00084-3)
- Lee-Chang, C., Top, I., Zephir, H., Dubucquoi, S., Trauet, J., Dussart, P., Prin, L., & Vermersch, P. (2011). Primed status of transitional B cells associated with their presence in the cerebrospinal fluid in early phases of multiple sclerosis. *Clin Immunol*, *139*(1), 12-20. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2010.11.004>
- Lehmann-Horn, K., Sagan, S. A., Bernard, C. C., Sobel, R. A., & Zamvil, S. S. (2015). B-cell very late antigen-4 deficiency reduces leukocyte recruitment and susceptibility to central nervous system autoimmunity. *Ann Neurol*, *77*(5), 902-908. <https://doi.org/10.1002/ana.24387>
- Levings, M. K., Allan, S., d'Hennezel, E., & Piccirillo, C. A. (2006). Functional dynamics of naturally occurring regulatory T cells in health and autoimmunity. *Adv Immunol*, *92*, 119-155. [https://doi.org/10.1016/S0065-2776\(06\)92003-3](https://doi.org/10.1016/S0065-2776(06)92003-3)
- Li, R., Patterson, K. R., & Bar-Or, A. (2018). Reassessing B cell contributions in multiple sclerosis. *Nat Immunol*, *19*(7), 696-707. <https://doi.org/10.1038/s41590-018-0135-x>

- Li, R., Rezk, A., Healy, L. M., Muirhead, G., Prat, A., Gommerman, J. L., Bar-Or, A., & Team, M. C. B. c. i. M. (2015). Cytokine-Defined B Cell Responses as Therapeutic Targets in Multiple Sclerosis. *Front Immunol*, 6, 626. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00626>
- Li, R., Rezk, A., Li, H., Gommerman, J. L., Prat, A., Bar-Or, A., & Canadian, B. C. i. M. S. T. (2017). Antibody-Independent Function of Human B Cells Contributes to Antifungal T Cell Responses. *J Immunol*, 198(8), 3245-3254. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1601572>
- Li, R., Rezk, A., Miyazaki, Y., Hilgenberg, E., Touil, H., Shen, P., Moore, C. S., Michel, L., Althekair, F., Rajasekharan, S., Gommerman, J. L., Prat, A., Fillatreau, S., Bar-Or, A., & Canadian, B. c. i. M. S. T. (2015). Proinflammatory GM-CSF-producing B cells in multiple sclerosis and B cell depletion therapy. *Sci Transl Med*, 7(310), 310ra166. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aab4176>
- Li, Y., Wang, H., Long, Y., Lu, Z., & Hu, X. (2011). Increased memory Th17 cells in patients with neuromyelitis optica and multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*, 234(1-2), 155-160. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2011.03.009>
- Linda, H., von Heijne, A., Major, E. O., Ryschkewitsch, C., Berg, J., Olsson, T., & Martin, C. (2009). Progressive multifocal leukoencephalopathy after natalizumab monotherapy. *N Engl J Med*, 361(11), 1081-1087. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0810316>
- Linnington, C., Bradl, M., Lassmann, H., Brunner, C., & 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(3), 443-454. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2450462>
- Linthicum, D. S., Munoz, J. J., & Blaskett, A. (1982). Acute experimental autoimmune encephalomyelitis in mice. I. Adjuvant action of Bordetella pertussis is due to vasoactive amine sensitization and increased vascular permeability of the central nervous system. *Cell Immunol*, 73(2), 299-310. [https://doi.org/10.1016/0008-8749\(82\)90457-9](https://doi.org/10.1016/0008-8749(82)90457-9)
- Lisak, R. P., Benjamins, J. A., Nedelkoska, L., Barger, J. L., Ragheb, S., Fan, B., Ouamara, N., Johnson, T. A., Rajasekharan, S., & Bar-Or, A. (2012). Secretory products of multiple sclerosis B cells are cytotoxic to oligodendroglia in vitro. *J Neuroimmunol*, 246(1-2), 85-95. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2012.02.015>

- Lisak, R. P., Nedelkoska, L., Benjamins, J. A., Schalk, D., Bealmear, B., Touil, H., Li, R., Muirhead, G., & Bar-Or, A. (2017). B cells from patients with multiple sclerosis induce cell death via apoptosis in neurons in vitro. *J Neuroimmunol*, *309*, 88-99. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2017.05.004>
- Lock, C., Hermans, G., Pedotti, R., Brendolan, A., Schadt, E., Garren, H., Langer-Gould, A., Strober, S., Cannella, B., Allard, J., Klonowski, P., Austin, A., Lad, N., Kaminski, N., Galli, S. J., Oksenberg, J. R., Raine, C. S., Heller, R., & Steinman, L. (2002). Gene-microarray analysis of multiple sclerosis lesions yields new targets validated in autoimmune encephalomyelitis. *Nat Med*, *8*(5), 500-508. <https://doi.org/10.1038/nm0502-500>
- Lossinsky, A. S., Pluta, R., Song, M. J., Badmajew, V., Moretz, R. C., & Wisniewski, H. M. (1991). Mechanisms of inflammatory cell attachment in chronic relapsing experimental allergic encephalomyelitis: a scanning and high-voltage electron microscopic study of the injured mouse blood-brain barrier. *Microvasc Res*, *41*(3), 299-310. [https://doi.org/10.1016/0026-2862\(91\)90030-f](https://doi.org/10.1016/0026-2862(91)90030-f)
- Louveau, A., Smirnov, I., Keyes, T. J., Eccles, J. D., Rouhani, S. J., Peske, J. D., Derecki, N. C., Castle, D., Mandell, J. W., Lee, K. S., Harris, T. H., & Kipnis, J. (2015). Structural and functional features of central nervous system lymphatic vessels. *Nature*, *523*(7560), 337-341. <https://doi.org/10.1038/nature14432>
- Lubetzki, C., Zalc, B., Williams, A., Stadelmann, C., & Stankoff, B. (2020). Remyelination in multiple sclerosis: from basic science to clinical translation. *Lancet Neurol*, *19*(8), 678-688. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(20\)30140-X](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(20)30140-X)
- Lucchinetti, C. F., Popescu, B. F., Bunyan, R. F., Moll, N. M., Roemer, S. F., Lassmann, H., Bruck, W., Parisi, J. E., Scheithauer, B. W., Giannini, C., Weigand, S. D., Mandrekar, J., & Ransohoff, R. M. (2011). Inflammatory cortical demyelination in early multiple sclerosis. *N Engl J Med*, *365*(23), 2188-2197. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1100648>
- Lyck, R., Lecuyer, M. A., Abadier, M., Wyss, C. B., Matti, C., Rosito, M., Enzmann, G., Zeis, T., Michel, L., Garcia Martin, A. B., Sallusto, F., Gosselot, F., Deutsch, U., Weiner, J. A., Schaeren-Wiemers, N., Prat, A., & Engelhardt, B. (2017). ALCAM (CD166) is involved in

