

Université de Montréal

Rôle de la Galectin-3 extra cellulaire dans la migration
des cellules B à travers les barrières du système
nerveux central dans le contexte de la sclérose en
plaques

Par Paula Lépine

Département de Neurosciences
Faculté de Médecine

Mémoire présenté
En vue de l'obtention du grade de Maître ès Sciences (M.Sc)

Décembre 2017

©Paula Lépine

Résumé

La sclérose en plaques (SEP) est une maladie inflammatoire chronique du système nerveux central caractérisée par l'infiltration de cellules immunitaires et par la présence de lésions démyélinisantes dans le système nerveux central (SNC) des patients. Un événement clef dans la maladie est la perte d'intégrité des barrières protégeant le système nerveux central (SNC) qui permet la migration des cellules immunitaires, dont les cellules B, vers celui-ci depuis le sang. La migration est contrôlée par différents paramètres dont l'expression de molécules favorisant l'adhésion aux cellules endothéliales constituant les barrières du SNC. Des données protéomiques générées par notre laboratoire nous ont permis d'identifier la galectin-3, une protéine pro-inflammatoire, comme étant potentiellement impliquée dans la migration des cellules B vers le SNC et pouvant influencer leur pathogénicité. Les résultats de ce mémoire montrent que chez les donneurs sains la galectin-3 est exprimée à la surface par les cellules B du sang total ainsi que par les cellules B effectrices *in vitro*. Elle est également présente dans le surnageant de ces dernières. De plus, les cellules galectin-3⁺ expriment davantage de cytokines pro-inflammatoires que les cellules galectin-3⁻ *in vitro*. Cependant, la stimulation des cellules B effectrices en présence de galectin-3 exogène induit une diminution temporaire de l'expression de l'IL-6 et de l'IFN- γ . D'autre part, nous avons démontré que la galectin-3 exogène peut se lier à la surface des cellules B toutefois elle n'influence pas leur migration à travers les modèles *in vitro* des barrières du SNC. Nous avons par la suite mis en évidence que la galectin-3 était présente dans le liquide céphalo-rachidien des patients SEP. De plus la concentration en galectin-3 dans le sérum de ces derniers est plus élevée que celle des donneurs sains. Enfin nous avons démontré que les cellules B des patients SEP exprimaient davantage de galectin-3 à la surface que celles des donneurs sains. Pour conclure, les données ne permettent pas de supporter l'hypothèse selon laquelle la galectin-3 favorise la migration à travers les barrières du SNC. De plus, l'influence de la galectin-3 sur la pathogénicité des cellules B *in vitro* semble dépendre de sa concentration dans

le milieu. Mais l'augmentation de son expression chez les patients suggère une implication dans la SEP.

Mots-clefs : sclérose en plaques, système nerveux central, barrières du système nerveux central, migration, cellules B, galectin-3

Abstract

Multiple sclerosis (MS) is a chronic inflammatory disease of the central nervous system (CNS), hallmarks of the disease are an important infiltration of immune cells and demyelinating lesions in the CNS of patients. A key event in the disease is CNS barriers' loss of integrity that allows the migration of immune cells, including B cells, from the blood to the CNS. Migration is regulated by many parameters, among which, the expression of molecules enabling adhesion to the endothelial cells of the CNS barriers. Proteomic data from our lab identified galectin-3, a pro-inflammatory protein, as potentially involved in B cells' migration toward the CNS. Moreover, galectin-3 could add to B cells pathogenicity. Our results show that healthy donors' whole blood B cells as well as effector B cells *in vitro* express galectin-3 on their surface. Moreover, effector B cells are able to secrete galectin-3. *In vitro* assay revealed that galectin-3⁺ effector B cells express more pro-inflammatory cytokines than galectin-3⁻ effector B cells. However, a temporary decrease of IL-6 and IFN- γ expression is induced when effector B cells are treated with galectin-3. Furthermore, exogenous galectin-3 can bind to B cells' surface but it doesn't influence their migration through *in vitro* models of the SNC barriers. In addition, we could detect galectin-3 in MS patients' cerebrospinal fluid (CSF) and serum, the latter showed increased concentration compared to healthy donors'. Moreover, we evidence that MS patients' B cells express more galectin-3 on the cell surface than healthy donors'. In conclusion, our results don't support the initial hypothesis that galectin-3 enables B cells' migration through CNS barriers and galectin-3's influence on B cells pathogenicity *in vitro* seems to depend on its concentration. But galectin-3's increased expression in MS patients suggests that it could be implicated in the disease.

Keywords: multiple sclerosis, central nervous system, central nervous system barriers, migration, B cells, galectin-3

Table des matières

Résumé	i
Abstract	iii
Tables des matières	iv
Liste des sigles et abréviations	ix
Liste des figures	xiii
Liste des tableaux	xv
Remerciements	xvi
1 Introduction	1
1.1 La Sclérose en plaques	1
1.1.1 Généralités	1
1.1.1.1 Pathologie.....	1
1.1.1.2 Histopathologie.....	2
1.1.1.3 Épidémiologie et facteurs de risques.....	3
1.1.2 La Sclérose en plaques, une maladie longtemps décrite comme principalement médiée par les cellules T CD4 <i>helper 1</i>	4
1.1.3 Preuves de l'implication des cellules B dans la sclérose en plaques	7
1.1.3.1 Bandes oligoclonales et auto-anticorps chez les patients SEP	7
1.1.3.2 Des cellules B présentes dans le LCR et les lésions des patients SEP	8
1.1.3.3 Des cellules B présentes dans les méninges	8
1.1.3.4 Des cellules B avec un profil pro-inflammatoire	9
1.1.4 Traitements pour la SEP.....	10
1.1.4.1 Anticorps monoclonaux dirigés contre CD20	10
1.1.4.2 Effets des principaux traitements sur les cellules B	11
1.1.4.2.1 Interféron Bêta.....	11
1.1.4.2.2 Glatiramer Acetate	11
1.1.4.2.3 Fingolimod	12
1.1.4.2.4 Natalizumab	12
1.1.4.2.5 Alemtuzumab	13

1.1.4.2.6	Mitoxantrone.....	13
1.2	Les cellules B	14
1.2.1	Le développement des cellules B	14
1.2.2	Activation des cellules B	14
1.2.3	La réaction du centre germinatif	15
1.2.4	Les populations de cellules B circulantes en périphérie	16
1.2.5	Fonctions effectrices des cellules B.....	17
1.2.5.1	Production d'anticorps	17
1.2.5.2	Production de cytokines	17
1.2.5.2.1	Cytokines anti-inflammatoires	18
1.2.5.2.1.1	IL-10.....	18
1.2.5.2.1.2	IL35.....	18
1.2.5.2.2	Cytokines pro-inflammatoires	19
1.2.5.2.2.1	TNF- α et LT- α	19
1.2.5.2.2.2	IL-6.....	19
1.2.5.2.2.3	GM-CSF	20
1.2.5.2.2.4	IFN- γ	20
1.2.5.3	Présentation d'antigène	21
1.3	Les barrières du SNC	22
1.3.1	Structure	22
1.3.1.1	Barrière hémato encéphalique	22
1.3.1.1.1	Cellules endothéliales	23
1.3.1.1.2	Jonctions serrées	23
1.3.1.1.3	Jonctions adhérentes	24
1.3.1.1.4	Membranes basales	24
1.3.1.1.5	Astrocytes.....	25
1.3.1.1.6	Péricytes.....	25
1.3.1.2	Barrière hématoméningée	26
1.3.1.3	Barrière sang-LCR.....	27
1.3.2	Perte de l'intégrité des barrières du SNC dans la SEP	28

1.3.2.1	Molécules impliquées dans la migration des cellules B à travers les barrières du SNC	31
1.3.2.1.1	VLA-4	31
1.3.2.1.2	ICAM-1	32
1.3.2.1.3	ALCAM	32
1.3.3	Comparaison de l'expression protéique des cellules B ALCAM ⁺ et ALCAM ⁻	32
1.4	Galectin-3.....	33
1.4.1	Structure	33
1.4.1.1	Domaine C-terminal.....	34
1.4.1.2	Domaine N-terminal.....	34
1.4.2	Classification.....	35
1.4.3	Ligands de la Galectin-3	35
1.4.4	Localisation de la Galectin-3.....	36
1.4.5	Rôle de la galectin-3 dans l'adhésion et la migration cellulaire	39
1.4.6	Influence de la galectin-3 sur la réponse immunitaire	41
1.4.6.1	Immunité innée	41
1.4.6.2	Immunité adaptative	41
1.4.7	Rôles de la galectin-3 dans la neuroinflammation	42
1.4.8	Rôles de la galectin-3 dans l'auto-immunité, l'EAE et la SEP	43
1.4.8.1	EAE.....	43
1.4.8.2	SEP.....	44
1.5	Hypothèse et objectifs.....	46
2	Matériel et Méthode.....	47
2.1	Isolation de cellules immunitaires à partir du sang périphérique.....	47
2.2	Isolation des cellules B à partir des cellules immunitaires	47
2.2.1	Isolation des cellules B pour stimulation in vitro	47
2.2.2	Isolation des cellules B pour test de migration in vitro	48
2.3	Mesure de la capacité d'adhésion de la galectin-3 exogène à la surface des cellules B.....	49

2.4	Stimulation des cellules B.....	49
2.5	Culture primaire de cellules endothéliales de la barrière hémato encéphalique et de la barrière hémato méningée	50
2.6	Récolte des cellules endothéliales de la BHE ou de la BHM	50
2.7	Migration des cellules B à travers les cellules endothéliales de la BHE ou de la BHM	50
2.8	Immunomarquage	52
2.8.1	Échantillons de sang total.....	52
2.8.2	Cellules mononuclées du sang périphérique et cellules B	52
2.9	ELISA.....	55
2.9.1	Échantillons de LCR	55
2.9.2	Échantillons de sérum	56
2.10	Classification des patients.....	56
2.11	Analyses statistiques	56
3	Résultats	59
3.1	La galectin-3 est absente de la surface des cellules B après l'isolation par gradient de Ficoll™	59
3.2	La galectin-3 est présente à la surface des cellules B dans le sang total 59	
3.2.1	Fréquence des cellules B CD19 ⁺ galectin-3 ⁺	59
3.2.2	Expression de la galectin-3 par les différents sous-types de cellules B	63
3.3	Les cellules B stimulées sont capables de produire la galectin-3 <i>in vitro</i> 68	
3.4	La galectin-3 est présente à la surface des cellules B activées <i>in vitro</i>	71
3.5	Influence de la galectin-3 sur l'expression de cytokines par les cellules B <i>in vitro</i>	79
3.6	Influence de la galectin-3 sur la migration des cellules B <i>in vitro</i>	83
3.6.1	Les cellules B <i>ex vivo</i> sont capables de lier la galectin-3 exogène présente dans le milieu extracellulaire	83
3.6.2	Tests de migration	83

3.7	Expression de la galectin-3 chez les patients SEP.....	91
3.7.1	Expression de la galectin-3 dans le sérum et le LCR des patients SEP 91	
3.7.2	Les cellules B galectin-3 ⁺ sont plus fréquentes chez les patients SEP que chez les donneurs sains.....	92
3.7.3	Expression de la galectin-3 par les cellules B CD19 ⁺ activées.....	103
3.7.4	Expression de la galectin-3 par les différents sous-types de cellules B chez les patients SEP	104
3.7.5	Comparaison de l'expression de la galectin-3 par les différents sous- types de cellules B CD19 ⁺ entre les patients SEP et les donneurs sains	105
4	Discussion	106
4.1	Conclusion.....	117
5	Annexe	118
6	Bibliographies	119

Liste des sigles et abréviations

Ala: Alanine

APC : « Antigen presenting cell », cellule présentatrice d'antigène

Arg: Arginine

ARNm : Acide ribonucléique messager

ARSACS : Ataxie récessive spastique autosomique de Charlevoix-Saguenay

Asp: Aspartate

BAFF: « B cell activating factor of the tumor necrosis factor family », Facteur d'activation des cellules B de la famille du facteur de nécrose tumorale

BCR : « B cell receptor », Récepteur de cellule B

BHE : Barrière hémato-encéphalique

BHM : Barrière hémato-méningée

CAM : « Cell adhesion molecule », Molécule d'adhésion cellulaire

CCL : Ligand des chimiokines C-C

CD: « Cluster of differentiation », cluster de différenciation

CD40L: « CD40 Ligand », Ligand du CD40

CXCL : Ligand des chimiokines C-X-C

Cellule CD4 Th17: Cellule T CD4⁺ helper 17

Cellule CD4 Th1: Cellule T CD4⁺ helper 1

Cellule T CD8 : Cellule T CD8⁺

CMH II : Complexe majeur d'histocompatibilité de classe II

Cm² : Centimètre carré

CREB: « C-AMP Response element binding protein », Protéine de liaison à l'élément de réponse C-AMP

CRD: « Carbohydrate recognition domain », Domaine de reconnaissance des carbohydrates

CS: «Class switched», Qui a changé de classe

EAE: Encéphalite auto-immune expérimentale

ECGS: « Endothelial Cell Growth Supplement », Supplément de croissance pour cellule endothéliale

ECM: « Endothelial cell culture media », Milieu de culture pour cellules endothéliales
EDTA : Éthylène Diamine Tétra acétique
ELISA : « Enzyme linked immunosorbent assay », Dosage d'immunoabsorption par enzyme liée
FSC: « Forward scatter », Canal de diffusion vers l'avant
GA: Glatiramer Acetate
G-CSF: « Granulocyte colony stimulating factor », Facteur de stimulation de colonies de granulocytes
Gly: Glycine
GM-CSF: «Granulocyte macrophage colony-stimulating factor», Facteur de stimulation de colonies de granulocytes et macrophage
ICAM-1: « Intercellular adhesion molecule 1 », Molécule d'adhésion intercellulaire 1
ICOS: « Inducible co-stimulator », Costimulateur inductible
IFN β : Interféron bêta
Ig: Immunoglobuline
IL : Interleukine
IRM : Imagerie par résonance magnétique
ITS : Insuline, Transferrine, Sélénium
JAM : « Junction adhesion molecule », Molécule de jonction d'adhésion
KO : « Knock-out », Délétion d'un gène
LCR : Liquide céphalo-rachidien
LFA-1: « Lymphocyte function associated antigen 1 », Antigène associé à la fonction lymphocyte 1
LPS : Lipopolysaccharide
LT- α : « Lymphotoxin alpha », Lymphotoxine alpha
MBAN : Matière blanche d'apparence normale
MBP : Membrane basale du parenchyme
MBV : Membrane basale vasculaire
MCAM : « Melanoma cell adhesion molecule », Molécule d'adhésion des cellules du mélanome
mCD40L : méga CD40 Ligand

mL : Millilitre

MMP : « matrix metalloproteinase », Métalloprotéinase de la matrice

NCS: « Non-class switched», Qui n'a pas changé de classe

ng: Nanogramme

NFkB: « Nuclear factor kappa B », Facteur nucléaire kappa B

MS : « Multiple sclerosis », Sclérose en plaques

nM: Nano molaire

OCB : « Oligoclonal bands », Bandes oligoclonales

OND : « Other neurological disease », autre maladie neurologique

PBMC : « Peripheral blood mononuclear cell », cellule mononuclée du sang périphérique

PBS : « Phosphate Buffer Solution », solution de tampon phosphate

PD-1: « Programmed death-1 »

PECAM-1: « Platelet endothelial cell adhesion molecule 1 », Molécule d'adhésion cellulaire des cellules endothéliales aux plaquettes

pg : Picogramme

PPMS : « Primary progressive multiple sclerosis », Sclérose en plaques progressive primaire

Pro: Proline

RA: « Rheumatoid arthritis », Arthrite rhumatoïde

RORyt: « Retinoic acid receptor-related orphan nuclear receptor gamma », Récepteur nucléaire orphelin gamma lié au récepteur de l'acide rétinoïque

Rpm : Rotations par minute

RRMS : « Relapsing remitting multiple sclerosis », Sclérose en plaques récurrente-rémittente

SEP : sclérose en plaques

SCSP : Société canadienne de sclérose en plaques

siRNA: « Small interference ribonucleic acid », petit ARN interférent

SNC : Système nerveux central

SPMS : « Secondary progressive multiple sclerosis », Sclérose en plaques progressive secondaire

SLT : Structures lymphoïdes tertiaires

SSC : « Side scatter », Canal de diffusion vers le côté

S-1-P : Sphingosine-1-Phosphate

TCR : « T cell receptor », Récepteur de cellule T

TNF- α : «Tumor necrosis factor alpha», Facteur de nécrose tumorale alpha

TLR: «Toll like receptor », Récepteur de type Toll

Treg: Cellule T régulatrice

Trp: Tryptophane

Tyr: Tyrosine

U: Unité

VCAM-1 : « Vascular cell adhesion molecule 1 », Molécule d'adhésion aux cellules vasculaires 1

VE-cadherin : « Vascular endothelium cadherin », Cadhérine de l'endothélium vasculaire

VLA-4 : α_4 - β_1 intégrine

ZO : Zonula occludens

μg : Microgramme

μL : Microlitre

μm : Micromètre

$^{\circ}\text{C}$: degré Celsius

Liste des figures

Figure 1 Schéma de la barrière hématoencéphalique	23
Figure 2 Schéma de la barrière hématoméningée	27
Figure 3 Schéma de la barrière sang-LCR.....	28
Figure 4 Schéma de la migration des leucocytes à travers les barrières du SNC	31
Figure 5 Schéma de la structure de la galectin-3	34
Figure 6 Expression de la galectin-3 par les cellules B CD19 de donneurs sains analysé par cytométrie de flux	61
Figure 7 Expression de la galectin-3 à la surface des cellules B CD19+, T CD4+, T CD8+ dans le sang total des donneurs sains.....	62
Figure 8 Stratégie de sélection pour l'analyse de l'expression de la galectin-3 par les sous-types de cellules B par cytométrie de flux	66
Figure 9 Expression de la galectin-3 à la surface des différents sous-types de cellules B des donneurs sains.....	67
Figure 10 Mesure de la concentration en galectin-3 dans le surnageant des cellules B traitées avec différentes cytokines	69
Figure 11 Évolution de la concentration en galectin-3 dans le surnageant des cellules B stimulées.....	70
Figure 12 Stratégie de sélection pour l'analyse par cytométrie de flux de l'expression de la galectin-3 et de cytokines par les cellules B stimulées <i>in vitro</i>	74
Figure 13 Influence de différentes cytokines sur l'expression de la galectin-3 à la surface des cellules B CD20 stimulées durant 2 jours <i>in vitro</i>	76
Figure 14 Influence de différents traitements sur le profil d'expression de cytokines des cellules B CD20 stimulées durant 2 jours <i>in vitro</i>	77
Figure 15 Comparaison de l'expression de cytokines par les cellules B galectin-3 ⁺ versus galectin-3 ⁻ après 2 jours de stimulation <i>in vitro</i>	78
Figure 16 Stratégie de sélection pour les cellules B stimulées en présence de galectin-3 <i>in vitro</i>	80
Figure 17 Influence de la galectin-3 sur l'expression de cytokines par les cellules B stimulées <i>in vitro</i>	81

Figure 18 Mesure de la capacité d'adhésion de la galectin-3 à la surface des cellules B <i>ex vivo</i>	82
Figure 19 Schéma d'un test de migration <i>in vitro</i>	86
Figure 20 Influence de la galectin-3 extracellulaire sur la migration des cellules B à travers le modèle <i>in vitro</i> de la BHE non inflammée	87
Figure 21 Influence de la galectin-3 extracellulaire sur la migration des cellules B à travers le modèle <i>in vitro</i> de la BHM non inflammée.....	88
Figure 22 Influence de la galectin-3 sur la migration des cellules B à travers le modèle <i>in vitro</i> de la BHE non inflammée avec milieu de culture modifié	89
Figure 23 Influence de la galectin-3 sur la migration des cellules B à travers le modèle <i>in vitro</i> de la BHE inflammée (avec milieu de culture modifié)	90
Figure 24 Mesure de la concentration en galectin-3 dans le LCR de patients SEP et OND	93
Figure 25 Mesure de la concentration en galectin-3 dans le sérum des patients SEP et donneurs sains	94
Figure 26 Expression de la galectin-3 à la surface des cellules B CD19+ du sang périphérique des patients SEP et donneurs sains	96
Figure 27 Expression de la galectin-3 à la surface des cellules CD19 ⁺ CD86 ⁺ chez les patients SEP et les donneurs sains	97
Figure 28 Comparaison de l'expression de la galectin-3 à la surface des sous-types de cellules B CD19 ⁺ chez les patients RRMS	99
Figure 29 Comparaison de l'expression de la galectin-3 à la surface des sous-types de cellules B CD19 ⁺ chez les patients SPMS	100
Figure 30 Comparaison de l'expression de la galectin-3 à la surface des sous-types de cellules B CD19+ chez les patients PPMS.....	101
Figure 31 Comparaison de l'expression de la galectin-3 à la surface des sous-types de cellules B CD19+ chez les patients SEP et donneurs sains	102
Figure 32 Schéma récapitulatif des principaux résultats de l'étude	116

Liste des tableaux

Tableau 1 Classification des lésions	3
Tableau 2 Rôles de la galectin-3 selon sa localisation cellulaire	39
Tableau 3 Description des caractéristiques des patients et donneurs sains inclus dans les expériences d'immunomarquage.....	54
Tableau 4 Liste des anticorps	58

À mes parents et à mon frère.

Remerciements

Je tiens à remercier plusieurs personnes qui m'ont accompagné au cours de ma maîtrise.

Tout d'abord, je remercie mon directeur de recherche le Dr Alexandre Prat de m'avoir donné l'opportunité de réaliser ma maîtrise dans son laboratoire. Ces deux années m'ont permis d'approfondir mes connaissances et d'acquérir de nouvelles compétences.

Je tiens à remercier tout particulièrement la Dre Evelyn Peelen. Je lui suis reconnaissante de m'avoir appris tant de choses et de m'avoir soutenu au quotidien, au travers des hauts comme des bas. J'ai été chanceuse de l'avoir comme mentor.

Merci à Camille Grasmuck, le troisième mousquetaire de la « B cell team », pour son aide et pour les discussions scientifiques.

Merci à Lyne de m'avoir offert son aide ainsi que son soutien et d'avoir répondu à mes questions, il y en a eu beaucoup.

Je tiens à remercier tous les membres du laboratoire sans qui cette maîtrise n'aurait pas été la même. Catherine Lachance, Dre Rose-Marie Rébillard (alias Dre Cerveau), Dre Tessa Dhaeze, Dre Stephanie Zandee, Jean-Philippe Ouimet, Laurence Tremblay, Sandra Larouche, Elizabeth Gowing, Marc Charabati, Hania Kébir, Dr Antoine Fournier, Dre Chloé Hoornaert, Dr Xavier Ayrignac. Et merci à Yousra Khalfallah, membre de cœur du laboratoire.

Merci à Juliette, une amie exceptionnelle, qui a toujours été présente pour les joies et les peines.

Merci à Mary-Pier de m'avoir accueilli comme elle l'a fait et pour son amitié. Sans elle ma vie québécoise ne serait pas la même.

Enfin je ne remercierais jamais assez mes parents et mon frère pour leur soutien indéfectible, leur confiance et leur amour. Merci de m'avoir toujours permis de faire ce que j'aimais.

1 Introduction

1.1 La Sclérose en plaques

1.1.1 Généralités

1.1.1.1 Pathologie

La sclérose en plaques (SEP) est une maladie neurodégénérative inflammatoire chronique du système nerveux central (SNC), supposée auto-immune. Les patients présentent sur les images obtenues par imagerie par résonance magnétique (IRM) des « plaques » caractéristiques, qui sont des lésions démyélinisantes inflammatoires disséminées dans le SNC. La maladie se manifeste en général entre les âges de 15 et 45 ans. Il existe trois formes de la maladie : la forme cyclique de la SEP ou récurrente-rémittente (*Relapsing Remitting Multiple Sclerosis* RRMS), la forme progressive primaire (*Primary Progressive Multiple Sclerosis*, PPMS), la forme progressive secondaire (*Secondary Progressive Multiple Sclerosis*, SPMS) (Société Canadienne de Sclérose en Plaques, SCSP). La forme cyclique représente 80-90% des premières présentations. Elle se manifeste plus souvent chez les femmes, avec un ratio de 3,2 femmes atteintes par homme atteint au Canada (Orton, Herrera et al. 2006) et se caractérise par des épisodes de dysfonctionnement neurologiques, appelés « poussées », accompagnés de symptômes variés dépendamment de la localisation des lésions démyélinisantes (Dendrou, Fugger et al. 2015, Kearney, Altmann et al. 2015). Ces épisodes sont suivis de périodes de récupération, complète ou non, des capacités des patients. Avec le temps, les dommages neurologiques s'accumulent, les périodes de récupération disparaissent, la progression se fait de façon continue plutôt que par poussées et il y a une transition vers la forme secondairement progressive de la maladie chez 80% des patients (Dendrou, Fugger et al. 2015). La PPMS touche 10-20% des patients, et présente un ratio femme-homme plus équilibré que la RRMS. Des dysfonctionnements neurologiques apparaissent de façon continue, sans récupération, dès l'apparition de la maladie (Goodin 2014). La PPMS se déclare plus tardivement

que la RRMS et est associée à un pronostic plus sombre pour le niveau de handicap final (Goodin 2014).

1.1.1.2 Histopathologie

Dans le SNC des patients atteints de SEP on trouve des « plaques » caractéristiques de la maladie. Ce sont des zones ayant subi une démyélinisation, c'est-à-dire une destruction de la gaine de myéline entourant les axones (Lassmann, Bruck et al. 2007). Cette gaine est formée par les oligodendrocytes qui entourent les prolongements axonaux, elle permet d'isoler ces derniers. Lorsque la gaine est endommagée, la transmission de l'influx nerveux est détériorée. La destruction est accompagnée d'une astrogliose et de dommages aux cellules neuronales et gliales (Lassmann, Bruck et al. 2007). Ces plaques sont généralement localisées à proximité de vaisseaux drainant le SNC, au niveau desquels on observe une perte d'intégrité de la barrière hématoencéphalique permettant une infiltration massive de cellules immunitaires (Kirk, Plumb et al. 2003). Il existe différentes méthodes de classification de ces lésions en fonction des cellules immunitaires qui y sont présentes et de la démyélinisation. On peut retenir comme méthode celle de Kuhlmann (Kuhlmann, Ludwin et al. 2017). Les auteurs proposent une classification simplifiée des lésions comme suit : actives, actives/inactives, inactives, avec ou sans démyélinisation active. Les lésions actives sont caractérisées par la présence de macrophages et microglies activées dans toute la lésion. Tandis que les lésions actives/inactives présentent un centre dépourvu de ces cellules, celles-ci sont réparties à la périphérie des lésions. Les macrophages et microglies sont pratiquement absents des lésions inactives. Les lésions actives et actives/inactives peuvent être distinguées en sous-catégories selon la présence ou l'absence de démyélinisation active.

	Macrophages/ Microglies activées	Démyélinisation active
Lésion active	Répartis dans toute la lésion	Oui ou non
Lésion active/inactive	En périphérie de la lésion	Oui ou non
Lésion inactive	Absents	Non

Tableau 1 Classification des lésions

Les différentes lésions retrouvées dans le SNC des patients peuvent être classées selon certains critères qui sont : la présence de macrophages et microglies activées dans la lésion et la présence de démyélinisation active. On distingue 3 grands types de lésions selon ces critères qui sont : les lésions actives, les lésions actives/inactives, les lésions inactives.

1.1.1.3 Épidémiologie et facteurs de risques

Dans le monde, environ 2,3 millions de personnes sont touchées par la SEP (MS International Federation). Le Canada est le pays présentant la plus grande prévalence avec une personne sur 340 est atteinte par la maladie (SCSP). La cause de la SEP n'est pas connue, mais différents facteurs de risques semblent être impliqués dans le développement de la maladie. Tout d'abord les facteurs de risques génétiques. Des études ont montré que le risque de développer la SEP est augmenté pour les membres de la famille d'un patient. Le risque développer la maladie pour un jumeau monozygotique d'un patient SEP est augmenté, ce risque diminue pour un jumeau dizygotique ainsi que pour les autres membres de la fratrie (Ebers, Sadovnick et al. 1995, Sadovnick, Dymont et al. 1996, Kakalacheva and Lunemann 2011).

Des études ont également montré une association forte de l'allèle *human leukocyte antigen* HLA-DRB1*15:01 (impliqué dans la tolérance immunitaire) avec le risque de développer la SEP (Noseworthy, Lucchinetti et al. 2000, Goodin 2014, Dendrou, Fugger et al. 2015). L'odds ratio est en moyenne de 3,08, cela signifie que la présence de l'allèle HLA-DRB1*15:01 est associée à un risque 3,08 plus élevé de présenter la

SEP (Hollenbach and Oksenberg 2015). Il existe d'autres facteurs de risque, comme l'infection par le virus Epstein-Barr, le tabagisme, l'éloignement par rapport à l'équateur qui réduit l'exposition aux rayons ultra-violet et induit une carence en vitamine D (Goodin 2014).

1.1.2 La Sclérose en plaques, une maladie longtemps décrite comme principalement médiée par les cellules T CD4 *helper 1*

Jusqu'à il y a peu, l'hypothèse dominante dans le domaine de la recherche était que la SEP serait médiée par des cellules T CD4⁺ *helper 1* (CD4 Th1) autoréactives dirigées contre les antigènes de la myéline menant à un processus de neurodégénération (Compston and Coles 2008, Fletcher, Lalor et al. 2010). Chez l'homme, cette hypothèse est supportée par le fait que le facteur de risque génétique le plus important pour la SEP est la présence de l'allèle *human leukocyte antigen* HLA-DRB1*15:01, dans la région du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II, jouant un rôle important dans le développement de la tolérance centrale des cellules T CD4 (Klein, Hinterberger et al. 2009, Ramagopalan and Ebers 2009, Disanto, Morahan et al. 2012). De plus, chez les patients, on retrouve des cellules CD4 Th1 dans les lésions (Traugott and Lebon 1988) qui possèdent des propriétés pro-inflammatoires (Batoulis, Addicks et al. 2010). Cette hypothèse est également soutenue par des études réalisées chez l'animal. L'encéphalite auto-immune expérimentale (EAE), le modèle animal le plus utilisé dans la recherche sur la SEP, est une maladie démyélinisante du SNC qui partage certaines de ses caractéristiques. Pour déclencher l'EAE classique (ou EAE active) on immunise les animaux avec un antigène de la myéline et de l'adjuvant de Freund complet (Stromnes and Goverman 2006). L'adjuvant de Freund complet est une émulsion d'huile minérale, de l'antigène de la myéline et de bactéries inactivées, son utilisation permet d'induire une réponse immunitaire plus importante. Des cellules CD4 Th1 spécifiques pour la myéline sont activées en périphérie. Ces cellules pro-inflammatoires migrent vers le SNC, elles sont abondantes dans les lésions et cause de la démyélinisation ainsi que de l'inflammation.

Cette hypothèse s'est révélée importante à de nombreux égards et a permis le

développement de traitements pour les patients. Mais elle est remise en cause, car divers éléments semblent suggérer que les mécanismes pathophysiologiques de la SEP sont plus complexes et que d'autres types cellulaires entrent en jeu (Hemmer, Cepok et al. 2002, Friese and Fugger 2005, Batoulis, Addicks et al. 2010, Disanto, Morahan et al. 2012). D'autres études réalisées chez les animaux ont permis de montrer la pathogénicité des cellules : CD4⁺ T *helper* 17 (CD4 Th17) (Langrish, Chen et al. 2005, Jager, Dardalhon et al. 2009), cellules T CD8⁺ (CD8) (Huseby, Liggitt et al. 2001, Friese, Jakobsen et al. 2008), cellules B (Gausas, Paterson et al. 1982, Willenborg and Prowse 1983). Des travaux utilisant des tissus de patients SEP ont montré qu'au niveau des lésions on pouvait avoir une démyélinisation importante en l'absence de cellules CD4 Th1 et lorsque des infiltrats sont présents dans les lésions, les cellules T CD8 y sont représentées en excès par rapport aux CD4 (Gay, Drye et al. 1997, Babbe, Roers et al. 2000, Barnett and Prineas 2004, Henderson, Barnett et al. 2009). Plusieurs études ont étudié la diversité des clones (cellules possédant des TCR identiques et donc dirigés contre un même antigène) de cellules T présents dans les lésions de patients SEP ou leur LCR. Elles ont montré que la diversité des clones des cellules T CD4 était plus importante que celle des cellules T CD8 (Babbe, Roers et al. 2000, Jacobsen, Cepok et al. 2002, Legroux and Arbour 2015). Lorsqu'un nombre limité de clones cellulaires se trouvent dans une zone, comme une lésion, cela suggère qu'ils n'y sont pas par hasard, mais qu'ils l'ont infiltré en raison de leurs spécificités antigéniques. Babbe et al ont séquencé les réarrangements du gène TCR-β de cellules individuelles se trouvant dans des lésions de patients SEP. Ils ont montré qu'un clone de cellules T CD8 pouvait représenter 35% des cellules T CD8 d'une lésion étudiée (Babbe, Roers et al. 2000). Les séquences hypervariables des TCR étaient très similaires, indiquant une spécificité antigénique commune (Babbe, Roers et al. 2000). Cependant la connaissance des cibles antigéniques des cellules T CD8 reste limitée entre autres à cause de difficultés techniques (Hohlfeld, Dornmair et al. 2016). Jusqu'à présent des antigènes de la myéline et des antigènes viraux ont été identifiés comme cibles potentielles (Hohlfeld, Dornmair et al. 2016). En ce qui concerne les cellules CD4 Th17, des études ont mis en évidence que des cellules Th17 spécifiques pour des antigènes de la myéline étaient responsables de dommages neuronaux chez des

souris atteintes d'EAE (Komiyama, Nakae et al. 2006, Siffrin, Radbruch et al. 2010). D'autre part, les patients SEP possèdent des cellules CD4 Th17 spécifiques pour des antigènes neuronaux dans le sang, mais elles ne sont pas plus fréquentes que chez les sujets sains (Ireland, Guzman et al. 2016). La colocalisation de cellules T CD4 et de l'IL-17 dans les lésions de patients a été mise en évidence, indiquant la présence de cellules CD4 Th17 (Kebir, Kreymborg et al. 2007). Cependant, les études ayant séquencé individuellement les séquences codant les TCR n'ont pas distingué les différents types de cellules T CD4 et comme mentionné précédemment la diversité des clones de cellules T CD4 dans les lésions de patients est importante et varie d'un patient à l'autre (Babbe, Roers et al. 2000, Junker, Ivanidze et al. 2007). Ainsi, la spécificité antigénique des cellules CD4 Th17 reste méconnue. Une approche thérapeutique visant des cellules T dirigées contre un antigène spécifique n'est donc pas envisageable pour le moment.