- extravasation of monocytes rather than T cells across the blood-brain barrier. *J Cereb Blood Flow Metab*, 37(8), 2894-2909. <https://doi.org/10.1177/0271678X16678639>
- Machado-Santos, J., Saji, E., Troscher, A. R., Paunovic, M., Liblau, R., Gabriely, G., Bien, C. G., Bauer, J., & Lassmann, H. (2018). The compartmentalized inflammatory response in the multiple sclerosis brain is composed of tissue-resident CD8+ T lymphocytes and B cells. *Brain*, 141(7), 2066-2082. <https://doi.org/10.1093/brain/awy151>
- MacLeod, M. K., Kappler, J. W., & Marrack, P. (2010). Memory CD4 T cells: generation, reactivation and re-assignment. *Immunology*, 130(1), 10-15. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2010.03260.x>
- Magliozzi, R., Howell, O., Vora, A., Serafini, B., Nicholas, R., Puopolo, M., Reynolds, R., & Aloisi, F. (2007). Meningeal B-cell follicles in secondary progressive multiple sclerosis associate with early onset of disease and severe cortical pathology. *Brain*, 130(Pt 4), 1089-1104. <https://doi.org/10.1093/brain/awm038>
- Magliozzi, R., Howell, O. W., Reeves, C., Roncaroli, F., Nicholas, R., Serafini, B., Aloisi, F., & Reynolds, R. (2010). A Gradient of neuronal loss and meningeal inflammation in multiple sclerosis. *Ann Neurol*, 68(4), 477-493. <https://doi.org/10.1002/ana.22230>
- Manes, S., & Viola, A. (2006). Lipid rafts in lymphocyte activation and migration. *Mol Membr Biol*, 23(1), 59-69. <https://doi.org/10.1080/09687860500430069>
- Mangan, P. R., Harrington, L. E., O'Quinn, D. B., Helms, W. S., Bullard, D. C., Elson, C. O., Hatton, R. D., Wahl, S. M., Schoeb, T. R., & Weaver, C. T. (2006). Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage. *Nature*, 441(7090), 231-234. <https://doi.org/10.1038/nature04754>
- Mastorakos, P., & McGavern, D. (2019). The anatomy and immunology of vasculature in the central nervous system. *Sci Immunol*, 4(37). <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aav0492>
- Matsushita, T., Yanaba, K., Bouaziz, J. D., Fujimoto, M., & Tedder, T. F. (2008). Regulatory B cells inhibit EAE initiation in mice while other B cells promote disease progression. *J Clin Invest*, 118(10), 3420-3430. <https://doi.org/10.1172/JCI36030>
- Matusevicius, D., Kivisakk, P., He, B., Kostulas, N., Ozenci, V., Fredrikson, S., & Link, H. (1999). Interleukin-17 mRNA expression in blood and CSF mononuclear cells is augmented in

- multiple sclerosis. *Mult Scler*, 5(2), 101-104.
<https://doi.org/10.1177/135245859900500206>
- McCarron, R. M., Wang, L., Racke, M. K., McFarlin, D. E., & Spatz, M. (1993). Cytokine-regulated adhesion between encephalitogenic T lymphocytes and cerebrovascular endothelial cells. *J Neuroimmunol*, 43(1-2), 23-30. [https://doi.org/10.1016/0165-5728\(93\)90071-6](https://doi.org/10.1016/0165-5728(93)90071-6)
- McDonald, W. I., Compston, A., Edan, G., Goodkin, D., Hartung, H. P., Lublin, F. D., McFarland, H. F., Paty, D. W., Polman, C. H., Reingold, S. C., Sandberg-Wollheim, M., Sibley, W., Thompson, A., van den Noort, S., Weinshenker, B. Y., & Wolinsky, J. S. (2001). Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Ann Neurol*, 50(1), 121-127.
<https://doi.org/10.1002/ana.1032>
- McWilliam, O., Sellebjerg, F., Marquart, H. V., & von Essen, M. R. (2018). B cells from patients with multiple sclerosis have a pathogenic phenotype and increased LTalpha and TGFbeta1 response. *J Neuroimmunol*, 324, 157-164.
<https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2018.09.001>
- Mead, R. J., Singhrao, S. K., Neal, J. W., Lassmann, H., & Morgan, B. P. (2002). The membrane attack complex of complement causes severe demyelination associated with acute axonal injury. *J Immunol*, 168(1), 458-465. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.168.1.458>
- Medaer, R. (1979). Does the history of multiple sclerosis go back as far as the 14th century? *Acta Neurol Scand*, 60(3), 189-192. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0404.1979.tb02968.x>
- Mehling, M., Lindberg, R., Raulf, F., Kuhle, J., Hess, C., Kappos, L., & Brinkmann, V. (2010). Th17 central memory T cells are reduced by FTY720 in patients with multiple sclerosis. *Neurology*, 75(5), 403-410. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e3181ebdd64>
- Mendel, I., Kerlero de Rosbo, N., & Ben-Nun, A. (1995). A myelin oligodendrocyte glycoprotein peptide induces typical chronic experimental autoimmune encephalomyelitis in H-2b mice: fine specificity and T cell receptor V beta expression of encephalitogenic T cells. *Eur J Immunol*, 25(7), 1951-1959. <https://doi.org/10.1002/eji.1830250723>
- Merrill, J. E., Kono, D. H., Clayton, J., Ando, D. G., Hinton, D. R., & Hofman, F. M. (1992). Inflammatory leukocytes and cytokines in the peptide-induced disease of experimental

- allergic encephalomyelitis in SJL and B10.PL mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89(2), 574-578.
<https://doi.org/10.1073/pnas.89.2.574>
- Michel, L., Grasmuck, C., Charabati, M., Lecuyer, M. A., Zandee, S., Dhaeze, T., Alvarez, J. I., Li, R., Larouche, S., Bourbonniere, L., Moumdjian, R., Bouthillier, A., Lahav, B., Duquette, P., Bar-Or, A., Gommerman, J. L., Peelen, E., & Prat, A. (2019). Activated leukocyte cell adhesion molecule regulates B lymphocyte migration across central nervous system barriers. *Sci Transl Med*, 11(518). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaw0475>
- Mills, K. H. (2011). TLR-dependent T cell activation in autoimmunity. *Nat Rev Immunol*, 11(12), 807-822. <https://doi.org/10.1038/nri3095>
- Molnarfi, N., Schulze-Topphoff, U., Weber, M. S., Patarroyo, J. C., Prod'homme, T., Varrin-Doyer, M., Shetty, A., Linington, C., Slavin, A. J., Hidalgo, J., Jenne, D. E., Wekerle, H., Sobel, R. A., Bernard, C. C., Shlomchik, M. J., & Zamvil, S. S. (2013). MHC class II-dependent B cell APC function is required for induction of CNS autoimmunity independent of myelin-specific antibodies. *J Exp Med*, 210(13), 2921-2937. <https://doi.org/10.1084/jem.20130699>
- Monson, N. L., Cravens, P. D., Frohman, E. M., Hawker, K., & 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(2), 258-264.
<https://doi.org/10.1001/archneur.62.2.258>
- Montalban, X., Hauser, S. L., Kappos, L., Arnold, D. L., Bar-Or, A., Comi, G., de Seze, J., Giovannoni, G., Hartung, H. P., Hemmer, B., Lublin, F., Rammohan, K. W., Selmaj, K., Traboulsee, A., Sauter, A., Masterman, D., Fontoura, P., Belachew, S., Garren, H., Mairon, N., Chin, P., Wolinsky, J. S., & Investigators, O. C. (2017). Ocrelizumab versus Placebo in Primary Progressive Multiple Sclerosis. *N Engl J Med*, 376(3), 209-220.
<https://doi.org/10.1056/NEJMoa1606468>
- Montes Diaz, G., Fraussen, J., Van Wijmeersch, B., Hupperts, R., & Somers, V. (2018). Dimethyl fumarate induces a persistent change in the composition of the innate and adaptive immune system in multiple sclerosis patients. *Sci Rep*, 8(1), 8194.
<https://doi.org/10.1038/s41598-018-26519-w>