D'autre part, on peut mentionner que plusieurs traitements visant les cellules T CD4 s'étant rendus en essais cliniques n'ont pas eu les effets escomptés chez les patients SEP. Par exemple, l'anticorps monoclonal cM-T412, induisant une déplétion des cellules T CD4 chez les patients SEP n'a pas modifié l'activité de leur maladie ou son cours (van Oosten, Lai et al. 1997), tandis que ce traitement avait prévenu le développement de l'EAE chez les animaux. L'Ustekinumab, un anticorps dirigé contre la sous-unité commune des interleukines (IL)-12 et IL-23, nécessaires à la différenciation des cellules CD4 Th1 et Th17, n'a pas été bénéfique pour les patients (Segal, Constantinescu et al. 2008, Disanto, Morahan et al. 2012).

Le succès des thérapies induisant une déplétion des cellules CD20⁺, soit une partie des cellules B, a amené un nouvel intérêt et a donné lieu à de nombreuses études visant à améliorer notre compréhension de leur implication dans la SEP. Leur contribution à la pathophysiologie est connue depuis longtemps à travers leur rôle dans l'immunité humorale, mais d'autres éléments que nous allons exposer ici supportent le fait que leur contribution soit plus importante et complexe.

1.1.3 Preuves de l'implication des cellules B dans la sclérose en plaques

1.1.3.1 Bandes oligoclonales et auto-anticorps chez les patients SEP

La présence de bandes oligoclonales (*Oligoclonal Bands*, OCB) dans le liquide céphalo-rachidien (LCR) est le marqueur le plus fréquemment trouvé chez les patients atteints de SEP (Freedman, Thompson et al. 2005, Disanto, Morahan et al. 2012). Les OCB sont des immunoglobulines (Ig)-G ou IgM, produites par des cellules plasmiques intrathécales ayant subi une expansion clonale et pouvant se trouver dans le parenchyme cérébral (Owens, Ritchie et al. 2003, Lovato, Willis et al. 2011, Obermeier, Lovato et al. 2011). Un niveau élevé d'OCB dans le LCR des patients est corrélé à un pronostic plus sombre (Rudick, Medendorp et al. 1995, Zeman, Kidd et al. 1996, Villar, Masjuan et al. 2003, Joseph, Hirst et al. 2009) et indique une activation anormale des cellules B se trouvant dans le SNC (Disanto, Morahan et al. 2012). Mais la spécificité des anticorps produits par ces cellules reste méconnue bien que de nombreuses études aient été menées afin d'identifier les cibles des OCB. Des OCB dirigées contre des virus, le SNC ou bien la myéline ont été décrites (Sindic, Monteyne et al. 1994). Mais ces résultats n'ont pas pu être reproduits de façon consistante (Owens, Bennett et al. 2009). Bien qu'il soit rare de détecter des anticorps dirigés contre la myéline dans le LCR, ces anticorps sont couramment retrouvés dans le SNC (Cross and Waubant 2011). Luchinetti et al. (Lucchinetti, Bruck et al. 2000) ont mené une étude histologique de 83 biopsies et autopsies de patients SEP et ont constaté la présence d'Ig et de protéines du complément dans la majorité des lésions. De plus, des études *in vitro* ont démontré que les anticorps extraits du LCR avaient la capacité de provoquer des dommages axonaux et de la démyélinisation médiée par le complément (Elliott, Lindner et al. 2012, Blauth, Soltys et al. 2015). Cependant, cette réponse immunitaire humorale pourrait être secondaire à l'apparition de dommages dans le SNC et cela est appuyé par le fait que des anticorps contre des protéines intracellulaires sont détectés chez les patients (Lu and Kalman 1999). En effet, suite à des dommages des protéines normalement intracellulaires peuvent être relâchées dans le milieu extracellulaire. Elles sont alors susceptibles d'être internalisées par des cellules présentatrices d'antigènes et modifiées afin d'être présentées sur des

molécules du CMH II. Cela peut mener à l'activation et à la production d'anticorps par des cellules B spécifiques pour ces antigènes. L'apparition des dommages est donc antérieure à la production d'anticorps dirigés contre les molécules intracellulaires.

1.1.3.2 Des cellules B présentes dans le LCR et les lésions des patients SEP

Le LCR peut être recueilli chez les patients et son contenu cellulaire reflète celui du SNC, c'est donc un outil précieux. Le ratio de cellules B par rapport aux monocytes dans le LCR des patients est corrélé à la progression de la maladie (Cepok, Jacobsen et al. 2001, Kuenz, Lutterotti et al. 2008). De plus, il est apparu que l'activité des lésions détectées à l'IRM est corrélée avec le nombre de cellules B dans le LCR (Cepok, Rosche et al. 2005). D'autre part, les cellules B sont également présentes dans les lésions et Luchinetti et al. ont pu les y observer (Lucchinetti, Bruck et al. 2000).

1.1.3.3 Des cellules B présentes dans les méninges

Des structures nommées structures lymphoïdes ectopiques ou structures lymphoïdes tertiaires (SLT), ont été observées dans les méninges de patients SPMS et plus récemment chez des patients à un stade plus précoce de la maladie (Serafini, Rosicarelli et al. 2004, Magliozzi, Howell et al. 2007, Lovato, Willis et al. 2011, Lucchinetti, Popescu et al. 2011). Ce type de structure est observé dans différentes maladies auto-immunes au niveau des sites d'inflammation chronique (Pikor, Prat et al. 2015, Corsiero, Nerviani et al. 2016). Leur organisation et composition cellulaire présentent des similitudes avec les organes lymphoïdes secondaires (Pikor, Prat et al. 2015). La formation des SLT est inductible et elles sont constituées par l'agrégation de leucocytes dans des tissus non lymphoïdes inflammés. Les SLT peuvent être riches en cellules B (Serafini, Rosicarelli et al. 2004, Magliozzi, Howell et al. 2007, Lovato, Willis et al. 2011, Lucchinetti, Popescu et al. 2011, Michel, Touil et al. 2015, Pikor, Prat et al. 2015), mais on y trouve aussi des cellules T, des cellules dendritiques folliculaires, des cellules réticulaires et des cellules stromales (Pikor, Prat et al. 2015). Le chimioattractant (substance qui induit un déplacement dans sa direction) pour les cellules B CXCL-13 est détecté dans les SLT riches en cellules B des patients SEP. Des études ont mis en évidence que le niveau de CXCL-13 dans le LCR des patients

est corrélé avec l'expression de marqueurs de démyélinisation, la perte d'intégrité de la BHE, l'activité des lésions à l'IRM, et le taux de poussées chez les patients (Festa, Hankiewicz et al. 2009, Sellebjerg, Bornsen et al. 2009, Kalinowska-Lyszczarz, Szczucinski et al. 2011, Khademi, Kockum et al. 2011). De plus la présence de SLT dans l'espace subarachnoïde (l'espace entre l'arachnoïde et la pie-mère) des patients est corrélée avec la présence d'élément indiquant une forme plus sévère de la maladie (Festa, Hankiewicz et al. 2009). Plusieurs études ont également observé de la démyélinisation, de l'atrophie axonale et de l'activation microgliale dans le tissu cortical sous-jacent aux SLT (Kutzelnigg, Lucchinetti et al. 2005, Magliozzi, Howell et al. 2007, Choi, Howell et al. 2012). Une hypothèse a été proposée suggérant que les facteurs solubles libérés par les cellules agrégées dans les SLT participent à la dégradation de la glial limitans, induisant un gradient de démyélinisation et de dommages neuronaux (Magliozzi, Howell et al. 2007, Magliozzi, Howell et al. 2010, Pikor, Prat et al. 2015).

1.1.3.4 Des cellules B avec un profil pro-inflammatoire

Longtemps la recherche s'est concentrée principalement sur l'immunité humorale et la capacité des cellules B à produire des anticorps. Récemment, beaucoup d'efforts ont été consacrés à améliorer notre compréhension du rôle des cellules B indépendant de la production d'anticorps dans la SEP. Ce sont des cellules capables de présenter des antigènes, mais également de produire une variété de cytokines. Par la sécrétion de *tumor necrosis factor alpha* (TNF- α), IL-6, *lymphotoxin alpha* (LT- α) elles jouent un rôle pro-inflammatoire et par la sécrétion d'IL-10 et IL-35 elles exercent une action anti-inflammatoire. (Fillatreau, Sweenie et al. 2002, Duddy, Alter et al. 2004, Shen, Roch et al. 2014, Li, Rezk et al. 2015). Les cellules B des patients SEP ont un profil d'avantage pro-inflammatoire que celles des contrôles sains, elles produisent d'avantage d'IL-6, LT- α , TNF- α , *granulocyte macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF) et moins d'IL-10 (Bar-Or, Fawaz et al. 2010, Knippenberg, Peelen et al. 2011, Ireland, Guzman et al. 2014, Li, Rezk et al. 2015).

1.1.4 Traitements pour la SEP

1.1.4.1 Anticorps monoclonaux dirigés contre CD20

Les traitements les plus récents sont des anticorps monoclonaux dirigés contre CD20 qui est une molécule transmembranaire présente sur la majorité de la lignée des cellules B humaines, excepté les cellules souches, cellules pro-B, et les cellules plasmiques (Stashenko, Nadler et al. 1980). Il semble que sa structure et son rôle soient similaires à celle des canaux calciques et qu'elle soit impliquée dans l'activation des cellules B (Bubien, Zhou et al. 1993). Le Rituximab (Rituxan, Genentech and BiogenIdec, RTX) est le premier anticorps anti-CD20 développé. C'est un anticorps monoclonal chimérique utilisé initialement pour traiter le lymphome diffus à grandes cellules B (Maloney, Liles et al. 1994). On suppose que les anticorps anti-CD20 causent l'élimination des cellules B via différents mécanismes : la cytotoxicité dépendante du complément, la cytotoxicité dépendante des anticorps, l'induction de l'apoptose (Reff, Carner et al. 1994, Deans, Li et al. 2002, Barun and Bar-Or 2012). Le Rituximab ainsi que de nouveaux anticorps Ocrelizumab (Roche/Genentech) et Ofatumumab (Arzerra, Novartis Oncology) ont été développés et testés lors d'essais cliniques chez des patients SEP. Les générations plus récentes d'anticorps (Ocrelizumab, Ofatumumab) sont humanisées ou constituées d'un fragment IgG1 humain, ce qui diminue le risque de réaction du système immunitaire des patients à leurs rencontre. Lors des essais cliniques, les patients RRMS ayant reçu le traitement anti-CD20 montraient une importante réduction du nombre total de lésions ainsi que de nouvelles lésions, une diminution du nombre de poussées (Hauser, Waubant et al. 2008, Sorensen, Lisby et al. 2014, Hauser, Bar-Or et al. 2017). L'Ocrelizumab a permis une diminution de la progression du handicap des patients, une réduction de la perte de volume cérébral ainsi que de l'activité de la maladie (Hauser, Bar-Or et al. 2017). De plus, l'essai clinique mené sur une cohorte de patients PPMS ayant reçu de l'Ocrelizumab fut le premier à montrer une diminution, bien que modeste, de la progression du handicap, du volume de lésions T2 et de la perte de volume cérébral (Montalban, Hauser et al. 2017). Les résultats de ces différents essais cliniques ont permis de mettre à jour l'importance du rôle des cellules B dans la pathogenèse de la RRMS et possiblement

dans la PPMS. Et notamment de leurs fonctions indépendantes de la production d'anticorps, en effet, les anticorps anti-CD20 n'induisent pas l'élimination des cellules plasmiques responsables de la production des anticorps, car elles ne possèdent pas ce marqueur à leur surface. De plus, le Rituximab est bénéfique pour les patients atteints de RRMS, mais on n'observe pas de modifications du niveau d'IgG et d'OCB dans leur LCR (Piccio, Naismith et al. 2010).

1.1.4.2 Effets des principaux traitements sur les cellules B

Parmi les différents traitements disponibles pour la SEP beaucoup ont un impact sur les cellules B, bien qu'ils n'aient pas été développés dans ce but. Nous allons ici résumer les effets des principaux traitements sur les cellules B des patients.

1.1.4.2.1 Interféron Bêta

L'Interféron bêta (IFN- β) est un traitement dit de « première ligne », c'est un agent immunomodulateur considéré sûr pour les patients (Michel, Larochelle et al. 2015). Il limite la production de molécules pro-inflammatoires, augmente celle des molécules anti-inflammatoires et diminue la migration des leucocytes (Longbrake and Cross 2016). Cela est en partie dû à son impact sur les cellules B. L'IFN- β induit une diminution de l'expression des molécules nécessaires à la costimulation ainsi que de la présentation d'antigènes ce qui conduit à une diminution de la capacité des cellules B à activer les cellules T (Liu, Pelfrey et al. 2001, Ramgolam, Sha et al. 2011, Huang, Ito et al. 2013, Longbrake and Cross 2016). L'IFN β cause une augmentation de la production du facteur de survie pour les cellules B, *B cell activating factor of the tumor necrosis factor family* (BAFF) (Krumbholz, Faber et al. 2008, Schubert, Hu et al. 2015), une diminution du nombre de cellules B mémoires *class switched* (CS) et une augmentation du nombre de cellules B transitionnelles capables de produire de l'IL-10 (cytokine anti-inflammatoire) ce qui permet une diminution de l'inflammation (Schubert, Hu et al. 2015).

1.1.4.2.2 Glatiramer Acetate

Le Glatiramer Acetate (GA) est un peptide synthétique dont la structure est similaire au supposé auto-antigène *Myelin Basic Protein*, qui est un peptide de la gaine

de myéline. Il agit principalement en influençant les cellules T vers un profil plus immunorégulateur, mais des études ont également observé un effet sur les cellules B (Longbrake and Cross 2016). Le GA induit une diminution de la production de cytokines pro-inflammatoires et de la prolifération des cellules B des patients *in vitro* (Ireland, Guzman et al. 2014). Et il permet un rétablissement de la production d'IL-10 par les cellules B au niveau de celui des contrôles sains (Ireland, Guzman et al. 2014). L'impact du GA sur le phénotype des cellules B n'est pas encore clair, les résultats diffèrent entre les études, elles méritent donc d'être poursuivies afin d'éclaircir ce point (Longbrake and Cross 2016).

1.1.4.2.3 Fingolimod

Le Fingolimod est un modulateur des récepteurs Sphingosine-1-Phosphate (S-1-P), qui induit la séquestration des cellules B et T dans les organes lymphoïdes secondaires (Longbrake and Cross 2016). Par ce mécanisme il cause une diminution du nombre de cellules B et T en circulation (Miyazaki, Niino et al. 2014). Le traitement n'a pas le même effet sur tous les types de cellules B, chez les patients ayant reçu du Fingolimod on observe une augmentation de proportion de cellules B naïves et immatures en circulation et une baisse de la proportion de cellules mémoires (Miyazaki, Niino et al. 2014, Chiarini, Sottini et al. 2015). L'expression de CD80, une molécule de costimulation, diminue ainsi que celle du TNF- α une cytokine pro-inflammatoire, d'autre part on a une augmentation de l'expression de l'IL-10 par les cellules B (Miyazaki, Niino et al. 2014).

1.1.4.2.4 Natalizumab

Le Natalizumab est un anticorps monoclonal dirigé contre l'intégrine α_4 , une molécule importante pour la migration des lymphocytes vers le SNC qui est exprimée de façon importante à la surface des cellules B et est aussi présente à la surface de certaines cellules T (Niino, Bodner et al. 2006, Disanto, Morahan et al. 2012). En bloquant la migration des lymphocytes vers le SNC le traitement permet une diminution du nombre de poussées ainsi que l'apparition de nouvelles lésions (Polman, O'Connor et al. 2006). Le Natalizumab induit une augmentation du nombre de cellules B circulant

dans la périphérie (Krumbholz, Meinel et al. 2008, Koudriavtseva, Sbardella et al. 2014), notamment des cellules B régulatrices, mémoires, et *marginal zone-like* tandis que la fréquence des cellules B naïves diminue (Haas, Bekeredjian-Ding et al. 2011, Planas, Jelcic et al. 2012, Mellergard, Edstrom et al. 2013, Longbrake and Cross 2016). Cela pourrait être dû à une baisse de la rétention des cellules B dans les organes lymphoïdes secondaires (Longbrake and Cross 2016). On observe également une baisse des niveaux plasmatiques d'IgG et IgM (Selter, Biberacher et al. 2013). Contrairement à ce qu'il se passe en périphérie, dans le SNC on observe une diminution de l'activité des cellules B durant le traitement, un plus faible nombre de cellules B dans le LCR (Warnke, Stettner et al. 2015).

1.1.4.2.5 Alemtuzumab

L'Alemtuzumab est un anticorps monoclonal de souris humanisé dirigé contre CD52. CD52 est une glycoprotéine exprimée de façon importante à la surface des cellules B et T et dans une moindre mesure par les autres cellules immunitaires (Freedman, Kaplan et al. 2013). L'Alemtuzumab va induire l'élimination des cellules via les mécanismes de cytotoxicité médiée par les anticorps et d'induction de l'apoptose. Cela conduit à la suppression du système immunitaire adaptatif, qui va se reconstituer dans les années suivant le traitement. Le compartiment une fois reconstitué est principalement composé de cellules B naïves (Thompson, Jones et al. 2010).

1.1.4.2.6 Mitoxantrone

Le Mitoxantrone est un traitement anticancéreux et immunosuppresseur. C'est un agent intercalant cytotoxique pour les cellules se divisant rapidement qui cause une baisse du nombre de cellules B (Gbadamosi, Buhmann et al. 2003). Le Mitoxantrone induit une augmentation de la sécrétion d'IL-10, une baisse de la sécrétion de lymphotoxine (Gbadamosi, Buhmann et al. 2003). Mais ce traitement comporte de nombreux risques, entre autres pour la santé cardiaque des patients et pour cette raison il est peu prescrit.

1.2 Les cellules B

1.2.1 Le développement des cellules B

Le développement des cellules B débute dans la moelle osseuse à partir de cellules progénitrices hématopoïétiques qui vont subir une recombinaison génétique de la région V(D)J au niveau du locus de la chaîne lourde (Schatz, Oettinger et al. 1992, LeBien and Tedder 2008). La chaîne lourde d'IgM formée à l'issue de ce processus va s'associer avec des chaînes légères temporaires et les hétérodimères Ig- α et Ig- β afin de former le pré-BCR nécessaire à la survie et à la prolifération des cellules (Schatz, Oettinger et al. 1992, Ollila and Vihinen 2005). Les cellules peuvent alors initier le réarrangement des loci des chaînes légères kappa ou lambda et former un BCR mature capable de lier des antigènes (Reth, Petrac et al. 1987). Cette série de réarrangements génomiques et l'association avec des chaînes kappa ou lambda permettent de créer un répertoire de récepteurs de cellule B (*B Cell Receptor*, BCR) très riche. Mais de nombreuses cellules B sont autoréactives à ce stade, la majorité d'entre elles sont éliminées ou inactivées par les mécanismes de tolérance immunologique (Ollila and Vihinen 2005, LeBien and Tedder 2008). Les cellules B transitionnelles quittent la moelle osseuse vers les organes lymphoïdes secondaires et passent de nouveaux points de contrôles immunologiques en périphérie avant d'intégrer la population des cellules B matures. Des mécanismes de tolérance permettant d'éliminer les cellules B autoréactives sont alors mis en place – il en existe plusieurs qui sont : l'apoptose (Nemazee and Burki 1989, Chen, Radic et al. 1994), l'anergie cellulaire (Adams, Basten et al. 1990) et le réarrangement V(D)J secondaire des BCR autoréactifs (Radic, Erikson et al. 1993, Wardemann, Hammersen et al. 2004, Tiegs, Russell et al. 2011). Malgré cela une certaine proportion de cellules B demeurent autoréactives parmi les cellules matures (Wardemann and Nussenzweig 2007).

1.2.2 Activation des cellules B

Au cours du processus menant à l'activation, les cellules B matures naïves migrent vers les ganglions lymphatiques (Pape, Catron et al. 2007). L'activation des cellules B peut être indépendante des cellules T suite à la rencontre d'un antigène non

proéique pouvant être un polysaccharide ou un glycolipide par exemple le lipopolysaccharide (LPS) à la surface des bactéries à Gram - (LaRosa and Orange 2008). Les cellules B sont également susceptibles de rencontrer un antigène protéique pour lequel leur BCR est spécifique. Cette rencontre a lieu dans la rate ou un des ganglions lymphatiques, qui sont nommés ensemble les organes lymphoïdes secondaires. Si la cellule B n'a pas rencontré d'antigène dans les 24 heures, elle peut circuler jusqu'à un autre organe lymphoïde secondaire (Pape, Catron et al. 2007, Batista and Harwood 2009). Les antigènes peuvent circuler librement ou bien être présentés par des cellules présentatrices d'antigènes comme les macrophages ou cellules dendritiques (Qi, Egen et al. 2006, Carrasco and Batista 2007). L'antigène peut être internalisé par la cellule B et présenté par le CMH II à une cellule T avec un récepteur de cellule T (*T Cell Receptor*, TCR) spécifique pour celui-ci. Cette rencontre a lieu à la frontière entre la zone T (riche en cellules T) et la zone B (riche en cellules B) dans un ganglion lymphatique ou la rate (Batista and Harwood 2009). L'interaction entre le TCR et le complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH II) constitue un premier signal d'activation pour la cellule B. L'interaction entre CD40 et CD40L (aussi nommé CD154), est un second signal indispensable pour induire la commutation isotypique permettant d'augmenter l'affinité du BCR (Parker 1993). L'interaction se fait également via d'autres récepteurs à la surface de la cellule T comme ICOS, OX-40, PD-1 et la libération de cytokines (Parker 1993, Crotty 2011, Cerutti, Cols et al. 2012). À la surface de la cellule B des molécules comme CD80, CD86 interagissent avec leur récepteur sur la cellule T (Chaplin 2010). Cette rencontre peut induire la formation d'un centre germinatif.

1.2.3 La réaction du centre germinatif

Les centres germinatifs sont des structures dynamiques qui se forment dans les ganglions lymphatiques. Elles contiennent des lymphocytes B, T et des cellules dendritiques folliculaires. Le centre germinatif est constitué de deux zones : la zone claire riche en cellules T et cellules dendritiques folliculaires et la zone foncée riche en cellules B en prolifération (centroblastes) (Gatto and Brink 2010). Après être entrée en contact avec une cellule T spécifique pour le même antigène, la cellule B migre vers la

zone foncée et entre en expansion, puis il y a diversification du BCR par hypermutation somatique et commutation isotypique (Gatto and Brink 2010, McHeyzer-Williams, Okitsu et al. 2011). Ceux présentant la plus grande affinité sont sélectionnés. Ceux dont l'affinité est faible ou bien qui sont autoréactifs sont éliminés. Puis, les cellules B retournent vers la zone claire (McHeyzer-Williams, Okitsu et al. 2011). La réaction du centre germinatif produit des plasmablastes (cellules B produisant des anticorps) à courte durée de vie ou bien à longue durée de vie qui évoluent en cellules plasmiques, cellules mémoires CS, cellules mémoires non *class switched* (NCS). Les cellules mémoires CS perdent l'expression des IgD à la suite de la commutation isotypique et expriment alors IgG, IgA, IgE. Une partie des cellules mémoires va conserver l'expression d'IgM uniquement (Gatto and Brink 2010, McHeyzer-Williams, Okitsu et al. 2011).

1.2.4 Les populations de cellules B circulantes en périphérie

Les cellules B représentent 5 à 15% des lymphocytes circulant dans le sang périphérique, et forment une population hétérogène pouvant être divisée en plusieurs catégories selon les marqueurs présents à leur surface (Ollila and Vihinen 2005). On distingue 4 grands groupes : les cellules transitionnelles (ou immatures), naïves, mémoires, cellules plasmiques. Les cellules transitionnelles ($CD19^+IgD^+CD38^+$) représentent environ 5% des cellules B du sang, elles expriment CD38, ce qui n'est pas le cas des cellules matures naïves. Les cellules naïves ($CD19^+IgD^+$) constituent 60-70% des cellules B en circulation, elles sont caractérisées par l'expression d'IgM et IgD, l'absence de CD27, elles n'ont pas encore subi d'hypermutation somatique ou de commutation isotypique (Ollila and Vihinen 2005). Les cellules B mémoires soit 20-30% des cellules B dans le sang peuvent être divisées en deux grands groupes : les cellules NCS ($CD19^+IgD^+CD27^+$), expriment IgD uniquement et les cellules CS ($CD19^+IgD^-CD27^+$) qui suite à l'hypermutation somatique et à la commutation isotypique expriment des Ig de haute affinité (IgA, IgE, IgG). Cependant, une petite population de cellules B mémoires conserve uniquement l'expression d'IgM. Les cellules mémoires peuvent évoluer en plasmablastes ($CD19^+CD27^+CD38^{++}$) ou en cellules plasmiques ($CD38^+CD138^{++}$) suite à une réaction du centre germinatif ou

une autre voie (Ollila and Vihinen 2005).

1.2.5 Fonctions effectrices des cellules B

Les cellules B endossent plusieurs fonctions : la production d'anticorps, la production de cytokines et la présentation d'antigènes.

1.2.5.1 Production d'anticorps

Les cellules productrices d'anticorps représentent 1 à 3% des cellules B circulantes, ce sont les plasmablastes et les cellules plasmatisques (Perez-Andres, Paiva et al. 2010). Ces dernières contrairement aux plasmablastes ne sont pas capables de proliférer. Les plasmablastes peuvent se différencier en cellules plasmatisques à courte ou longue vie. Ces derniers peuvent persister durant toute la vie de l'individu, au sein de niches au niveau de la moelle osseuse ou des organes lymphoïdes secondaires, permettant ainsi une protection à long terme (Amanna and Slifka 2010, Oracki, Walker et al. 2010). Les plasmablastes et les cellules plasmatisques sont responsables de la production d'anticorps qui constitue l'immunité humorale. Les différents types d'Ig ont des rôles différents et induisent des réponses différentes. Les IgM et IgD, qui sont de faible affinité, participent à la réponse immunitaire primaire en général. Tandis que les Ig de haute affinité (IgG, IgA, IgE) participent à la réponse secondaire (Oracki, Walker et al. 2010). Les IgG sont les plus abondantes et ont la demi-vie la plus longue, il existe plusieurs classes qui peuvent être impliquées dans la fixation de molécules du complément, dans l'opsonisation, la neutralisation de toxines ou de virus (Schroeder and Cavacini 2010). Les IgA sont importantes pour la protection des muqueuses contre les toxines, virus et bactéries via la neutralisation ou bien en bloquant leur fixation à la surface des muqueuses (Schroeder and Cavacini 2010). Les IgE sont associées à l'hypersensibilité aux réactions allergiques ainsi qu'à la réponse contre les parasites (Schroeder and Cavacini 2010).

1.2.5.2 Production de cytokines

Les cellules B sont capables de produire des cytokines pro ou anti-inflammatoires pouvant influencer la réponse immunitaire. De nombreuses études

visant à caractériser ces cellules ont été réalisées avec des modèles animaux, mais les découvertes ainsi faites ne sont pas toujours faciles à transposer chez l'homme (Li, Rezk et al. 2015).

1.2.5.2.1 Cytokines anti-inflammatoires

1.2.5.2.1.1 IL-10

L'IL-10 est une cytokine anti-inflammatoire produite par différents types cellulaires, dont les cellules B. On attribue à ces cellules un rôle de « régulateur » ou « suppresseur » car l'IL-10 est une cytokine permettant de diminuer l'inflammation. Des études réalisées avec différents modèles animaux de maladies inflammatoires ont permis de mettre en avant la capacité de l'IL-10 produit par les cellules B à inhiber l'inflammation (Fillatreau, Sweenie et al. 2002, Mizoguchi, Mizoguchi et al. 2002, Mauri, Gray et al. 2003, Rosser and Mauri 2015). Notamment en influençant d'autres types cellulaires. L'IL-10 permet la suppression de la production de cytokines pro-inflammatoires par les cellules dendritiques ce qui va bloquer la différenciation des cellules Th1 et Th17 (Sun, Deriaud et al. 2005, Matsumoto, Baba et al. 2014, Rosser and Mauri 2015). De plus, l'absence de ces cellules productrices d'IL-10 est associée à une baisse du nombre de cellules T régulatrices (Treg) et une inflammation plus importante (Carter, Vasconcellos et al. 2011, Carter, Rosser et al. 2012). Cependant, il n'existe pas de consensus pour la définition du phénotype des cellules B « régulatrices » productrices d'IL-10. Plusieurs types de cellules B produisant de l'IL-10 ont été décrits : les plasmablastes, les cellules transitionnelles, cellules B10, cellules Br1 (Blair, Norena et al. 2010, Iwata, Matsushita et al. 2011, Flores-Borja, Bosma et al. 2013, van de Veen, Stanic et al. 2013, Matsumoto, Baba et al. 2014, Rosser and Mauri 2015). Jusqu'à présent il n'a pas été possible d'identifier une lignée de cellules B régulatrices, mais la production d'IL-10 par les cellules B et leur prolifération sont probablement déclenchées par l'inflammation (Rosser and Mauri 2015).

1.2.5.2.1.2 IL35

L'IL-35 est une cytokine anti-inflammatoire, elle est produite par les cellules Treg et par les cellules plasmatisques (Collison, Workman et al. 2007, Seyerl, Kirchberger et

al. 2010, Li, Rezk et al. 2015). L'IL-35 produite par les cellules B diminue la sévérité de l'EAE et de l'uvéite auto-immune expérimentale, qui sont des modèles de maladies inflammatoires (Shen, Roch et al. 2014, Wang, Yu et al. 2014). Elle a une action anti-inflammatoire directe mais aussi indirecte en favorisant la production d'IL-10 par les cellules B (Wang, Yu et al. 2014).

2.5.2.1.3. TGF- β 1

Le *Transforming Growth Factor-beta 1* (TGF- β 1) est une cytokine qui peut être produite par différentes cellules, elle peut avoir un rôle anti-inflammatoire, mais son rôle dans la SEP et l'EAE reste encore à définir. La production de TGF- β 1 par les cellules B activées par le LPS peut induire l'apoptose des cellules T CD4 et l'anergie des cellules T CD8 (Tian, Zekzer et al. 2001, Parekh, Prasad et al. 2003).

1.2.5.2.2 Cytokines pro-inflammatoires

1.2.5.2.2.1 TNF- α et LT- α

Ces cytokines sont impliquées dans la protection contre les pathogènes (Bradley 2008). TNF- α a un rôle important dans plusieurs maladies auto-immunes pour lesquelles des thérapies visant à bloquer ses effets sont utilisées (Feldmann and Maini 2001). Ce type de thérapie s'est révélé efficace pour diminuer la sévérité de l'EAE, mais les essais cliniques chez les patients SEP n'ont pas été concluants. Au contraire, la sévérité de la maladie a augmenté (1999). Les cellules B des patients SEP produisent davantage de TNF- α et LT- α que celles des contrôles sains lorsqu'elles sont stimulées avec des anticorps anti-BCR et du CD40L (Duddy, Niino et al. 2007)

1.2.5.2.2.2 IL-6

C'est une cytokine produite par différents types cellulaires, dont certaines cellules immunitaires. L'IL-6 produit par les cellules B est nécessaire à la différenciation des cellules Th17, à la production d'IL-17, à l'expression de ROR γ t par ces cellules pathogéniques chez les souris (Bettelli, Carrier et al. 2006). La production d'IL-6 par les cellules B bloque le développement des cellules Treg qui sont anti-inflammatoires (Bettelli, Carrier et al. 2006, Schneider, Long et al. 2013). De plus, lorsque les cellules

B productrices d'IL-6 sont éliminées chez les souris, la sévérité de l'EAE est diminuée (Barr, Shen et al. 2012, Molnarfi, Schulze-Topphoff et al. 2013). Cependant, l'IL-6 est aussi impliquée dans l'induction de la différenciation des cellules Breg productrices d'IL-10, on peut supposer que cela constitue une boucle de contrôle pour limiter l'inflammation (Rosser, Oleinika et al. 2014, Rosser and Mauri 2015). Chez l'homme, les cellules B des patients SEP produisent plus d'IL-6 que celles des contrôles sains, et suite à la déplétion des cellules B la production d'IL-6 est diminuée (Barr, Shen et al. 2012).

1.2.5.2.2.3 GM-CSF

GM-CSF est un facteur de croissance pour les cellules de la lignée myéloïde. Les souris *knock-out* (KO) GM-CSF ne développent pas d'EAE (McQualter, Darwiche et al. 2001). De plus, les cellules T productrices de GM-CSF sont plus nombreuses chez les patients SEP que chez les contrôles sains (Rasouli, Ciric et al. 2015). Des cellules B produisant du GM-CSF ont été décrites chez l'homme, elles appartiennent aux cellules B mémoires (Li, Rezk et al. 2015). Ces cellules B sont plus nombreuses chez les patients SEP et induisent une réponse inflammatoire plus importante chez les cellules myéloïdes que les cellules B de contrôles sains. Cela se traduit par une augmentation de la production d'IL-12 et IL-6 qui sont impliquées dans la différenciation des cellules Th1 et Th17. Les cellules B productrices de GM-CSF co-expriment d'autres cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IL-6) et expriment CD80, CD86 après activation qui sont des molécules de co-stimulation importantes pour l'activation des cellules T. Chez les patients SEP, après un traitement avec le Rituximab et reconstitution de la population de cellules B, le nombre de cellules produisant du GM-CSF est diminué ainsi que la production de GM-CSF (Li, Rezk et al. 2015)

1.2.5.2.2.4 IFN- γ

Les cellules B peuvent induire une activation des cellules Th1 via la production d'IFN- γ , ce qui a été démontré dans différents modèles infectieux, elles peuvent aussi influencer directement sur les cellules myéloïdes (Fillatreau 2015). De plus, chez la souris la production d'IFN- γ par les cellules B peut être induite par les cellules Th1

(productrices d'IFN- γ également), elles acquièrent un phénotype de cellules B effectrices capables d'induire la différenciation de cellules T naïves en cellules Th1. Cette boucle de contrôle est utile dans la défense contre les pathogènes, mais pourrait s'avérer délétère dans une maladie auto-immune comme la SEP (Fillatreau 2015). Olalekan et al., ont montré que la production d'IFN- γ par les cellules B était nécessaire à l'induction de l'arthrite induite par les proteoglycan, un modèle de l'arthrite polyrhumatoïde, chez les souris et induisait une augmentation du pourcentage de cellules Treg. De plus la production d'IFN- γ par les cellules B serait nécessaire pour inhiber la différenciation des Treg et/ou l'activation des cellules Th1 (Olalekan, Cao et al. 2015). Cependant, le rôle des cellules B productrices d'IFN- γ dans la SEP ou l'EAE n'est pas encore connu.