- Montresor, A., Toffali, L., Constantin, G., & Laudanna, C. (2012). Chemokines and the signaling modules regulating integrin affinity. *Front Immunol*, 3, 127. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00127>
- Morgan, B. P., Gommerman, J. L., & Ramaglia, V. (2020). An "Outside-In" and "Inside-Out" Consideration of Complement in the Multiple Sclerosis Brain: Lessons From Development and Neurodegenerative Diseases. *Front Cell Neurosci*, 14, 600656. <https://doi.org/10.3389/fncel.2020.600656>
- Moser, T., Akgun, K., Proschmann, U., Sellner, J., & Ziemssen, T. (2020). The role of TH17 cells in multiple sclerosis: Therapeutic implications. *Autoimmun Rev*, 19(10), 102647. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2020.102647>
- Mosmann, T. R., & Coffman, R. L. (1989). TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol*, 7, 145-173. <https://doi.org/10.1146/annurev.iy.07.040189.001045>
- Motte, J., Kneiphof, J., Strassburger-Krogias, K., Klasing, A., Adams, O., Haghikia, A., & Gold, R. (2018). Detection of JC virus archetype in cerebrospinal fluid in a MS patient with dimethylfumarate treatment without lymphopenia or signs of PML. *J Neurol*, 265(8), 1880-1882. <https://doi.org/10.1007/s00415-018-8931-7>
- Munsterberg, J., Loreth, D., Brylka, L., Werner, S., Karbanova, J., Gandrass, M., Schneegans, S., Besler, K., Hamester, F., Robador, J. R., Bauer, A. T., Schneider, S. W., Wrage, M., Lamszus, K., Matschke, J., Vashist, Y., Uzunoglu, G., Steurer, S., Horst, A. K., Oliveira-Ferrer, L., Glatzel, M., Schinke, T., Corbeil, D., Pantel, K., Maire, C., & Wikman, H. (2020). ALCAM contributes to brain metastasis formation in non-small-cell lung cancer through interaction with the vascular endothelium. *Neuro Oncol*, 22(7), 955-966. <https://doi.org/10.1093/neuonc/noaa028>
- Murphy, A. C., Lalor, S. J., Lynch, M. A., & Mills, K. H. (2010). Infiltration of Th1 and Th17 cells and activation of microglia in the CNS during the course of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain Behav Immun*, 24(4), 641-651. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2010.01.014>

- Nelissen, J. M., Peters, I. M., de Grooth, B. G., van Kooyk, Y., & Figdor, C. G. (2000). Dynamic regulation of activated leukocyte cell adhesion molecule-mediated homotypic cell adhesion through the actin cytoskeleton. *Mol Biol Cell*, 11(6), 2057-2068. <https://doi.org/10.1091/mbc.11.6.2057>
- Neuhaus, J., Risau, W., & Wolburg, H. (1991). Induction of blood-brain barrier characteristics in bovine brain endothelial cells by rat astroglial cells in transfilter coculture. *Ann N Y Acad Sci*, 633, 578-580. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1991.tb15667.x>
- Neumann, H., Medana, I. M., Bauer, J., & Lassmann, H. (2002). Cytotoxic T lymphocytes in autoimmune and degenerative CNS diseases. *Trends Neurosci*, 25(6), 313-319. [https://doi.org/10.1016/s0166-2236\(02\)02154-9](https://doi.org/10.1016/s0166-2236(02)02154-9)
- Nourshargh, S., & Alon, R. (2014). Leukocyte migration into inflamed tissues. *Immunity*, 41(5), 694-707. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.10.008>
- O'Neill, S. K., Cao, Y., Hamel, K. M., Doodes, P. D., Hutas, G., & Finnegan, A. (2007). Expression of CD80/86 on B cells is essential for autoreactive T cell activation and the development of arthritis. *J Immunol*, 179(8), 5109-5116. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.8.5109>
- Ohneda, O., Ohneda, K., Arai, F., Lee, J., Miyamoto, T., Fukushima, Y., Dowbenko, D., Lasky, L. A., & Suda, T. (2001). ALCAM (CD166): its role in hematopoietic and endothelial development. *Blood*, 98(7), 2134-2142. <https://doi.org/10.1182/blood.v98.7.2134>
- Oleinika, K., Mauri, C., & Salama, A. D. (2019). Effector and regulatory B cells in immune-mediated kidney disease. *Nat Rev Nephrol*, 15(1), 11-26. <https://doi.org/10.1038/s41581-018-0074-7>
- Optic Neuritis Study, G. (2008). Multiple sclerosis risk after optic neuritis: final optic neuritis treatment trial follow-up. *Arch Neurol*, 65(6), 727-732. <https://doi.org/10.1001/archneur.65.6.727>
- Palanichamy, A., Apeltsin, L., Kuo, T. C., Sirota, M., Wang, S., Pitts, S. J., Sundar, P. D., Telman, D., Zhao, L. Z., Derstine, M., Abounasr, A., Hauser, S. L., & von Budingen, H. C. (2014). Immunoglobulin class-switched B cells form an active immune axis between CNS and periphery in multiple sclerosis. *Sci Transl Med*, 6(248), 248ra106. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3008930>

- Panitch, H. S., Hirsch, R. L., Haley, A. S., & Johnson, K. P. (1987). Exacerbations of multiple sclerosis in patients treated with gamma interferon. *Lancet*, *1*(8538), 893-895. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(87\)92863-7](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(87)92863-7)
- Panitch, H. S., Hirsch, R. L., Schindler, J., & Johnson, K. P. (1987). Treatment of multiple sclerosis with gamma interferon: exacerbations associated with activation of the immune system. *Neurology*, *37*(7), 1097-1102. <https://doi.org/10.1212/wnl.37.7.1097>
- Pardridge, W. M. (2017). Delivery of Biologics Across the Blood-Brain Barrier with Molecular Trojan Horse Technology. *BioDrugs*, *31*(6), 503-519. <https://doi.org/10.1007/s40259-017-0248-z>
- Paroni, M., Maltese, V., De Simone, M., Ranzani, V., Larghi, P., Fenoglio, C., Pietroboni, A. M., De Riz, M. A., Crosti, M. C., Maglie, S., Moro, M., Caprioli, F., Rossi, R., Rossetti, G., Galimberti, D., Pagani, M., Scarpini, E., Abrignani, S., & Geginat, J. (2017). Recognition of viral and self-antigens by TH1 and TH1/TH17 central memory cells in patients with multiple sclerosis reveals distinct roles in immune surveillance and relapses. *J Allergy Clin Immunol*, *140*(3), 797-808. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2016.11.045>
- Patel, D. D., Wee, S. F., Whichard, L. P., Bowen, M. A., Pesando, J. M., Aruffo, A., & Haynes, B. F. (1995). Identification and characterization of a 100-kD ligand for CD6 on human thymic epithelial cells. *J Exp Med*, *181*(4), 1563-1568. <https://doi.org/10.1084/jem.181.4.1563>
- Paterson, P. Y. (1960). Transfer of allergic encephalomyelitis in rats by means of lymph node cells. *J Exp Med*, *111*, 119-136. <https://doi.org/10.1084/jem.111.1.119>
- Pawlak, M., Ho, A. W., & Kuchroo, V. K. (2020). Cytokines and transcription factors in the differentiation of CD4(+) T helper cell subsets and induction of tissue inflammation and autoimmunity. *Curr Opin Immunol*, *67*, 57-67. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2020.09.001>
- Pelletier, M., Maggi, L., Micheletti, A., Lazzeri, E., Tamassia, N., Costantini, C., Cosmi, L., Lunardi, C., Annunziato, F., Romagnani, S., & Cassatella, M. A. (2010). Evidence for a cross-talk between human neutrophils and Th17 cells. *Blood*, *115*(2), 335-343. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-04-216085>
- Perriard, G., Mathias, A., Enz, L., Canales, M., Schluep, M., Gentner, M., Schaeren-Wiemers, N., & Du Pasquier, R. A. (2015). Interleukin-22 is increased in multiple sclerosis patients and