1.2.5.3 Présentation d'antigène

Les cellules B lient des antigènes grâce à leur BCR. Elles sont aussi des cellules présentatrices d'antigènes professionnelles (APC) capables d'internaliser les antigènes protéiques fixés sur leurs BCR et suite à des modifications de présenter des peptides grâce aux molécules de CMH II qu'elles expriment (Lanzavecchia 1985). Cela leur permet d'interagir avec des cellules T CD4 spécifiques pour ces peptides menant à leur activation. L'expression de molécules de costimulation comme CD80 ou CD86 est nécessaire pour que les cellules B jouent pleinement leur rôle d'APC et à l'activation des cellules T CD4 (Lanzavecchia 1985). Lorsque le BCR reconnaît et lie l'antigène pour lequel il est spécifique, une cascade de signalisation cellulaire va induire l'internalisation du BCR et de l'antigène par endocytose (Adler, Jiang et al. 2017). La vésicule ainsi formée va devenir un endosome, dont le pH va s'acidifier et permettre l'activation d'enzymes capables de cliver l'antigène en peptides pouvant se lier au CMH II. Ce complexe est transporté à la surface de la cellule B et peut rentrer en contact avec le TCR d'une cellule T CD4 spécifique pour l'antigène présenté (Adler, Jiang et al. 2017). La présentation d'antigène par les cellules B est nécessaire au développement de l'EAE, en effet les souris n'exprimant le CMH II spécifiquement sur les cellules B se sont avérées résistantes à l'induction de la maladie et présentaient une réponse diminuée des cellules Th1 et Th17 (Molnarfi, Schulze-Topphoff et al.

2013). De plus, la présentation d'antigènes par les cellules B joue un rôle important dans l'activation des cellules T CD4 autoréactives dans l'EAE (Parker Harp, Archambault et al. 2015). Chez les patients SEP, on observe une augmentation de l'expression du CMH II également de CD86, CD80 sur les cellules B dans le sang périphérique et de façon plus importante dans le LCR (Genc, Dona et al. 1997, Fraussen, Claes et al. 2016). De plus, les cellules B des patients SEP sont capables d'induire une réponse pro-inflammatoire des cellules T autoréactives *in vitro* grâce à leur rôle d'APC et à l'expression importante de molécules de co-stimulation (Fraussen, Claes et al. 2016).

1.3 Les barrières du SNC

1.3.1 Structure

1.3.1.1 Barrière hémato encéphalique

Le cerveau est l'organe avec les besoins en glucose les plus importants, l'apport en nutriments doit être constant ainsi que l'élimination des déchets. Une vascularisation très importante permet de répondre à ces besoins, elle possède des propriétés uniques qui la distinguent du reste de la vasculature de l'organisme. Les échanges entre le sang et le SNC sont contrôlés par la barrière hématoencéphalique (BHE), cette barrière est constituée par les cellules endothéliales qui forment la lumière des vaisseaux elles sont liées entre elles par des jonctions serrées et des jonctions adhérentes. Les cellules endothéliales reposent sur la membrane basale endothéliale dans laquelle se trouvent disséminés des péricytes. Ces derniers possèdent des extensions cellulaires qui recouvrent en partie la face abluminale des cellules endothéliales. L'espace périvasculaire se trouve entre la membrane basale endothéliale et la membrane basale parenchymale, on peut y trouver des macrophages. Les astrocytes jouent également un rôle très important, ils recouvrent la membrane basale parenchymale et peuvent libérer des facteurs solubles importants pour la régulation de la BHE. Les astrocytes sont un lien entre les neurones et la BHE.

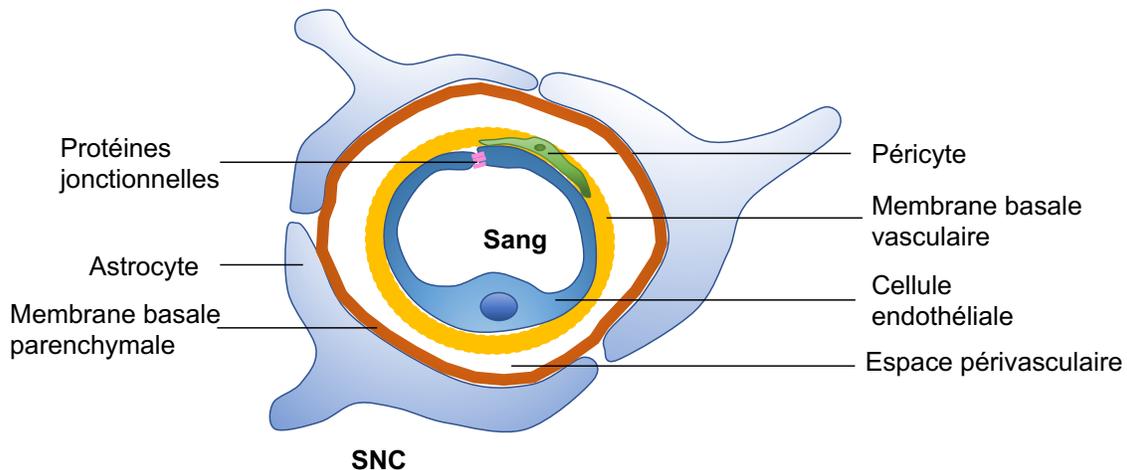


Figure 1 Schéma de la barrière hématoencéphalique

La BHE est constituée de cellules endothéliales entourées de deux membranes basales et d'un espace périvasculaire. Les cellules endothéliales sont liées entre elles par des jonctions serrées et des jonctions adhérentes qui maintiennent son étanchéité. Elles sont recouvertes par la membrane basale vasculaire qui contient des péricytes. L'espace périvasculaire sépare les membranes basales vasculaire et parenchymale, cette dernière est en contact avec les pieds astrocytaires qui jouent un rôle important dans la régulation de la BHE.

1.3.1.1.1 Cellules endothéliales

Les cellules endothéliales forment la lumière des vaisseaux, les capillaires les plus fins peuvent n'être formés que d'une cellule repliée sur elle-même (Coomber and Stewart 1985). Ce sont des cellules qui ne possèdent pas de fenestrations et qui présente un très faible taux de pinocytose, ce qui limite le transport transcellulaire. Les cellules endothéliales sont liées entre elles par des complexes moléculaires qui limitent le transport paracellulaire, les jonctions serrées et les jonctions adhérentes. Ceci induit une polarisation des cellules, avec un compartiment luminal et un abluminal.

1.3.1.1.2 Jonctions serrées

Les jonctions serrées sont formées par différents types de molécules transmembranaires (claudines, occludines, *junction adhesion molecule* (JAM)) qui sont liées par leur domaine intracellulaire à un réseau de protéines cytoplasmiques et au

cytosquelette. Et par leur domaine extracellulaire elles forment des liaisons homotypiques avec d'autres molécules de jonctions serrées sur les cellules adjacentes formant ainsi une barrière étanche (Huber, Egleton et al. 2001) qui bloque le transport paracellulaire de molécules hydrophiliques ou d'ions (Obermeier, Verma et al. 2016). Dans le compartiment intracellulaire d'autres molécules permettent de soutenir la structure des jonctions serrées. Les protéines de la famille *zonula occludens* (ZO1, ZO2, ZO3) sont importantes pour le bon placement des jonctions serrées, elles servent de support aux protéines impliquées dans la transduction de signaux intracellulaires (Huber, Egleton et al. 2001).

1.3.1.1.3 Jonctions adhérentes

Les jonctions adhérentes sont situées au pôle basal de la cellule et connectent les cellules endothéliales les unes aux autres. Elles sont formées par les molécules transmembranaires VE-cadherin et PECAM-1, qui sont elles-mêmes liées au cytosquelette grâce aux caténines (Stamatovic, Keep et al. 2008). PECAM-1 forme des liaisons homophiliques avec son ligand à la surface des cellules adjacentes (Hawkins and Davis 2005). Les jonctions adhérentes jouent un rôle important dans l'inhibition de contact, le remodellement vasculaire et la régulation de la perméabilité paracellulaire (Bazzoni and Dejana 2004, Hawkins and Davis 2005) et sont nécessaires au maintien de l'étanchéité de la BHE.

1.3.1.1.4 Membranes basales

Les vaisseaux sanguins sont entourés de deux membranes basales : la membrane basale vasculaire (MBV), en contact avec les cellules endothéliales et la membrane basale parenchymale (MBP), aussi appelée glia limitans perivascularis, au contact des pieds astrocytaires. La MBV est sécrétée par les cellules endothéliales et les péricytes tandis que la MBP est sécrétée par les astrocytes (Daneman and Prat 2015). Ces membranes basales sont composées de différentes familles de glycoprotéines : collagène IV, laminine, heparin sulfate proteoglycan, nidogen. Elles servent de point d'ancrage pour les cellules et sont impliquées dans la transmission de

signaux et dans le maintien des jonctions serrées (Hawkins and Davis 2005, Engelhardt and Sorokin 2009). Les membranes basales sont également des barrières supplémentaires pour le passage de molécules ou cellules (Daneman and Prat 2015).

1.3.1.1.5 Astrocytes

Les astrocytes sont des cellules gliales qui jouent un rôle essentiel dans le maintien de l'homéostasie du SNC. Ils sont impliqués dans de nombreux processus comme la formation de synapses, le recyclage de neurotransmetteurs, le contrôle de la réponse inflammatoire (Gee and Keller 2005). Les astrocytes sont également couplés aux neurones et régulent le flot sanguin en fonction de leurs besoins. Ils possèdent des prolongements polarisés venant recouvrir les vaisseaux sanguins qui sont en contact avec la MBP dans laquelle leurs pieds sont ancrés. Les astrocytes ne sont pas impliqués dans le développement de la BHE mais jouent un rôle dans son maintien et sa régulation par la sécrétion de différentes molécules (Broux, Gowing et al. 2015). Ils sécrètent différents facteurs qui augmentent l'expression des molécules des jonctions serrées (Obermeier, Verma et al. 2016) et aide au maintien de l'intégrité de la barrière.

1.3.1.1.6 Péricytes

Les péricytes se trouvent dans la MBV, donc reposent sur la face abluminal des cellules endothéliales qu'ils ne recouvrent pas totalement. Les vaisseaux du SNC sont ceux qui présentent le ratio de péricytes par cellules endothéliales le plus élevé (Armulik, Genové et al. 2011). Les péricytes n'exprimant pas de marqueur qui leur est spécifique ils sont plus difficiles à identifier et à étudier. Une de leur principale fonction est le contrôle du diamètre des vaisseaux, donc du flux sanguin, qu'ils peuvent influencer grâce à des protéines contractiles dans leur cytoplasme (Obermeier, Verma et al. 2016). Ils influencent la formation des jonctions serrées, ils diminuent la transcytose à travers les cellules endothéliales, augmentent l'efflux, limitent l'infiltration des cellules immunitaires participant ainsi au maintien des propriétés de la BHE (Dohgu, Takata et al. 2005, Armulik, Genové et al. 2010, Armulik, Genové et al. 2011,

Obermeier, Verma et al. 2016)

1.3.1.2 Barrière hématoméningée

Les méninges sont formées de trois couches distinctes qui recouvrent le SNC : la dure-mère (extérieure), l'arachnoïde (intermédiaire), la pie-mère (intérieure, au contact du SNC). Dans l'espace subarachnoïde se trouve le LCR. On y trouve des cellules immunitaires en conditions physiologiques et pathologiques. Chez les patients atteints de SEP des SLT peuvent être observées dans les méninges comme nous l'avons mentionné précédemment. Il se pourrait que les méninges soient une voie d'entrée et/ou sortie pour les cellules immunitaires, dont les cellules B (Michel, Touil et al. 2015). Cela est supporté par des études menées chez les animaux atteints d'EAE, les lymphocytes traversent la barrière hématoméningée avant l'apparition de l'inflammation du SNC et des symptômes. Il semble que les lymphocytes soient réactivés au niveau des méninges participant ainsi à l'initiation de la maladie (Bartholomäus, Kawakami et al. 2009, Mues, Bartholomäus et al. 2013, Michel, Touil et al. 2015). La structure de la barrière hématoméningée (BHM) est similaire à celle de la BHE, mais pas identique elle reste moins bien connue. Les cellules endothéliales expriment la P- et la E-Selectin à leur surface, ce qui n'est pas le cas des cellules endothéliales des vaisseaux du parenchyme cérébral (Kivisakk, Mahad et al. 2003, Holman, Klein et al. 2011). De plus, les vaisseaux dans les méninges ne sont pas recouverts de pieds astrocytaires comme dans le parenchyme (Allt and Lawrenson 1997, Michel, Touil et al. 2015).

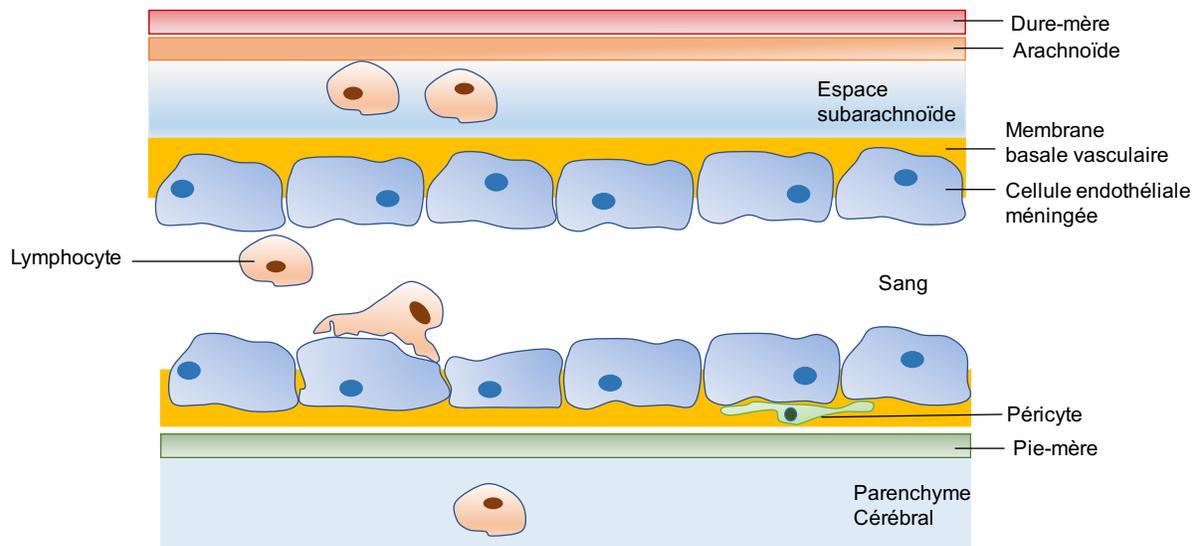


Figure 2 Schéma de la barrière hémato-méningée

La BHM est constituée de cellules endothéliales liées entre elles par des jonctions serrées et adhérentes permettant de maintenir l'étanchéité de la barrière. Les cellules endothéliales reposent sur la membrane basale vasculaire qui contient des péricytes. Elle se trouve au niveau de l'espace subarachnoïde dans lequel on trouve le LCR. La BHM est en contact avec la pie-mère qui est la couche des méninges au contact du parenchyme cérébral. On trouve des lymphocytes dans la circulation sanguine, mais également dans l'espace subarachnoïde et le parenchyme cérébral.

1.3.1.3 Barrière sang-LCR

Le plexus choroïde est le nom donné à une structure formant une barrière entre le sang et le LCR, elle est formée par des cellules épithéliales, liées par des jonctions serrées, responsables de la production du LCR. Les cellules épithéliales entourent des capillaires fenestrés permettant la diffusion de solutés depuis le sang vers le parenchyme (Michel, Touil et al. 2015). Les cellules épithéliales du plexus choroïde expriment les molécules d'adhésion *Intercellular cell adhesion molecule 1* (ICAM-1) et *Vascular cell adhesion molecule 1* (VCAM-1) de façon constitutive (Kleine and Benes 2006). Cela peut constituer une porte d'entrée vers le SNC pour les cellules immunitaires (Reboldi, Coisne et al. 2009).

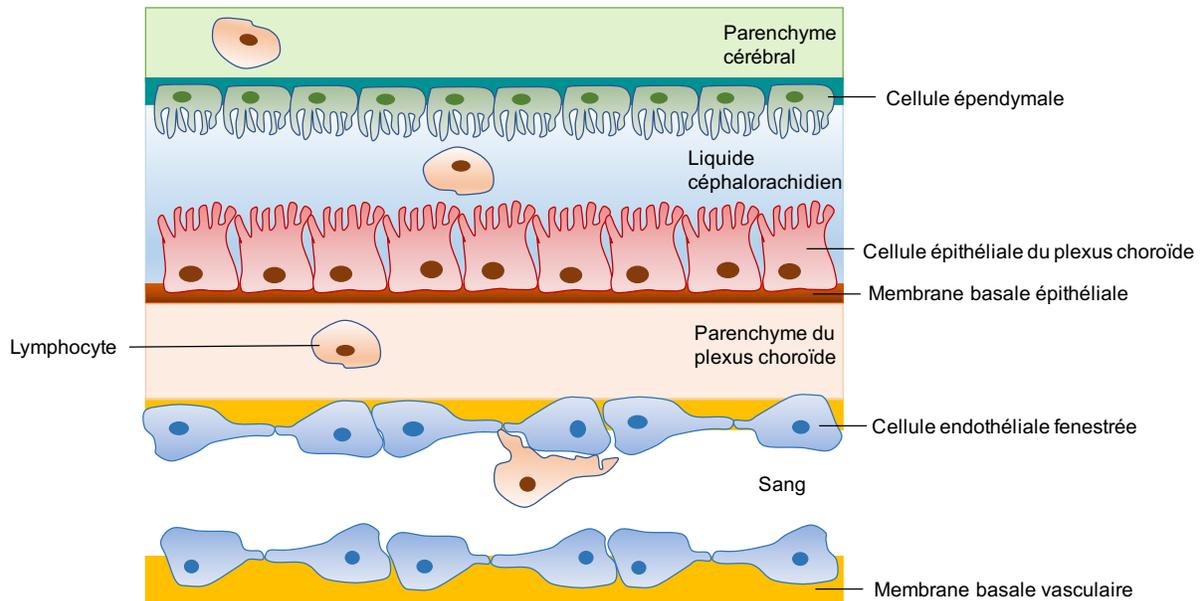


Figure 3 Schéma de la barrière sang-LCR

La barrière sang-LCR est constituée de cellules endothéliales fenestrées qui permettent la diffusion de molécules et la migration de cellules vers le parenchyme du plexus choroïde. La barrière étanche est formée par les cellules épithéliales du plexus choroïdes liées entre elles par des jonctions serrées, elles sont également responsables de la production de LCR. Les lymphocytes peuvent migrer à travers la barrière formée par les cellules épithéliales du plexus choroïde vers le LCR.

1.3.2 Perte de l'intégrité des barrières du SNC dans la SEP

En conditions inflammatoires, comme dans la SEP ou l'EAE, l'activation ou les dommages subis par les composants des barrières du SNC facilitent l'entrée de leucocytes menant à la formation de lésions (Alvarez, Cayrol et al. 2011). Les changements induits par l'inflammation de la BHE peuvent être distingués en deux catégories : la perte d'intégrité due à l'altération des jonctions intercellulaires et l'activation de la BHE qui se traduit par l'expression et la sécrétion de facteurs capables d'influencer la fonction et la survie des leucocytes pénétrant le SNC (Alvarez, Cayrol et al. 2011). Chez les patients atteints de SEP, les jonctions serrées et adhérentes sont endommagées ce qui cause une augmentation de la perméabilité de la BHE et donc

une augmentation de l'infiltration cellulaire ainsi que de facteurs solubles (Alvarez, Cayrol et al. 2011). Une perte de l'intégrité de la BHE pourrait survenir de façon précoce dans la SEP et permettre l'infiltration de leucocytes pathogéniques ainsi que de facteurs pro-inflammatoires qui induiraient la formation de lésions. Cela est soutenu par le fait que les lésions sont souvent localisées à proximité de vaisseaux dans le parenchyme avec une importante infiltration de leucocytes dans l'espace périvasculaire (Dendrou, Fugger et al. 2015). Notamment, on peut y trouver des cellules CD4 Th1, Th17 ou CD8 qui jouent un rôle important dans la démyélinisation (Kebir, Kreymborg et al. 2007, Ifergan, Kebir et al. 2008, Kebir, Ifergan et al. 2009, Alvarez, Cayrol et al. 2011). De plus, l'expression des molécules constituant les jonctions serrées et adhérentes est altérée dans les lésions des patients SEP (Plumb, McQuaid et al. 2002, Kirk, Plumb et al. 2003, Padden, Leech et al. 2007). Divers facteurs solubles influent sur la perméabilité de la BHE, des cytokines, chemokines ou *matrix metalloproteinases* (MMP) telles que : IL-1 β , IL-17, IL-22, IFN- γ , TNF- α , CCL-2, MMP-2, MMP-9. Ces facteurs peuvent être libérés par les leucocytes durant leur transmigration ou bien par les cellules endothéliales, les astrocytes qui vont être activés en réponse (Alvarez, Cayrol et al. 2011). Cela va mener entre autres à l'augmentation de l'expression de certaines molécules d'adhésion cellulaire (CAM) (ICAM-1, VCAM-1, *Activated leukocyte cell adhesion molecule* (ALCAM)) à la surface des cellules endothéliales, facilitant la migration des leucocytes vers le SNC (Alvarez, Cayrol et al. 2011).

1.3.3. Migration des leucocytes à travers les barrières du SNC

Le SNC a longtemps été considéré comme immunoprivilégié, on pensait que les cellules immunitaires de la périphérie n'y pénétraient pas dans des conditions physiologiques et que la surveillance immunologique était assurée uniquement par les cellules résidentes du SNC. Cette vision a changé, car des études ont démontré la présence de cellules immunitaires périphériques patrouillant dans le SNC en conditions physiologiques qui sont drainées vers des nœuds lymphatiques cervicaux grâce aux vaisseaux lymphatiques dans le SNC (Aspelund, Antila et al. 2015, Louveau, Smirnov et al. 2015). Mais cette surveillance est restreinte en raison de la présence des barrières du SNC qui limite et régule le passage des cellules (Carson, Doose et al.

2006). La migration de leucocytes à travers les barrières du SNC se déroule en 4 grandes étapes : le roulement, l'adhésion permise par l'activation des intégrines par des chemokines, l'adhérence ferme suivie de l'arrêt, la diapédèse (Engelhardt and Ransohoff 2012).

L'interaction de selectines avec leurs ligands, les intégrines ou les molécules d'adhésion cellulaire à la surface des cellules endothéliales, la présence de chemokines, de leurs récepteurs ainsi que de métalloprotéinases contrôle le passage des leucocytes à travers les barrières du SNC. Les cellules entrent en contact avec l'endothélium des vaisseaux au niveau des capillaires ou bien des veinules post-capillaires. Cette interaction est médiée par des molécules de la famille des selectines (L, E, ou P selectin) sur le leucocyte et leurs ligands glycosylés respectifs à la surface de l'endothélium. (Engelhardt and Ransohoff 2012) Après ce premier contact, le leucocyte va rouler à la surface de l'endothélium avec une vitesse réduite. Il peut alors lier des chimiokines, situées à la surface de l'endothélium ou secrétées par celui-ci, qui vont permettre l'activation d'intégrines par l'intermédiaire de récepteurs couplés aux protéines G. L'avidité et l'affinité des intégrines pour leurs ligands respectifs est alors augmentée, ce qui va induire l'arrêt de la cellule à la surface de l'endothélium. Le leucocyte se polarise et recherche un site où la diapédèse pourrait avoir lieu, il se déplace en général dans le sens contraire au flux sanguin. La diapédèse peut être paracellulaire, cela a lieu entre deux cellules endothéliales dont les jonctions serrées et jonctions adhérentes se séparent de façon synchronisée et temporaire, ou bien, elle peut être transcellulaire grâce la formation d'une structure similaire à un pore. Cette dernière voie est moins bien caractérisée que la première (Engelhardt and Ransohoff 2012). L'expression de différentes molécules d'adhésion qui sont probablement impliquées dans la migration des cellules immunitaires vers le SNC est augmentée de façon importante chez les patients SEP. Les différentes molécules impliquées dans les étapes de la migration sont bien connues pour les cellules T, mais cela n'est pas le cas pour les cellules B (Michel, Touil et al. 2015).

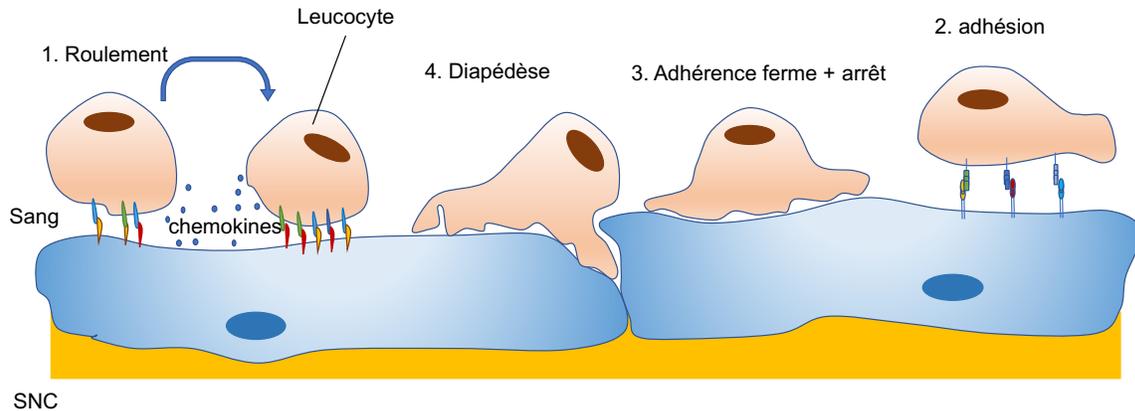


Figure 4 Schéma de la migration des leucocytes à travers les barrières du SNC

La migration des leucocytes à travers les barrières du SNC se déroule en plusieurs étapes. La première étape est l'interaction des selectines à la surface des leucocytes avec leurs ligands sur les cellules endothéliales c'est le roulement (1). La sécrétion de chimiokines par les cellules endothéliales va permettre l'activation des intégrines à leur surface, cela entraîne une augmentation de leur affinité et avidité pour leurs ligands et permet l'adhésion (2). Le leucocyte adhère alors fermement à l'endothélium grâce à l'interaction entre les intégrines et différentes CAM et il peut rechercher un site idéal pour la migration où il va s'arrêter (3). La diapédèse est l'étape finale, le leucocyte migre entre deux cellules endothéliales ou bien à travers une cellule.

1.3.2.1 Molécules impliquées dans la migration des cellules B à travers les barrières du SNC

1.3.2.1.1 VLA-4

L'intégrine α_4 - β_1 (VLA-4) est impliquée dans la migration des cellules T vers le SNC et un anticorps monoclonal anti-intégrine α_4 , le Natalizumab, a été développé pour bloquer ce processus. Des études ont montré que les cellules B *ex vivo* expriment VLA-4 de façon plus importante que les cellules T (Alter, Duddy et al. 2003, Niino, Bodner et al. 2006). Ainsi, les bénéfices du Natalizumab pour les patients pourraient être dus en partie à la diminution de la migration des cellules B vers le SNC. De plus, on observe une disparition partielle ou complète des OCB dans le LCR des patients, suggérant que la capacité de migration des cellules B est nécessaire au maintien des cellules plasmiques les produisant (Mancuso, Franciotta et al. 2014).

1.3.2.1.2 ICAM-1

ICAM,1 qui se lie à *lymphocyte function associated antigen 1* (LFA-1), est également impliqué dans la migration des cellules B (ainsi que des cellules T), on observe une diminution de la migration des cellules B à travers un modèle *in vitro* de la BHE en présence d'anticorps dirigés contre ICAM-1 (Alter, Duddy et al. 2003).

1.3.2.1.3 ALCAM

ALCAM est une molécule d'adhésion qui a fait l'objet de travaux dans le laboratoire du Dr Prat, elle promeut la migration des cellules T et des monocytes vers le SNC (Cayrol, Wosik et al. 2008). Elle est également présente à la surface des cellules B et favorise leur migration à travers un modèle *in vitro* de la BHE (Cayrol, Wosik et al. 2008). De plus, les cellules B ALCAM⁺ sont majoritairement des cellules B mémoires avec un profil pro-inflammatoire et leur fréquence est augmentée chez les patients SEP par rapport aux contrôles sains. ALCAM favorise la migration des cellules B à travers un modèle *in vitro* de la BHE et de la BHM et *in vivo* dans un modèle d'EAE actif (données du laboratoire non publiées). ALCAM joue donc un rôle important dans la migration de cellules B pro-inflammatoires et les cellules B ALCAM pourraient représenter une cible thérapeutique intéressante dans le traitement de la SEP

1.3.3 Comparaison de l'expression protéique des cellules B ALCAM⁺ et ALCAM⁻

Dr Laure Michel, post-doctorante dans le laboratoire du Dr Prat, a isolé des cellules B et séparé les cellules B ALCAM⁺ versus ALCAM⁻ de donneurs sains et elle a réalisé une comparaison protéomique des deux populations par spectrométrie de masse. Le but était de comparer l'expression protéique des deux groupes et d'identifier une ou des molécules possiblement impliquées dans la migration des cellules B à travers les barrières du SNC. Parmi les candidats, la galectin-3 a attiré notre attention, car elle est connue pour moduler l'inflammation et l'adhésion/migration cellulaire, mais elle a fait l'objet de peu d'étude dans le contexte de la SEP.

1.4 Galectin-3

1.4.1 Structure

La Galectin-3 est une protéine de 29 à 35 kDa, elle est codée par un gène, LGALS3 situé sur le chromosome 14, locus q21-q22. C'est une lectine qui appartient à la famille des Galectine. Cette famille de glycoprotéines comptant 15 membres est conservée au cours de l'évolution, elle a été décrite pour la première fois dans les années 1970 (de Waard, Hickman et al. 1976, Thiemann and Baum 2016). Les Galectines sont exprimées dans de nombreux tissus, elles sont caractérisées par un domaine C-terminal, de reconnaissance des carbohydrates et un domaine N-terminal collagen like. Les galectines ne possèdent pas de séquence signal permettant leur exportation par la voie classique de l'exocytose. En général, elles sont synthétisées dans le cytosol par des ribosomes libres et libérées dans le milieu extracellulaire par une voie d'exportation non classique qui ne passe pas par le réticulum endoplasmique ou l'appareil de Golgi (Mehul and Hughes 1997, Rabinovich, Baum et al. 2002).

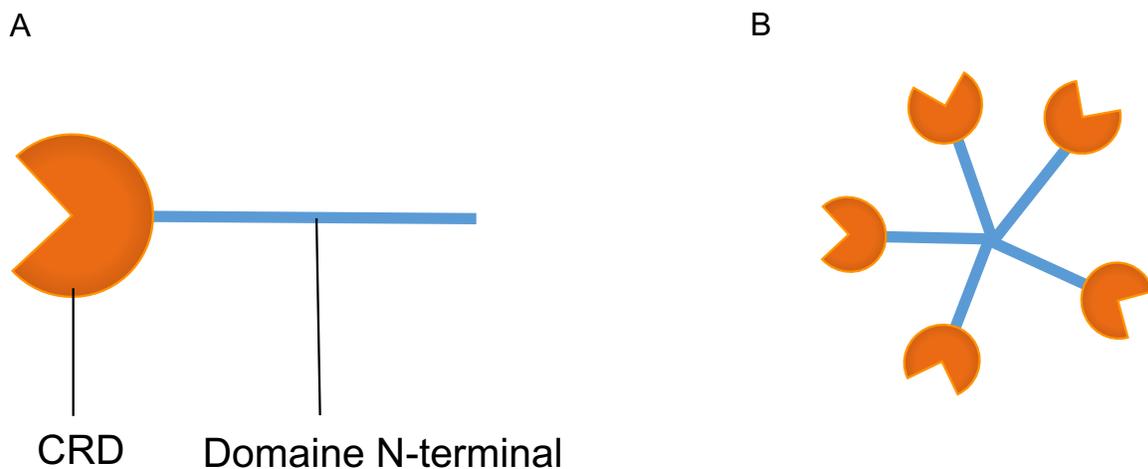


Figure 5 Schéma de la structure de la galectin-3

La galectin-3 est une protéine formée de deux domaines : un domaine de reconnaissance des carbohydrates (CRD) et un domaine N-terminal non-lectin. Elle peut être sous forme monomérique (A) ou bien elle peut former des pentamères en s'associant via son domaine N-terminal (B)

1.4.1.1 Domaine C-terminal

Le domaine CRD a une structure globulaire, il est formé de feuillets- β qui se replient en une structure de β -sandwich formant une poche capable de se lier aux ligands (Thiemann and Baum 2016). Les CRD des galectins partagent une séquence de résidus conservés, le motif NWGR (Asp-Trp-Gly-Arg), capable de reconnaître la lactosamine. Mais le reste de la séquence diffère permettant la liaison de ligands spécifiques à chaque galectin (Akahani, Nangia-Makker et al. 1997, Newlaczyl and Yu 2011).

1.4.1.2 Domaine N-terminal

Elle possède un domaine N-terminal non lectin qui est attaché au CRD, il est constitué de répétitions, contenant chacune une séquence consensus Pro-Gly-Ala-Tyr-Pro-Gly, suivi de trois acides aminés supplémentaires (Dumic, Dabelic et al. 2006). Le

domaine N-terminal est impliqué dans la sécrétion de la galectin-3 (Menon and Hughes 1999). Celle-ci peut former des multimères en s'associant via le domaine N-terminal ou bien CRD. L'association via le domaine N-terminal de pentamères est favorisée par la liaison de la galectin-3 à des ligands glycosylés à la surface cellulaire ou bien dans la matrice extracellulaire (Ahmad, Gabius et al. 2004, Thiemann and Baum 2016). En l'absence de ligand la galectin-3 peut former des dimères liés par leur CRD (Yang, Hill et al. 1998, Dunic, Dabelic et al. 2006).

1.4.2 Classification

Les galectins diffèrent par leurs structures et peuvent être classées en 3 groupes. Le premier groupe est constitué des galectins prototypes qui existent sous la forme de monomères ou de dimères non covalents liés par leur domaine CRD (galectin-1, -2, -5, -7, -10, -11, -13, -14). Le second groupe est celui des galectins à répétitions en tandem formées de deux domaines CRD sur une même chaîne polypeptidique (galectin-4, -6, -8, -9, -12). Le dernier groupe ne possède qu'un seul membre, la galectin-3, une galectin de type chimère. (Rabinovich, Baum et al. 2002).

1.4.3 Ligands de la Galectin-3

Des études d'affinité de liaison de la galectin-3 ont permis de déterminer qu'elle lie N-acetyllactosamine préférentiellement (Dunic, Dabelic et al. 2006), en conditions biologiques elle va se lier à des structures complexes O- ou N-glycosylées contenant ce sucre. La flexibilité du CRD peut également permettre à la galectin-3 de se lier à des structures glycosylées contenant du mannose (Thiemann and Baum 2016). De plus, elle peut former des liaisons protéine-protéine (Newlaczyl and Yu 2011). La liaison de la galectin-3 à un ligand va induire un changement de sa conformation (Umemoto, Leffler et al. 2003, Dunic, Dabelic et al. 2006). La phosphorylation de la sérine 6 réduit de façon importante l'affinité de la galectin-3 pour les sucres, cette modification agit comme un interrupteur « on-off » de son activité biologique (Mazurek, Conklin et al. 2000, Dunic, Dabelic et al. 2006). La liaison peut également être inhibée

par la présence de lactose qui va occuper le CRD et bloquer l'accès à d'autres ligands potentiels. Les ligands de la galectin-3 sont très divers dans leurs structures et leurs fonctions biologiques (Dumic, Dabelic et al. 2006).