- targets astrocytes. *J Neuroinflammation*, 12, 119. <https://doi.org/10.1186/s12974-015-0335-3>
- Pettinelli, C. B., & 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*, 127(4), 1420-1423. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6168690>
- Pikor, N. B., Prat, A., Bar-Or, A., & Gommerman, J. L. (2015). Meningeal Tertiary Lymphoid Tissues and Multiple Sclerosis: A Gathering Place for Diverse Types of Immune Cells during CNS Autoimmunity. *Front Immunol*, 6, 657. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00657>
- Pober, J. S., & Tellides, G. (2012). Participation of blood vessel cells in human adaptive immune responses. *Trends Immunol*, 33(1), 49-57. <https://doi.org/10.1016/j.it.2011.09.006>
- Pollinger, B., Krishnamoorthy, G., Berer, K., Lassmann, H., Bosl, M. R., Dunn, R., Domingues, H. S., Holz, A., Kurschus, F. C., & 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(6), 1303-1316. <https://doi.org/10.1084/jem.20090299>
- Polman, C. H., O'Connor, P. W., Havrdova, E., Hutchinson, M., Kappos, L., Miller, D. H., Phillips, J. T., Lublin, F. D., Giovannoni, G., Wajgt, A., Toal, M., Lynn, F., Panzara, M. A., Sandrock, A. W., & Investigators, A. (2006). A randomized, placebo-controlled trial of natalizumab for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med*, 354(9), 899-910. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa044397>
- Polman, C. H., Reingold, S. C., Banwell, B., Clanet, M., Cohen, J. A., Filippi, M., Fujihara, K., Havrdova, E., Hutchinson, M., Kappos, L., Lublin, F. D., Montalban, X., O'Connor, P., Sandberg-Wollheim, M., Thompson, A. J., Waubant, E., Weinshenker, B., & Wolinsky, J. S. (2011). Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria. *Ann Neurol*, 69(2), 292-302. <https://doi.org/10.1002/ana.22366>
- Polman, C. H., Reingold, S. C., Edan, G., Filippi, M., Hartung, H. P., Kappos, L., Lublin, F. D., Metz, L. M., McFarland, H. F., O'Connor, P. W., Sandberg-Wollheim, M., Thompson, A. J., Weinshenker, B. G., & Wolinsky, J. S. (2005). Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2005

- revisions to the "McDonald Criteria". *Ann Neurol*, 58(6), 840-846.
<https://doi.org/10.1002/ana.20703>
- Pourquie, O., Coltey, M., Thomas, J. L., & Le Douarin, N. M. (1990). A widely distributed antigen developmentally regulated in the nervous system. *Development*, 109(4), 743-752.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2226198>
- Prineas, J. W., & Parratt, J. D. E. (2021). Multiple Sclerosis: Microglia, Monocytes, and Macrophage-Mediated Demyelination. *J Neuropathol Exp Neurol*, 80(10), 975-996.
<https://doi.org/10.1093/jnen/nlab083>
- Qin, Y., Duquette, P., Zhang, Y., Olek, M., Da, R. R., Richardson, J., Antel, J. P., Talbot, P., Cashman, N. R., Tourtellotte, W. W., Wekerle, H., & Van Den Noort, S. (2003). Intrathecal B-cell clonal expansion, an early sign of humoral immunity, in the cerebrospinal fluid of patients with clinically isolated syndrome suggestive of multiple sclerosis. *Lab Invest*, 83(7), 1081-1088.
<https://doi.org/10.1097/01.lab.0000077008.24259.0d>
- Qin, Y., Duquette, P., Zhang, Y., Talbot, P., Poole, R., & Antel, J. (1998). Clonal expansion and somatic hypermutation of V(H) genes of B cells from cerebrospinal fluid in multiple sclerosis. *J Clin Invest*, 102(5), 1045-1050. <https://doi.org/10.1172/JCI3568>
- Ramesh, A., Schubert, R. D., Greenfield, A. L., Dandekar, R., Loudermilk, R., Sabatino, J. J., Jr., Koelzer, M. T., Tran, E. B., Koshal, K., Kim, K., Probstel, A. K., Banerji, D., University of California, S. F. M. S. E. T., Guo, C. Y., Green, A. J., Bove, R. M., DeRisi, J. L., Gelfand, J. M., Cree, B. A. C., Zamvil, S. S., Baranzini, S. E., Hauser, S. L., & Wilson, M. R. (2020). A pathogenic and clonally expanded B cell transcriptome in active multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 117(37), 22932-22943. <https://doi.org/10.1073/pnas.2008523117>
- Ransohoff, R. M., Hafler, D. A., & Lucchinetti, C. F. (2015). Multiple sclerosis-a quiet revolution. *Nat Rev Neurol*, 11(3), 134-142. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2015.14>
- Ransohoff, R. M., Kivisakk, P., & Kidd, G. (2003). Three or more routes for leukocyte migration into the central nervous system. *Nat Rev Immunol*, 3(7), 569-581.
<https://doi.org/10.1038/nri1130>

- Reali, C., Magliozzi, R., Roncaroli, F., Nicholas, R., Howell, O. W., & Reynolds, R. (2020). B cell rich meningeal inflammation associates with increased spinal cord pathology in multiple sclerosis. *Brain Pathol*, 30(4), 779-793. <https://doi.org/10.1111/bpa.12841>
- Reboldi, A., Coisne, C., Baumjohann, D., Benvenuto, F., Bottinelli, D., Lira, S., Uccelli, A., Lanzavecchia, A., Engelhardt, B., & Sallusto, F. (2009). C-C chemokine receptor 6-regulated entry of TH-17 cells into the CNS through the choroid plexus is required for the initiation of EAE. *Nat Immunol*, 10(5), 514-523. <https://doi.org/10.1038/ni.1716>
- Reese, T. S., & Karnovsky, M. J. (1967). Fine structural localization of a blood-brain barrier to exogenous peroxidase. *J Cell Biol*, 34(1), 207-217. <https://doi.org/10.1083/jcb.34.1.207>
- Rodriguez, M., & Lennon, V. A. (1990). Immunoglobulins promote remyelination in the central nervous system. *Ann Neurol*, 27(1), 12-17. <https://doi.org/10.1002/ana.410270104>
- Rojas, O. L., Probstel, A. K., Porfilio, E. A., Wang, A. A., Charabati, M., Sun, T., Lee, D. S. W., Galicia, G., Ramaglia, V., Ward, L. A., Leung, L. Y. T., Najafi, G., Khaleghi, K., Garcillan, B., Li, A., Besla, R., Naouar, I., Cao, E. Y., Chiaranunt, P., Burrows, K., Robinson, H. G., Allanach, J. R., Yam, J., Luck, H., Campbell, D. J., Allman, D., Brooks, D. G., Tomura, M., Baumann, R., Zamvil, S. S., Bar-Or, A., Horwitz, M. S., Winer, D. A., Mortha, A., Mackay, F., Prat, A., Osborne, L. C., Robbins, C., Baranzini, S. E., & Gommerman, J. L. (2019). Recirculating Intestinal IgA-Producing Cells Regulate Neuroinflammation via IL-10. *Cell*, 176(3), 610-624 e618. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.11.035>
- Rolla, S., Bardina, V., De Mercanti, S., Quaglino, P., De Palma, R., Gned, D., Brusa, D., Durelli, L., Novelli, F., & Clerico, M. (2014). Th22 cells are expanded in multiple sclerosis and are resistant to IFN-beta. *J Leukoc Biol*, 96(6), 1155-1164. <https://doi.org/10.1189/jlb.5A0813-463RR>
- Romme Christensen, J., Bornsen, L., Ratzer, R., Piehl, F., Khademi, M., Olsson, T., Sorensen, P. S., & Sellebjerg, F. (2013). Systemic inflammation in progressive multiple sclerosis involves follicular T-helper, Th17- and activated B-cells and correlates with progression. *PLoS One*, 8(3), e57820. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0057820>
- Rosser, E. C., & Mauri, C. (2015). Regulatory B cells: origin, phenotype, and function. *Immunity*, 42(4), 607-612. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.04.005>