1.4.4 Localisation de la Galectin-3

Durant l'embryogenèse humaine, la galectin-3 est localisée dans les tissus épithéliaux tels que la peau, l'épithélium pulmonaire et digestif, les voies respiratoires, l'épithélium des voies urinaires et des tubes d'excrétion rénaux, les cellules myocardiques, les chondrocytes, la notochorde, le foie (Van den Brule, Fernandez et al. 1997). De la même façon chez l'adulte, on trouve la galectin-3 dans les tissus épithéliaux, notamment les cellules endothéliales, mais également dans certaines cellules du système immunitaire comme les neutrophiles, éosinophiles, basophiles, mastocytes, cellules de Langherans, cellules dendritiques, monocytes, macrophages (Dumic, Dabelic et al. 2006).

À l'échelle cellulaire, la galectin-3 peut être localisée dans différents compartiments : le noyau, le cytoplasme, la membrane cellulaire, le milieu extracellulaire. Dans le cytoplasme elle interagit avec différents ligands, dont plusieurs sont impliqués dans la régulation de l'apoptose, de la prolifération cellulaire, de la différenciation, de la survie (Dumic, Dabelic et al. 2006). On trouve aussi de la galectin-3 dans le noyau cellulaire, bien qu'elle ne possède pas de séquence signal de localisation nucléaire. On ne connaît pas le mécanisme par lequel elle est transportée et maintenue dans ce compartiment, mais cela implique probablement le domaine N-terminal ainsi que le CRD. La galectin-3 est impliquée dans la régulation de la transcription génique par l'interaction avec des facteurs de transcriptions tels que CREB, β -catenin, l'épissage de pre-ARNm, l'assemblage du *spliceosome* (Dumic, Dabelic et al. 2006). Comme mentionné précédemment la galectin-3 ne possède pas de signal d'exportation extracellulaire, elle emprunte probablement une voie alternative la maintenant séparée de ses potentiels ligands trouvés dans le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi. La galectin-3 pourrait s'accumuler à la face cytoplasmique de la membrane plasmique et être libérée dans des vésicules ou

exosomes ou bien être transloquée à travers la membrane (Dumic, Dabelic et al. 2006). Des exosomes contenant de la galectin-3 ont été identifiés dans des cellules dendritiques. Ce sont de petites vésicules impliquées dans la présentation d'antigènes et la costimulation, mais dont le mécanisme d'action est encore méconnu (Thery, Boussac et al. 2001). Les vésicules contenant la galectin-3 pourraient être exportées à l'extérieur de la cellule et subir une lyse induisant la libération de leur contenu qui pourrait interagir avec la matrice extracellulaire ou bien des cellules.

Mais à ce jour, le ou les mécanismes impliqués dans l'exportation de la galectin-3 n'ont pas été identifiés. Ces vésicules pourraient également fusionner avec la membrane des cellules voisines et être internalisées (Thery, Boussac et al. 2001, Dumic, Dabelic et al. 2006). On peut la trouver à la surface cellulaire ou dans la matrice extracellulaire associée à différents ligands. Il est important de noter que la galectin-3 ne possède pas de domaine transmembranaire, elle est donc maintenue à la surface cellulaire par son interaction avec ses différents ligands (interaction protéine-protéine ou bien sucre-protéine). La galectin-3 possède de nombreuses propriétés autocrine et paracrine.

Type cellulaire	Localisation cellulaire		
	<u>Intracellulaire</u>	<u>Surface</u>	<u>Soluble</u>
Cellule B	-Favorise la différenciation en cellule plasmatique et bloque la différenciation en cellule mémoire -Inhibition de l'apoptose		
Cellule T	-Inhibition de l'apoptose	-Recrutement d'intégrines via CD98 -Augmentation du seuil d'activation	
Monocyte			-Induction de la production d'anion superoxyde -Action chimiotactique ou chimiokinétique
Macrophage			- Action chimiotactique
Neutrophile		-Augmentation de l'adhésion cellulaire	-Induction de la production d'anion superoxyde
Éosinophile	-Diminution de l'expression génique de l'IL-5	-Augmente le roulement et l'adhésion <i>in vitro</i>	
Cellule Dendritique		-Favorise l'adhésion aux cellules T	

Microglie	-Implication dans la phagocytose		
Thymocytes		-Bloque l'adhésion aux cellules de l'environnement	
Cellule de carcinome mammaire			-Recrutement et activation de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ -Induction de l'internalisation d'intégrines $\beta 1$
Cellule endothéliale			-Induction de la production de cytokines pro-inflammatoires via MCAM

Tableau 2 Rôles de la galectin-3 selon sa localisation cellulaire

Cette table décrit les rôles de la galectin-3 selon sa localisation cellulaire pour différents types de cellules.

1.4.5 Rôle de la galectin-3 dans l'adhésion et la migration cellulaire

La Galectin-3 peut s'associer à de nombreuses molécules jouant un rôle dans l'adhésion et la migration cellulaire comme des intégrines, cadhérines, certaines glycoprotéines et des protéines de la matrice extracellulaire, collagène IV, laminin, fibronectin, elastin, hensin, tenascin-C et -R (Hughes 2001, Ochieng, Furtak et al. 2002, Dumic, Dabelic et al. 2006, Fortuna-Costa, Gomes et al. 2014). La galectin-3 est impliquée dans le recrutement et l'activation de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ dans des cellules de carcinome mammaire (Lagana, Goetz et al. 2006), elle induit aussi le regroupement d'intégrines à la surface cellulaire via son interaction avec CD98, un marqueur exprimé à la surface des cellules B et T activées et des cellules endothéliales de la BHE. De

plus, la galectin-3 favorise l'adhésion cellulaire médiée par les intégrines possédant la sous-unité $\beta 1$ à la laminine et à la fibronectine.

La surexpression de la galectin-3 augmente l'adhésion des cellules tumorales et favorise leur migration, probablement grâce à l'interaction de la galectin-3 et de la matrice extracellulaire (Newlaczyl and Yu 2011). Elle possède d'autres ligands parmi les CAMs, notamment ALCAM et MCAM (Escoda-Ferran, Carrasco et al. 2014, Colomb, Wang et al. 2017). Elle se lie à MCAM à la surface des cellules endothéliales et induit la production de cytokines pro-inflammatoires par celles-ci (IL-6, G-CSF) (Colomb, Wang et al. 2017). On peut aussi mentionner que la galectin-3 interagit avec VCAM-1 et que cette interaction est importante pour le roulement et l'adhésion des éosinophiles *in vitro*, l'interaction homophile de la galectin-3 participe également au roulement (Rao, Wang et al. 2007). La galectin-3 est impliquée dans l'adhésion des neutrophiles à la laminine et aux cellules endothéliales (Kuwabara and Liu 1996, Sato, Ouellet et al. 2002). Elle intervient également dans l'adhésion entre cellules, par exemple, la liaison de lymphocytes T activés par la L-selectin aux cellules dendritiques (Swarte, Mebius et al. 1998). Des études *in vivo* chez des animaux KO galectin-3 réalisées avec différents modèles d'inflammation ont montré que la galectin-3 promouvait la migration des cellules immunitaires vers le site de l'inflammation (Thiemann and Baum 2011). Par exemple, elle favorise le roulement et la migration de leucocytes dans la microcirculation du muscle crémaster vers le site de l'inflammation (Gittens, Bodkin et al. 2017).

Cependant, la galectin-3 peut aussi agir comme un inhibiteur de l'adhésion dans certaines situations. C'est le cas dans le thymus où la galectin-3 produite localement inhibe les interactions entre les thymocytes et les cellules du micro-environnement (Dumic, Dabelic et al. 2006). De plus, elle induit l'endocytose des intégrines à sous-unité $\beta 1$ dans les cellules issues de carcinomes mammaires, ce qui bloque leur capacité d'adhésion ferme (Furtak, Hatcher et al. 2001). Ainsi, le rôle de la galectin-3 dans la régulation de l'adhésion, de la migration cellulaire est complexe et dépendant du contexte.

1.4.6 Influence de la galectin-3 sur la réponse immunitaire

La galectin-3 est capable de moduler la réponse immunitaire, aussi bien innée qu'adaptative avec des effets pro- ou anti-inflammatoire selon le contexte et le type cellulaire.

1.4.6.1 Immunité innée

La galectin-3 peut jouer un rôle pro-inflammatoire en augmentant la production d'IL-1 (cytokine pro-inflammatoire) induite par le LPS (Jeng, Frigeri et al. 1994). Elle peut également déclencher la production d'anion superoxyde par les monocytes et les neutrophiles du sang périphérique (Liu, Hsu et al. 1995, Yamaoka, Kuwabara et al. 1995). Chez ces derniers la galectin-3 peut déclencher une augmentation de leur activité phagocytaire (Feuk-Lagerstedt, Jordan et al. 1999, Dunic, Dabelic et al. 2006). La galectin-3, à une concentration de 1 μ M, attire les monocytes par chimiotaxie et induit un effet chimiokinétique, à des concentrations de 10-100nM (mouvements aléatoires sans direction) dans une expérience de migration *in vitro* (Sano, Hsu et al. 2000). La galectin-3 peut également avoir des effets anti-inflammatoires ou suppressifs sur l'immunité innée. Elle induit une inhibition de la production d'IL5 par les éosinophiles.

1.4.6.2 Immunité adaptative

En ce qui concerne l'immunité adaptative, les effets peuvent être pro- ou anti-inflammatoires. La galectin-3 intracellulaire bloque la différenciation des cellules B en cellules plasmiques mais favorise leur différenciation en cellules B mémoires (Acosta-Rodriguez, Montes et al. 2004). De plus, elle joue un rôle anti-apoptotique et favorise la prolifération de différents types cellulaires, notamment les néoplasmes à cellules B (Hoyer, Pang et al. 2004, Dunic, Dabelic et al. 2006, Hsu, Chen et al. 2009). Lorsqu'elle est extracellulaire, elle peut induire l'apoptose des cellules T via l'activation de la voie des caspases. Elle induit aussi la mort des thymocytes (Dhirapong, Lleo et al. 2009). La galectin-3 formerait des complexes en se liant aux chaînes glycosylées sur les TCR

et limiterait de cette façon leur mobilité. En absence de cette interaction, le seuil d'activation médiée par les TCR est diminué (Demetriou, Granovsky et al. 2001).

1.4.7 Rôles de la galectin-3 dans la neuroinflammation

La galectin-3 est exprimée dans le SNC par différents types de cellules gliales en conditions physiologiques, mais elle est également impliquée dans différents processus pathologiques neuroinflammatoires. L'ischémie cérébrale est caractérisée par l'activation des microglies. Les microglies activées impliquées dans la phagocytose de la myéline expriment la galectin-3 (Venkatesan, Chrzaszcz et al. 2010). Les microglies KO galectin-3 sont activées de façon moins importante et prolifèrent beaucoup moins (Doverhag, Hedtjarn et al. 2010, Lalancette-Hebert, Swarup et al. 2012), cela est accompagné d'une mort neuronale plus importante. Cela suggère que la galectin-3 est impliquée dans l'activation et la prolifération et la survie microgiale (Lalancette-Hebert, Swarup et al. 2012). Dans différents modèles de trauma de la moelle épinière ou du cerveau, on observe une augmentation importante de l'expression de la galectin-3 dans les premiers stades, mais aussi plus tardivement. La galectin-3 peut se lier aux *Toll like receptor 4* (TLR-4), qui est impliqué dans la neuroinflammation, l'inhibition des TLR-4 conduit à un meilleur pronostic neurologique.

Dans une étude, l'administration d'un anticorps anti-galectin-3 permet une diminution de l'expression de l'IL-1 β , IL-6, TNF- α , NOS₂ et favorise la neuroprotection. De plus, l'absence de galectin-3 chez les animaux KO a aussi eu un effet neuroprotecteur, mais n'a pas eu le même impact sur le profil inflammatoire des microglies (Yip, Carrillo-Jimenez et al. 2017). Cela pourrait être expliqué par le fait que la galectin-3 possède de nombreux rôles selon sa localisation et la cellule par laquelle elle est exprimée. Ainsi qu'on bloque la galectin-3 extracellulaire avec un anticorps n'induit pas les mêmes effets qu'un KO total, extra et intracellulaire (Yip, Carrillo-Jimenez et al. 2017). De plus la galectin-3 est exprimée par les macrophages et microglies dans des modèles d'infections virales ou de maladie à prion et semble jouer un rôle pro-inflammatoire (Shin 2013).

1.4.8 Rôles de la galectin-3 dans l'auto-immunité, l'EAE et la SEP

Le rôle de la galectin-3 dans les maladies auto-immunes reste mal défini, mais différents éléments mènent à penser qu'elle peut avoir un rôle dans le développement ou le maintien de certaines de ces maladies. L'arthrite rhumatoïde (RA) est causée par des cellules Th17 et un défaut dans le maintien de la tolérance par les cellules T CD4. Le processus inflammatoire mène à la destruction progressive des articulations. La galectin-3 jouerait un rôle pro-inflammatoire, les souris galectin-3 KO sont résistantes au développement de l'arthrite induite expérimentalement. Elles présentaient aussi des niveaux diminués d'IgG antigène spécifique et IL-6, TNF- α , IL-17, qui sont des cytokines pro-inflammatoires (de Oliveira, Gatto et al. 2015). Chez les patients RA l'ARNm et la protéine galectin-3 sont surexprimés dans les tissus inflammés proche des articulations et leur présence est fortement corrélée à la sécrétion d'IL-6, de GM-CSF, CXCL-8, MMP-3, TNF- α , CCL-2, CCL-3, CCL-5 (de Oliveira, Gatto et al. 2015).

1.4.8.1 EAE

L'EAE est le modèle expérimental le plus utilisé dans la recherche sur la SEP, au cours de la maladie l'expression de la galectin-3 est augmentée dans les microglies activées durant la phagocytose associée à la dégénérescence de la myéline au niveau de la moelle épinière et du nerf optique. Le traitement des animaux avec du GA permet de bloquer le développement de l'EAE, la démyélinisation ainsi que l'expression de la galectin-3 par les microglies et macrophages (Reichert and Rotshenker 1999). La galectin-3 favorise la phagocytose des débris de myéline. Lorsqu'elle est sécrétée, elle peut induire l'activation des microglies via les récepteurs TLR-4 et prolonger l'inflammation, mais elle est également nécessaire à la différenciation des oligodendrocytes et est impliquée dans le maintien de l'intégrité de la myéline ainsi que l'élimination des débris de myéline (Pasquini, Millet et al. 2011, Burguillos, Svensson et al. 2015). Le processus de remyélinisation est plus lent chez les souris KO galectin-3 (Hoyos, Rinaldi et al. 2014, Hoyos, Marder et al. 2016). D'autre part, l'absence de galectin-3 diminue la sévérité de l'EAE induit par la MOG₃₅₋₅₅, en effet les souris KO galectin-3 présentent un score significativement plus faible que les souris *wild type*. De

plus, cela est accompagné d'une baisse de la production d'IL-6, IL-17 et IFN- γ , des cytokines pro-inflammatoires. Dans le SNC de ces souris, la fréquence de cellules Treg est augmentée. Les cellules dendritiques produisent plus d'IL-10 et induisent une production plus importante d'IL-10 et IL-5 par les cellules T antigène spécifique. Dans le SNC l'infiltration cellulaire est diminuée et l'apoptose des cellules est augmentée (Jiang, Al Rasebi et al. 2009). Cela pourrait être dû à l'absence de galectin-3 intracellulaire qui joue un rôle anti-apoptotique.

1.4.8.2 SEP

Chez les patients atteints de SEP le niveau d'expression du gène de la galectin-3 est augmentée dans les lésions chroniques actives et chroniques inactives par rapport à la matière blanche d'apparence normale (MBAN), en comparaison aux contrôles sains. Au niveau protéique, l'expression de la galectin-3 est plus élevée dans les lésions chroniques actives en comparaison aux lésions chroniques inactives et à la MBAN. Son expression semble donc être associée avec une inflammation plus importante. La galectin-3 est exprimée dans les lésions entre autres par les macrophages, microglies et astrocytes au niveau nucléaire et cytoplasmique. Dans les lésions actives, l'expression de la galectin-3 est nettement augmentée dans les macrophages spumeux. On peut également la détecter dans les cellules endothéliales de la MBAN et des lésions actives, son expression n'est pas augmentée dans ces dernières (Stancic, van Horssen et al. 2011). Une étude récente a montré que la galectin-3 était une cible pour les anticorps autoréactifs chez les patients atteints de SPMS et de RRMS, les anticorps étaient présents dans le sérum chez 10 des 11 patients SPMS, 3 des 12 patients RRMS mais absents du sérum des patients atteints d'une autre maladie neurologique ou des contrôles sains (Nishihara, Shimizu et al. 2017). Ces anticorps ont la capacité de se lier à la galectin-3 se trouvant à la surface des cellules endothéliales immortalisées utilisées dans l'étude. Les anticorps dirigés contre la galectin-3 induisent une augmentation de l'expression de la molécule d'adhésion ICAM-1 et de la sous-unité p65 de NF- κ B, ces effets sont abolis par le traitement des cellules endothéliales avec un siRNA dirigé contre la galectin-3

(Nishihara, Shimizu et al. 2017). Les auteurs suggèrent que ces anticorps participent à la perte d'intégrité de la BHE chez les patients.