- Rothhammer, V., Heink, S., Petermann, F., Srivastava, R., Claussen, M. C., Hemmer, B., & Korn, T. (2011). Th17 lymphocytes traffic to the central nervous system independently of alpha4 integrin expression during EAE. *J Exp Med*, 208(12), 2465-2476. <https://doi.org/10.1084/jem.20110434>
- Rudick, R. A., Stuart, W. H., Calabresi, P. A., Confavreux, C., Galetta, S. L., Radue, E. W., Lublin, F. D., Weinstock-Guttman, B., Wynn, D. R., Lynn, F., Panzara, M. A., Sandrock, A. W., & Investigators, S. (2006). Natalizumab plus interferon beta-1a for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med*, 354(9), 911-923. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa044396>
- Ruocco, G., Rossi, S., Motta, C., Macchiarulo, G., Barbieri, F., De Bardi, M., Borsellino, G., Finardi, A., Grasso, M. G., Ruggieri, S., Gasperini, C., Furlan, R., Centonze, D., Battistini, L., & Volpe, E. (2015). T helper 9 cells induced by plasmacytoid dendritic cells regulate interleukin-17 in multiple sclerosis. *Clin Sci (Lond)*, 129(4), 291-303. <https://doi.org/10.1042/CS20140608>
- Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M., & Toda, M. (1995). Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol*, 155(3), 1151-1164. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7636184>
- Sambucci, M., Gargano, F., Guerrera, G., Battistini, L., & Borsellino, G. (2019). One, No One, and One Hundred Thousand: T Regulatory Cells' Multiple Identities in Neuroimmunity. *Front Immunol*, 10, 2947. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02947>
- Saoudi, A., Simmonds, S., Huitinga, I., & Mason, D. (1995). Prevention of experimental allergic encephalomyelitis in rats by targeting autoantigen to B cells: evidence that the protective mechanism depends on changes in the cytokine response and migratory properties of the autoantigen-specific T cells. *J Exp Med*, 182(2), 335-344. <https://doi.org/10.1084/jem.182.2.335>
- Schlager, C., Korner, H., Krueger, M., Vidoli, S., Haberl, M., Mielke, D., Brylla, E., Issekutz, T., Cabanas, C., Nelson, P. J., Ziemssen, T., Rohde, V., Bechmann, I., Lodygin, D., Odoardi, F., & Flugel, A. (2016). Effector T-cell trafficking between the leptomeninges and the cerebrospinal fluid. *Nature*, 530(7590), 349-353. <https://doi.org/10.1038/nature16939>

- Schluesener, H. J., Sobel, R. A., Linington, C., & Weiner, H. L. (1987). A monoclonal antibody against a myelin oligodendrocyte glycoprotein induces relapses and demyelination in central nervous system autoimmune disease. *J Immunol*, *139*(12), 4016-4021. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3500978>
- Schneider, A., Long, S. A., Cerosaletti, K., Ni, C. T., Samuels, P., Kita, M., & Buckner, J. H. (2013). In active relapsing-remitting multiple sclerosis, effector T cell resistance to adaptive T(regs) involves IL-6-mediated signaling. *Sci Transl Med*, *5*(170), 170ra115. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3004970>
- Schneider-Hohendorf, T., Rossaint, J., Mohan, H., Boning, D., Breuer, J., Kuhlmann, T., Gross, C. C., Flanagan, K., Sorokin, L., Vestweber, D., Zarbock, A., Schwab, N., & Wiendl, H. (2014). VLA-4 blockade promotes differential routes into human CNS involving PSGL-1 rolling of T cells and MCAM-adhesion of TH17 cells. *J Exp Med*, *211*(9), 1833-1846. <https://doi.org/10.1084/jem.20140540>
- Schultz, V., van der Meer, F., Wrzos, C., Scheidt, U., Bahn, E., Stadelmann, C., Bruck, W., & Junker, A. (2017). Acutely damaged axons are remyelinated in multiple sclerosis and experimental models of demyelination. *Glia*, *65*(8), 1350-1360. <https://doi.org/10.1002/glia.23167>
- Segal, B. M., & Shevach, E. M. (1996). IL-12 unmasks latent autoimmune disease in resistant mice. *J Exp Med*, *184*(2), 771-775. <https://doi.org/10.1084/jem.184.2.771>
- Serafini, B., Rosicarelli, B., Magliozzi, R., Stigliano, E., & Aloisi, F. (2004). Detection of ectopic B-cell follicles with germinal centers in the meninges of patients with secondary progressive multiple sclerosis. *Brain Pathol*, *14*(2), 164-174. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.2004.tb00049.x>
- Serafini, B., Severa, M., Columba-Cabezas, S., Rosicarelli, B., Veroni, C., Chiappetta, G., Magliozzi, R., Reynolds, R., Coccia, E. M., & Aloisi, F. (2010). Epstein-Barr virus latent infection and BAFF expression in B cells in the multiple sclerosis brain: implications for viral persistence and intrathecal B-cell activation. *J Neuropathol Exp Neurol*, *69*(7), 677-693. <https://doi.org/10.1097/NEN.0b013e3181e332ec>
- Sergott, R. C., Bennett, J. L., Rieckmann, P., Montalban, X., Mikol, D., Freudensprung, U., Plitz, T., van Beek, J., & Group, A. T. (2015). ATON: results from a Phase II randomized trial of the

- B-cell-targeting agent atacept in patients with optic neuritis. *J Neurol Sci*, 351(1-2), 174-178. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2015.02.019>
- Sharief, M. K., & Thompson, E. J. (1991). Intrathecal immunoglobulin M synthesis in multiple sclerosis. Relationship with clinical and cerebrospinal fluid parameters. *Brain*, 114 (Pt 1A), 181-195. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1998881>
- Sims, D. E. (1986). The pericyte--a review. *Tissue Cell*, 18(2), 153-174. [https://doi.org/10.1016/0040-8166\(86\)90026-1](https://doi.org/10.1016/0040-8166(86)90026-1)
- Skulina, C., Schmidt, S., Dornmair, K., Babbe, H., Roers, A., Rajewsky, K., Wekerle, H., Hohlfeld, R., & Goebels, N. (2004). Multiple sclerosis: brain-infiltrating CD8+ T cells persist as clonal expansions in the cerebrospinal fluid and blood. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(8), 2428-2433. <https://doi.org/10.1073/pnas.0308689100>
- Slifka, M. K., Rodriguez, F., & Whitton, J. L. (1999). Rapid on/off cycling of cytokine production by virus-specific CD8+ T cells. *Nature*, 401(6748), 76-79. <https://doi.org/10.1038/43454>
- Sorensen, P. S., Lisby, S., Grove, R., Derosier, F., Shackelford, S., Havrdova, E., Drulovic, J., & Filippi, M. (2014). Safety and efficacy of ofatumumab in relapsing-remitting multiple sclerosis: a phase 2 study. *Neurology*, 82(7), 573-581. <https://doi.org/10.1212/WNL.000000000000125>
- Sospedra, M., & Martin, R. (2005). Immunology of multiple sclerosis. *Annu Rev Immunol*, 23, 683-747. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.23.021704.115707>
- Soto, M. S., Serres, S., Anthony, D. C., & Sibson, N. R. (2014). Functional role of endothelial adhesion molecules in the early stages of brain metastasis. *Neuro Oncol*, 16(4), 540-551. <https://doi.org/10.1093/neuonc/not222>
- Spath, S., Komuczki, J., Hermann, M., Pelczar, P., Mair, F., Schreiner, B., & Becher, B. (2017). Dysregulation of the Cytokine GM-CSF Induces Spontaneous Phagocyte Invasion and Immunopathology in the Central Nervous System. *Immunity*, 46(2), 245-260. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.01.007>
- Spencer, C. M., Crabtree-Hartman, E. C., Lehmann-Horn, K., Cree, B. A., & Zamvil, S. S. (2015). Reduction of CD8(+) T lymphocytes in multiple sclerosis patients treated with dimethyl

- fumarate. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*, 2(3), e76. <https://doi.org/10.1212/NXI.000000000000076>
- Sriwastava, S., Kataria, S., Srivastava, S., Kazemlou, S., Gao, S., Wen, S., Saber, H., Tripathi, R., Sheikh, Z., Peterson, S., Gwinn, R., & Bernitsas, E. (2021). Disease-modifying therapies and progressive multifocal leukoencephalopathy in multiple sclerosis: A systematic review and meta-analysis. *J Neuroimmunol*, 360, 577721. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2021.577721>
- Stark, K., Eckart, A., Haidari, S., Tirniceriu, A., Lorenz, M., von Bruhl, M. L., Gartner, F., Khandoga, A. G., Legate, K. R., Pless, R., Hepper, I., Lauber, K., Walzog, B., & Massberg, S. (2013). Capillary and arteriolar pericytes attract innate leukocytes exiting through venules and 'instruct' them with pattern-recognition and motility programs. *Nat Immunol*, 14(1), 41-51. <https://doi.org/10.1038/ni.2477>
- Stern, J. N., Yaari, G., Vander Heiden, J. A., Church, G., Donahue, W. F., Hintzen, R. Q., Huttner, A. J., Laman, J. D., Nagra, R. M., Nylander, A., Pitt, D., Ramanan, S., Siddiqui, B. A., Vigneault, F., Kleinstein, S. H., Hafler, D. A., & O'Connor, K. C. (2014). B cells populating the multiple sclerosis brain mature in the draining cervical lymph nodes. *Sci Transl Med*, 6(248), 248ra107. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3008879>
- Stromnes, I. M., Cerretti, L. M., Liggitt, D., Harris, R. A., & Goverman, J. M. (2008). Differential regulation of central nervous system autoimmunity by T(H)1 and T(H)17 cells. *Nat Med*, 14(3), 337-342. <https://doi.org/10.1038/nm1715>
- Stromnes, I. M., & Goverman, J. M. (2006). Passive induction of experimental allergic encephalomyelitis. *Nat Protoc*, 1(4), 1952-1960. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.284>
- Sul, J., Patel, A., Gordon, M. L., Steinklein, J., Sanguinetti, S., Pramanik, B., Orban, Z., Koralnik, I., & Harel, A. (2020). Progressive Multifocal Leukoencephalopathy in a Patient on Ocrelizumab Monotherapy. *Neurology*, 94(15). <Go to ISI>://WOS:000536058008137
- Sun, D., Whitaker, J. N., Huang, Z., Liu, D., Coleclough, C., Wekerle, H., & Raine, C. S. (2001). Myelin antigen-specific CD8+ T cells are encephalitogenic and produce severe disease in C57BL/6 mice. *J Immunol*, 166(12), 7579-7587. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.166.12.7579>

- Swart, G. W. (2002). Activated leukocyte cell adhesion molecule (CD166/ALCAM): developmental and mechanistic aspects of cell clustering and cell migration. *Eur J Cell Biol*, 81(6), 313-321. <https://doi.org/10.1078/0171-9335-00256>
- Tahani, S., Dehghani, L., Jahanbani-Ardakani, H., Shaygannejad, V., Fazli, A., Hamidavi, A., & Eskandari, N. (2019). Elevated serum level of IL-4 in neuromyelitis optica and multiple sclerosis patients. *J Immunoassay Immunochem*, 40(5), 555-563. <https://doi.org/10.1080/15321819.2019.1655649>
- Tao-Cheng, J. H., Nagy, Z., & Brightman, M. W. (1987). Tight junctions of brain endothelium in vitro are enhanced by astroglia. *J Neurosci*, 7(10), 3293-3299. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3668629>
- Te Riet, J., Zimmerman, A. W., Cambi, A., Joosten, B., Speller, S., Torensma, R., van Leeuwen, F. N., Figdor, C. G., & de Lange, F. (2007). Distinct kinetic and mechanical properties govern ALCAM-mediated interactions as shown by single-molecule force spectroscopy. *J Cell Sci*, 120(Pt 22), 3965-3976. <https://doi.org/10.1242/jcs.004010>
- Teitelbaum, D., Meshorer, A., Hirshfeld, T., Arnon, R., & Sela, M. (1971). Suppression of experimental allergic encephalomyelitis by a synthetic polypeptide. *Eur J Immunol*, 1(4), 242-248. <https://doi.org/10.1002/eji.1830010406>
- Thompson, A. J., Banwell, B. L., Barkhof, F., Carroll, W. M., Coetzee, T., Comi, G., Correale, J., Fazekas, F., Filippi, M., Freedman, M. S., Fujihara, K., Galetta, S. L., Hartung, H. P., Kappos, L., Lublin, F. D., Marrie, R. A., Miller, A. E., Miller, D. H., Montalban, X., Mowry, E. M., Sorensen, P. S., Tintore, M., Traboulsee, A. L., Trojano, M., Uitdehaag, B. M. J., Vukusic, S., Waubant, E., Weinshenker, B. G., Reingold, S. C., & Cohen, J. A. (2018). Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. *Lancet Neurology*, 17(2), 162-173. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(17\)30470-2](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(17)30470-2)
- Tobin, W. O., Kalinowska-Lyszczarz, A., Weigand, S. D., Guo, Y., Tosakulwong, N., Parisi, J. E., Metz, I., Frischer, J. M., Lassmann, H., Bruck, W., Linbo, L., & Lucchinetti, C. F. (2021). Clinical Correlation of Multiple Sclerosis Immunopathologic Subtypes. *Neurology*, 97(19), e1906-e1913. <https://doi.org/10.1212/WNL.00000000000012782>

- Traub, J. W., Pellkofer, H. L., Grondey, K., Seeger, I., Rowold, C., Bruck, W., Hussein, L., Hausser-Kinzel, S., & Weber, M. S. (2019). Natalizumab promotes activation and pro-inflammatory differentiation of peripheral B cells in multiple sclerosis patients. *J Neuroinflammation*, *16*(1), 228. <https://doi.org/10.1186/s12974-019-1593-2>
- Trifari, S., Kaplan, C. D., Tran, E. H., Crellin, N. K., & Spits, H. (2009). Identification of a human helper T cell population that has abundant production of interleukin 22 and is distinct from T(H)-17, T(H)1 and T(H)2 cells. *Nat Immunol*, *10*(8), 864-871. <https://doi.org/10.1038/ni.1770>
- Tudor, C., te Riet, J., Eich, C., Harkes, R., Smisdom, N., Bouhuijzen Wenger, J., Ameloot, M., Holt, M., Kanger, J. S., Figdor, C. G., Cambi, A., & Subramaniam, V. (2014). Syntenin-1 and ezrin proteins link activated leukocyte cell adhesion molecule to the actin cytoskeleton. *J Biol Chem*, *289*(19), 13445-13460. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.546754>
- Tuohy, O., Costelloe, L., Hill-Cawthorne, G., Bjornson, I., Harding, K., Robertson, N., May, K., Button, T., Azzopardi, L., Kousin-Ezewu, O., Fahey, M. T., Jones, J., Compston, D. A., & Coles, A. (2015). Alemtuzumab treatment of multiple sclerosis: long-term safety and efficacy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, *86*(2), 208-215. <https://doi.org/10.1136/jnnp-2014-307721>
- Tzartos, J. S., Friese, M. A., Craner, M. J., Palace, J., Newcombe, J., Esiri, M. M., & Fugger, L. (2008). Interleukin-17 production in central nervous system-infiltrating T cells and glial cells is associated with active disease in multiple sclerosis. *Am J Pathol*, *172*(1), 146-155. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2008.070690>
- Udalova, I., Monaco, C., Nanchahal, J., & Feldmann, M. (2016). Anti-TNF Therapy. *Microbiol Spectr*, *4*(4). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.MCHD-0022-2015>
- Ujiie, M., Dickstein, D. L., Carlow, D. A., & Jefferies, W. A. (2003). Blood-brain barrier permeability precedes senile plaque formation in an Alzheimer disease model. *Microcirculation*, *10*(6), 463-470. <https://doi.org/10.1038/sj.mn.7800212>
- van de Haar, H. J., Burgmans, S., Jansen, J. F., van Osch, M. J., van Buchem, M. A., Muller, M., Hofman, P. A., Verhey, F. R., & Backes, W. H. (2017). Blood-Brain Barrier Leakage in

- Patients with Early Alzheimer Disease. *Radiology*, 282(2), 615.
<https://doi.org/10.1148/radiol.2017164043>
- van Kempen, L. C., Nelissen, J. M., Degen, W. G., Torensma, R., Weidle, U. H., Bloemers, H. P., Figdor, C. G., & Swart, G. W. (2001). Molecular basis for the homophilic activated leukocyte cell adhesion molecule (ALCAM)-ALCAM interaction. *J Biol Chem*, 276(28), 25783-25790. <https://doi.org/10.1074/jbc.M011272200>
- van Langelaar, J., van der Vuurst de Vries, R. M., Janssen, M., Wierenga-Wolf, A. F., Spilt, I. M., Siepmann, T. A., Dankers, W., Verjans, G., de Vries, H. E., Lubberts, E., Hintzen, R. Q., & van Luijn, M. M. (2018). T helper 17.1 cells associate with multiple sclerosis disease activity: perspectives for early intervention. *Brain*, 141(5), 1334-1349.
<https://doi.org/10.1093/brain/awy069>
- van Nierop, G. P., van Luijn, M. M., Michels, S. S., Melief, M. J., Janssen, M., Langerak, A. W., Ouwendijk, W. J. D., Hintzen, R. Q., & Verjans, G. (2017). Phenotypic and functional characterization of T cells in white matter lesions of multiple sclerosis patients. *Acta Neuropathol*, 134(3), 383-401. <https://doi.org/10.1007/s00401-017-1744-4>
- Vercellino, M., Votta, B., Condello, C., Piacentino, C., Romagnolo, A., Merola, A., Capello, E., Mancardi, G. L., Mutani, R., Giordana, M. T., & Cavalla, P. (2008). Involvement of the choroid plexus in multiple sclerosis autoimmune inflammation: a neuropathological study. *J Neuroimmunol*, 199(1-2), 133-141. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2008.04.035>
- Villar, L. M., Garcia-Sanchez, M. I., Costa-Frossard, L., Espino, M., Roldan, E., Paramo, D., Lucas, M., Izquierdo, G., & Alvarez-Cermeno, J. C. (2012). Immunological markers of optimal response to natalizumab in multiple sclerosis. *Arch Neurol*, 69(2), 191-197.
<https://doi.org/10.1001/archneurol.2011.971>
- Vogel, D. Y., Kooij, G., Heijnen, P. D., Breur, M., Peferoen, L. A., van der Valk, P., de Vries, H. E., Amor, S., & Dijkstra, C. D. (2015). GM-CSF promotes migration of human monocytes across the blood brain barrier. *Eur J Immunol*, 45(6), 1808-1819.
<https://doi.org/10.1002/eji.201444960>

- Voisin, M. B., & Nourshargh, S. (2013). Neutrophil transmigration: emergence of an adhesive cascade within venular walls. *J Innate Immun*, 5(4), 336-347. <https://doi.org/10.1159/000346659>
- von Lersner, A., Drosen, L., & Zijlstra, A. (2019). Modulation of cell adhesion and migration through regulation of the immunoglobulin superfamily member ALCAM/CD166. *Clin Exp Metastasis*, 36(2), 87-95. <https://doi.org/10.1007/s10585-019-09957-2>
- Voskuhl, R. R., Martin, R., Bergman, C., Dalal, M., Ruddle, N. H., & McFarland, H. F. (1993). T helper 1 (Th1) functional phenotype of human myelin basic protein-specific T lymphocytes. *Autoimmunity*, 15(2), 137-143. <https://doi.org/10.3109/08916939309043888>
- Vukusic, S., Rollot, F., Casey, R., Pique, J., Marignier, R., Mathey, G., Edan, G., Brassat, D., Ruet, A., De Seze, J., Maillart, E., Zephir, H., Labauge, P., Derache, N., Lebrun-Frenay, C., Moreau, T., Wiertlewski, S., Berger, E., Moisset, X., Rico-Lamy, A., Stankoff, B., Bensa, C., Thouvenot, E., Heinzlef, O., Al-Khedr, A., Bourre, B., Vaillant, M., Cabre, P., Montcuquet, A., Wahab, A., Camdessanche, J. P., Tourbah, A., Guennoc, A. M., Hankiewicz, K., Patry, I., Nifle, C., Maubeuge, N., Labeyrie, C., Vermersch, P., Laplaud, D. A., & Investigators, O. (2020). Progressive Multifocal Leukoencephalopathy Incidence and Risk Stratification Among Natalizumab Users in France. *JAMA Neurol*, 77(1), 94-102. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2019.2670>
- Wagner, M., Bilinska, M., Pokryszko-Dragan, A., Sobczynski, M., Cyrul, M., Kusnierczyk, P., & Jasek, M. (2014). ALCAM and CD6--multiple sclerosis risk factors. *J Neuroimmunol*, 276(1-2), 98-103. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2014.08.621>
- Wagner, M., Wisniewski, A., Bilinska, M., Pokryszko-Dragan, A., Nowak, I., Kusnierczyk, P., & Jasek, M. (2013). ALCAM--novel multiple sclerosis locus interfering with HLA-DRB1*1501. *J Neuroimmunol*, 258(1-2), 71-76. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2013.02.015>
- Walsh, M. J., & Tourtellotte, W. W. (1986). Temporal invariance and clonal uniformity of brain and cerebrospinal IgG, IgA, and IgM in multiple sclerosis. *J Exp Med*, 163(1), 41-53. <https://doi.org/10.1084/jem.163.1.41>
- Walton, C., King, R., Rechtman, L., Kaye, W., Leray, E., Marrie, R. A., Robertson, N., La Rocca, N., Uitdehaag, B., van der Mei, I., Wallin, M., Helme, A., Angood Napier, C., Rijke, N., &

- Baneke, P. (2020). Rising prevalence of multiple sclerosis worldwide: Insights from the Atlas of MS, third edition. *Mult Scler*, 26(14), 1816-1821. <https://doi.org/10.1177/1352458520970841>
- Warnke, C., Stettner, M., Lehmensiek, V., Dehmel, T., Mausberg, A. K., von Geldern, G., Gold, R., Kumpfel, T., Hohlfeld, R., Maurer, M., Stangel, M., Straeten, V., Limmroth, V., Weber, T., Kleinschnitz, C., Wattjes, M. P., Svenningsson, A., Olsson, T., Hartung, H. P., Hermsen, D., Tumani, H., Adams, O., & Kieseier, B. C. (2015). Natalizumab exerts a suppressive effect on surrogates of B cell function in blood and CSF. *Mult Scler*, 21(8), 1036-1044. <https://doi.org/10.1177/1352458514556296>
- Weidle, U. H., Eggle, D., Klostermann, S., & Swart, G. W. (2010). ALCAM/CD166: cancer-related issues. *Cancer Genomics Proteomics*, 7(5), 231-243. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20952758>
- Weiss, N., Miller, F., Cazaubon, S., & Couraud, P. O. (2009). The blood-brain barrier in brain homeostasis and neurological diseases. *Biochim Biophys Acta*, 1788(4), 842-857. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2008.10.022>
- Westergaard, E., & Brightman, M. W. (1973). Transport of proteins across normal cerebral arterioles. *J Comp Neurol*, 152(1), 17-44. <https://doi.org/10.1002/cne.901520103>
- Wierzba-Bobrowicz, T., Krajewski, P., Tarka, S., Acewicz, A., Felczak, P., Stepien, T., M, P. G., & Grzegorzczak, M. (2021). Neuropathological analysis of the brains of fifty-two patients with COVID-19. *Folia Neuropathol*, 59(3), 219-231. <https://doi.org/10.5114/fn.2021.108829>
- Wilson, E. H., Weninger, W., & Hunter, C. A. (2010). Trafficking of immune cells in the central nervous system. *J Clin Invest*, 120(5), 1368-1379. <https://doi.org/10.1172/JCI41911>
- Winkler, E. A., Bell, R. D., & Zlokovic, B. V. (2010). Pericyte-specific expression of PDGF beta receptor in mouse models with normal and deficient PDGF beta receptor signaling. *Mol Neurodegener*, 5, 32. <https://doi.org/10.1186/1750-1326-5-32>
- Wolburg, H., Wolburg-Buchholz, K., & Engelhardt, B. (2005). Diapedesis of mononuclear cells across cerebral venules during experimental autoimmune encephalomyelitis leaves tight junctions intact. *Acta Neuropathol*, 109(2), 181-190. <https://doi.org/10.1007/s00401-004-0928-x>

- Wong, D., & Dorovini-Zis, K. (1995). Expression of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) by human brain microvessel endothelial cells in primary culture. *Microvasc Res*, 49(3), 325-339. <https://doi.org/10.1006/mvre.1995.1028>
- Wu, Q., Wang, Q., Mao, G., Dowling, C. A., Lundy, S. K., & Mao-Draayer, Y. (2017). Dimethyl Fumarate Selectively Reduces Memory T Cells and Shifts the Balance between Th1/Th17 and Th2 in Multiple Sclerosis Patients. *J Immunol*, 198(8), 3069-3080. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1601532>
- Xu, W., Li, R., Dai, Y., Wu, A., Wang, H., Cheng, C., Qiu, W., Lu, Z., Zhong, X., Shu, Y., Kermode, A. G., & Hu, X. (2013). IL-22 secreting CD4+ T cells in the patients with neuromyelitis optica and multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*, 261(1-2), 87-91. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2013.04.021>
- Yadav, S. K., Soin, D., Ito, K., & Dhib-Jalbut, S. (2019). Insight into the mechanism of action of dimethyl fumarate in multiple sclerosis. *J Mol Med (Berl)*, 97(4), 463-472. <https://doi.org/10.1007/s00109-019-01761-5>
- Yamazaki, Y., & Kanekiyo, T. (2017). Blood-Brain Barrier Dysfunction and the Pathogenesis of Alzheimer's Disease. *Int J Mol Sci*, 18(9). <https://doi.org/10.3390/ijms18091965>
- Yang, Y., & Rosenberg, G. A. (2011). Blood-brain barrier breakdown in acute and chronic cerebrovascular disease. *Stroke*, 42(11), 3323-3328. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.110.608257>
- Yednock, T. A., Cannon, C., Fritz, L. C., Sanchez-Madrid, F., Steinman, L., & Karin, N. (1992). Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis by antibodies against alpha 4 beta 1 integrin. *Nature*, 356(6364), 63-66. <https://doi.org/10.1038/356063a0>
- Yonezawa, T., Ohtsuka, A., Yoshitaka, T., Hirano, S., Nomoto, H., Yamamoto, K., & Ninomiya, Y. (2003). Limitrin, a novel immunoglobulin superfamily protein localized to glia limitans formed by astrocyte endfeet. *Glia*, 44(3), 190-204. <https://doi.org/10.1002/glia.10279>
- Zandee, S. E. J., O'Connor, R. A., Mair, I., Leech, M. D., Williams, A., & Anderton, S. M. (2017). IL-10-producing, ST2-expressing Foxp3(+) T cells in multiple sclerosis brain lesions. *Immunol Cell Biol*, 95(5), 484-490. <https://doi.org/10.1038/icb.2017.3>

- Zang, Y. C., Li, S., Rivera, V. M., Hong, J., Robinson, R. R., Breitbart, W. T., Killian, J., & Zhang, J. Z. (2004). Increased CD8+ cytotoxic T cell responses to myelin basic protein in multiple sclerosis. *J Immunol*, *172*(8), 5120-5127. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.8.5120>
- Zhang, X., Tao, Y., Chopra, M., Dujmovic-Basuroski, I., Jin, J., Tang, Y., Drulovic, J., & Markovic-Plese, S. (2015). IL-11 Induces Th17 Cell Responses in Patients with Early Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis. *J Immunol*, *194*(11), 5139-5149. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1401680>
- Zhen, J., Yuan, J., Fu, Y., Zhu, R., Wang, M., Chang, H., Zhao, Y., Wang, D., & Lu, Z. (2017). IL-22 promotes Fas expression in oligodendrocytes and inhibits FOXP3 expression in T cells by activating the NF-kappaB pathway in multiple sclerosis. *Mol Immunol*, *82*, 84-93. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2016.12.020>
- Zhou, L., Ivanov, I., Spolski, R., Min, R., Shenderov, K., Egawa, T., Levy, D. E., Leonard, W. J., & Littman, D. R. (2007). IL-6 programs T(H)-17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways. *Nat Immunol*, *8*(9), 967-974. <https://doi.org/10.1038/ni1488>
- Zhou, Y., Zhang, Y., Han, J., Yang, M., Zhu, J., & Jin, T. (2020). Transitional B cells involved in autoimmunity and their impact on neuroimmunological diseases. *J Transl Med*, *18*(1), 131. <https://doi.org/10.1186/s12967-020-02289-w>
- Zimmerman, A. W., Joosten, B., Torensma, R., Parnes, J. R., van Leeuwen, F. N., & Figdor, C. G. (2006). Long-term engagement of CD6 and ALCAM is essential for T-cell proliferation induced by dendritic cells. *Blood*, *107*(8), 3212-3220. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-09-3881>
- Zimmerman, A. W., Nelissen, J. M., van Emst-de Vries, S. E., Willems, P. H., de Lange, F., Collard, J. G., van Leeuwen, F. N., & Figdor, C. G. (2004). Cytoskeletal restraints regulate homotypic ALCAM-mediated adhesion through PKCalpha independently of Rho-like GTPases. *J Cell Sci*, *117*(Pt 13), 2841-2852. <https://doi.org/10.1242/jcs.01139>
- Zlokovic, B. V. (2008). The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders. *Neuron*, *57*(2), 178-201. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.01.003>