1.5 Hypothèse et objectifs

L'hypothèse que nous avons formulée est que la galectin-3 extracellulaire augmente la pathogénicité des cellules B, qu'elle est impliquée dans la migration de celles-ci à travers les barrières du SNC et qu'elle joue un rôle dans la SEP.

Pour valider cette hypothèse, nous avons défini les objectifs suivants :

1. Caractériser l'expression de la galectin-3 à la surface des cellules B de donneurs sains.
2. Évaluer la capacité des cellules B à produire de la galectin-3 *in vitro*.
3. Déterminer si les cellules B activées *in vitro* expriment la galectin-3 à la surface. Et évaluer l'influence de différentes cytokines sur l'expression de la galectin-3 ainsi que celle de cytokines produites par les cellules B *in vitro*.
4. Évaluer l'influence de la galectin-3 présente dans le milieu extracellulaire sur le profil d'expression de cytokines des cellules activées B *in vitro*.
5. Évaluer l'influence de la galectin-3 sur la migration des cellules B à travers des modèles *in vitro* de la BHE et BHM.
6. Déterminer si la galectin-3 est présente dans le LCR et le sérum des patients SEP.
7. Caractériser l'expression de la galectin-3 à la surface des cellules B des patients SEP et la comparer à celle des donneurs sains.

2 Matériel et Méthode

2.1 Isolation de cellules immunitaires à partir du sang périphérique

Des échantillons de sang veineux ont été obtenus de donneurs sains et de patients atteints de sclérose en plaques avec leur consentement et en accord avec les directives institutionnelles. Les cellules mononucléées ont été isolées à partir du sang.

Les cellules mononucléées du sang périphérique (PBMCs) sont isolées par centrifugation à travers un gradient de Ficoll-Paque™ (GE Healthcare). La centrifugeuse utilisée est une Sorvall® Legend T.

Un volume de sang mélangé à un volume de *Phosphate Buffer Solution* (PBS) 1X+ Éthylène Diamine Tétra-acétique (EDTA) 2mM sont déposés sur un volume de Ficoll-Paque™ (GE Healthcare™). La centrifugation à 1800 rotations par minute (rpm) durant 30 minutes à travers le gradient de Ficoll permet de séparer les différents types cellulaires selon leurs densités. Les PBMCs ont une densité inférieure à celle du Ficoll-Paque™ (GE Healthcare™) et se trouvent donc au-dessus de la couche de Ficoll. Tandis que les globules rouges, les granulocytes et les neutrophiles ont une densité supérieure à celle du Ficoll-Paque™ (GE Healthcare™) et se trouvent donc au-dessous. L'anneau de PBMC (GE Healthcare) est récupéré et lavé à deux reprises avec du tampon PBS 1X+2mM EDTA avec une centrifugation à 1500 rpm durant 10 minutes. Et une seconde centrifugation à 800 rpm durant 10 minutes permet d'éliminer les plaquettes et débris. Le culot de PBMCs est ensuite resuspendu dans 20mL de tampon PBS 1X+2mM EDTA. Une dilution 1/10 dans du Bleu de Trypan 0,1X est effectuée, 10µL de la suspension sont déposés dans l'Hémacytomètre afin de compter les cellules.

2.2 Isolation des cellules B à partir des cellules immunitaires

2.2.1 Isolation des cellules B pour stimulation in vitro

L'isolation des cellules B est effectuée grâce à des colonnes d'isolation MACS (Miltenyi™). On utilise du tampon MACS (PBS 1X, 2mM EDTA, 0.5% Foetal Bovine

Serum) à 4°C. Les PBMCs sont centrifugés à 1500rpm durant 10 minutes, puis resuspendus dans du tampon MACS à une concentration de 10^7 cellules pour 80 μ L de tampon. On incube avec 20 μ L de CD19 *MicroBeads* pour 10^7 cellules durant 15 minutes à 4°C. On lave les PBMCs avec 1 à 2mL de tampon MACS pour 10^7 PBMCs et on centrifuge à 1500 rpm durant 10 minutes. Puis on retire le surnageant et on resuspend les PBMCs à une concentration de 10^8 cellules pour 50 μ L de tampon MACS. Après avoir placé la colonne sur le support aimanté, on la lave avec 3mL de tampon MACS à 4°C. Puis on dépose les PBMCs sur la colonne, et on lave 3 fois la colonne avec 3mL de tampon MACS afin d'éliminer les cellules non couplées aux billes aimantées. On retire la colonne du support aimanté et on l'installe sur un tube de 15mL, on dépose 5 mL de tampon MACS dans la colonne. On récupère les cellules B CD19⁺ en faisant passer le tampon à travers la colonne à l'aide d'un piston.

2.2.2 Isolation des cellules B pour test de migration in vitro

Des cellules B ont été isolées à partir de PBMC avec le kit d'enrichissement de StemCell®, *B cells Enrichment kit (Negative Selection)* (Réf. 19054). C'est un kit qui permet une sélection négative, c'est-à-dire que les billes magnétiques se lient à toutes les populations cellulaires excepté les cellules B. Les PBMCs sont resuspendus dans du tampon EasySep (PBS 1X, 2mM EDTA, 0,5% SBF) à une concentration de $50 \cdot 10^6$ cellules/mL. Le cocktail d'enrichissement contenant les anticorps est ajouté à une concentration de 50 μ L/mL, on laisse incuber durant 10 minutes à température ambiante. Puis, on ajoute les billes magnétiques à une concentration de 75 μ L/mL, on mélange et on laisse incuber durant 5 minutes à température ambiante. On place le tube contenant les cellules dans le support aimanté (*BigEasy Magnet*) durant 5 minutes à température ambiante. Cela va permettre la séparation des cellules couplées aux billes magnétiques et des cellules d'intérêt qui ne le sont pas. En laissant le tube dans le support aimanté, on verse son contenu dans un nouveau tube de 15mL, la fraction récupérée est enrichie en cellules B. La pureté des cellules B a été mesurée par cytométrie de flux et était supérieure à 90%.

2.3 Mesure de la capacité d'adhésion de la galectin-3 exogène à la surface des cellules B

Les PBMCs sont resuspendus à une concentration de $2,5 \cdot 10^6$ cellules/mL dans du milieu de culture XVIVO™20 (Lonza™), pénicilline (50U/mL), streptomycine (50µg/mL) et glutamate (2mM). Pour étudier la capacité d'adhésion de la galectin-3 à la surface des cellules on incube les PBMCs durant 30 minutes à 37°C avec 100nM de galectin-3 recombinante humaine (Peptotech™, Réf. 450-38) ou avec du PBS. Puis on transfère les cellules dans une plaque 96 puits avec fond en « v ». On réalise un immunomarquage de surface des PBMCs.

2.4 Stimulation des cellules B

La stimulation des cellules B est faite dans 200µL de milieu de culture XVIVO™20 (Lonza™), pénicilline (50U/mL), streptomycine (50µg/mL) et glutamate (2mM). On a 300 000 cellules par puits, dans une plaque 96 puits à fond rond. Les cellules B sont cultivées en présence d'anti-BCR (10 µg/mL) (*Goat anti-human IgM* Jackson Immuno™, Réf. 109-006-129), de MegaCD40 Ligand (1µg/mL ou 100 ng/mL pour la stimulation en présence de cytokines) (Enzo Life Science™, Réf. ALX-522-110).

Pour étudier l'influence de diverses cytokines sur l'expression de la galectin-3 extracellulaire et certaines cytokines intracellulaires par les cellules B la cytokine spécifiée a été ajoutée : IL-4 (20ng/mL), IL-6 (20ng/mL), IL-23 (10ng/mL), TGF-β1 (20ng/mL), IL-17 (1ng/mL), IL-10 (20ng/mL). On stimule 2 jours à 37°C.

Pour étudier l'influence de la galectin-3 sur le profil d'expression de diverses cytokines par les cellules B, la concentration spécifiée de galectin-3 humaine recombinante (Peptotech™, Réf. 450-38) a été ajoutée : 1nM, 10nM, 100nM ou bien pas de galectin-3 pour la condition contrôle. On ajoute également de l'IL-4 (20ng/mL) chaque jour. On stimule les cellules B 1 ou 2 jours à 37°C.

2.5 Culture primaire de cellules endothéliales de la barrière hémato encéphalique et de la barrière hémato méningée

Les cellules de BHE et de la BHM sont isolées à partir de tissus non épileptiques selon un protocole établi par le laboratoire (Ifergan, Kebir et al. 2008).

2.6 Récolte des cellules endothéliales de la BHE ou de la BHM

Les cellules de la BHE ou BHM sont cultivées dans des flasques de culture cellulaire de 25cm² jusqu'à ce qu'elles soient confluentes. Le jour de la récolte, on les lave avec 5mL de PBS à 37°C, puis on aspire le PBS. On ajoute 2,5mL de PBS+EDTA 2mM, on incube 5 minutes à 37°C puis 5 minutes à température ambiante. On ajoute 1,5mL de Trypsine (préalablement diluée comme suit, 1 volume de trypsine pour 9 volumes de PBS), on incube durant 30 secondes puis on décolle les cellules endothéliales. On ajoute alors 5mL d'*Endothelial Cell Culture Media* (ECM) afin de diluer la trypsine et on transfère le contenu de la flasque dans un tube de 15mL. On centrifuge durant 10 minutes à 1500 rpm, la centrifugeuse utilisée est une Sorvall® Legend T.

2.7 Migration des cellules B à travers les cellules endothéliales de la BHE ou de la BHM

Pour les expériences de migration des cellules B à travers La BHE ou BHM on utilise des chambres Boyden. Ce sont des inserts en plastiques avec des pores de 3µm de diamètre que l'on dépose dans des plaques de cultures de 24 puits. Cela permet d'étudier la migration des cellules B en présence ou non de galectin-3. Les cellules endothéliales de la BHE ou de la BHM sont isolées et mises en culture à partir de tissus provenant du SNC humain, isolés lors de chirurgies, comme précédemment publié (Kebir, Kreymborg et al. 2007, Cayrol, Wosik et al. 2008, Ifergan, Kebir et al. 2008). Le premier jour, les cellules endothéliales sont récoltées et 30.000 cellules sont déposées dans un volume de 700µL d'ECM2 ou ECM2 modifié, par chambre Boyden. Les chambres Boyden ont préalablement été recouvertes d'une couche de gélatine.

Le milieu ECM2 et ECM2 modifié sont des milieux de culture pour cellules endothéliales. L'ECM2 contient 65% de milieu de culture 199 (source nutritionnelle de vitamines, d'acides aminés), 20% de surnageant de lignée cellulaire clone M3 (surnageant de lignée cellulaire murine cancéreuse, contient des facteurs favorisant la croissance des cellules endothéliales), 0,2% ITS 100X (Insuline, Transferrine, Sélénium), 5% de sérum humain, 10% sérum de veau fœtal, 0,13% d'ECGS (Endothelial Cell Growth Supplement), un facteur de croissance favorisant la croissance des cellules endothéliales. Le milieu ECM2 modifié contient 89,7% de milieu de culture 199, 1% de sérum de veau fœtal, 0,2% ITS 100X, 0,14% ECGS.

Les cellules endothéliales sont cultivées à 37°C durant 3 jours, période à l'issue de laquelle elles sont confluentes. Le test de migration en condition non inflammée a lieu après 3 jours. Pour réaliser le test dans des conditions d'inflammation, le troisième jour, on traite les cellules endothéliales avec IFN- γ (100 U/mL) et TNF- α (100 U/mL), dans de l'ECM3 modifié, durant 18 heures à 37°C. Et on dépose les cellules B dans les chambres Boyden le quatrième jour, après les avoir lavé deux fois avec de l'ECM3 modifié pour retirer l'IFN- γ et le TNF- α .

Les cellules B sont isolées avec le kit Human B cell Enrichment (StemCell™) comme décrit précédemment. Elles sont resuspendues dans 700 μ L du milieu ECM3 ou ECM3 modifié. Ce sont des milieux de culture pour cellules endothéliales. Le milieu ECM3 contient 65% de milieu de culture 199, 10% de sérum de veau fœtal, 5% de sérum humain, 0,2% ITS 100X (Insuline, Transferrine, Sélénium). Le milieu ECM3 modifié contient 89,8% de milieu de culture 199, 10% de sérum de veau fœtal, 0,2% d'ITS 100X (Insuline, Transferrine, Sélénium).

Pour étudier l'influence de la galectin-3 sur la migration des cellules B on ajoute la concentration spécifiée dans la chambre Boyden : 10nM, 100nM, 1000nM, PBS+ASB 0,1% (Albumine de sérum bovin). On dépose 1.10⁶ cellules B par chambre Boyden et on laisse migrer entre 20 heures et 24 heures. Puis on compte le nombre de cellules ayant migré dans la chambre inférieure avec un Hémacytomètre. Toutes les conditions testées ont été réalisées en triplicata pour chaque donneur lorsque cela était possible sinon en dupliqua.

2.8 Immunomarquage

2.8.1 Échantillons de sang total

Des échantillons de sang veineux ont été obtenus de 12 donneurs sains (âge moyen de 31,4 ans ($\pm 6,75$ ans)) consentants et de 32 patients atteints de sclérose en plaque (RRMS n=19 âge moyen de 54,9 ans ($\pm 11,13$ ans), SPMS n= 9 âge moyen de 56,4 ans ($\pm 4,2$ ans), PPMS n= 3 âge moyen de 58 ans (± 2 ans)) consentants, en accord avec les directives institutionnelles. Lors de la réception de l'échantillon, 1mL de sang total est mélangé avec 1mL de solution tampon FACS dans un tube de 10mL. Le sang est incubé durant 15 minutes à 4°C avec 66 μ L (1/15 de volume) de solution de blocage (5% sérum de rat + 5% sérum de souris dilué dans du tampon PBS) afin de saturer les sites aspécifiques (Fc γ récepteurs). Puis, on incube avec les anticorps de surface durant 30 minutes à 4°C. Les contrôles isotypiques adéquats ont été utilisés. Différentes combinaisons d'anticorps sont réalisées. La liste des anticorps de surface et contrôles isotypiques utilisés est décrite dans le **Tableau 2**. Les quantités d'anticorps utilisées pour le marquage ont été préalablement optimisées au sein du laboratoire.

Puis, les globules rouges sont lysés avec la solution BD™ Pharm Lyse (BD 555899). On incube l'échantillon sanguin avec 2mL de solution de lyse diluée 10 fois. L'incubation dure 15 minutes et se fait dans l'obscurité à température ambiante. L'échantillon sanguin est ensuite centrifugé à 1600 rpm durant 7 minutes avec une centrifugeuse Multifuge 3S-R, Heraeus. On retire le surnageant, puis on resuspend les cellules dans 2mL de tampon FACS (PBS 1X, 1% SBF, 0,5% Sodium Azide 20%) et on les centrifuge à nouveau. On répète cela jusqu'à ce que le surnageant soit clair. Les cellules marquées sont resuspendues dans 300 μ L de tampon FACS. L'acquisition se fait avec un cytomètre en flux (LSR II, BD Biosciences).

2.8.2 Cellules mononuclées du sang périphérique et cellules B

Après avoir isolé les PBMCs à partir d'échantillons de sang veineux de 11 donneurs sains (âge moyen de 28,9 ans ($\pm 4,1$ ans)) et 14 patients SEP (RRMS=9 âge moyen de 44 ans ($\pm 10,9$ ans), SPMS=3 âge moyen de 61 ans ($\pm 4,4$ ans), PPMS=2 âge

moyen de 53,5 ans ($\pm 6,4$ ans)). La centrifugeuse utilisée est une Multifuge 3S-R, Heraeus. Les cellules sont réparties dans une plaque de 96 puits avec fond en « v ». On lave les cellules avec 200 μ L de PBS, puis on centrifuge à 2000 rpm durant 3 minutes, on retire le surnageant. On répète le lavage. Les cellules sont incubées durant 20 minutes à 4°C dans 50 μ L une solution de blocage (5% sérum de rat, 5% sérum de souris dilué dans du tampon PBS) afin de saturer les sites aspécifiques (Fc γ récepteurs). Puis, on lave avec 150 μ L de PBS, et on centrifuge durant 3 minutes à 2000 rpm. Liste des anticorps de surface et isotypes contrôles utilisés voir **Tableau 4**.

Les cellules sont également marquées avec le kit Live Dead (Invitrogen, Réf. L34957). On incube les cellules dans un volume final de 50 μ L contenant les anticorps, Live Dead et du PBS durant 20 minutes à 4°C. Puis on lave avec 150 μ L de PBS, on centrifuge 3 minutes à 2000 rpm, on retire le surnageant. On répète le lavage avec 200 μ L de PBS. Après avoir retiré le surnageant on resuspend les cellules dans 200 μ L de tampon FACS. L'acquisition se fait avec un cytomètre en flux (LSR II, BD Biosciences).

A

Groupe	Nombre	Âge	Sexe
RRMS	19	54,9 ans ($\pm 11,13$ ans)	17 femmes 2 hommes
SPMS	9	56,4 ans ($\pm 4,2$ ans)	5 femmes 4 hommes
PPMS	3	58 ans (± 2 ans)	2 femmes 1 homme
Donneurs sains	12	31,4 ans ($\pm 6,75$ ans)	9 femmes 3 hommes

B

Groupe	Nombre	Âge	Sexe
RRMS	9	44 ans ($\pm 10,9$ ans)	8 femmes 1 homme
SPMS	3	61 ans ($\pm 4,4$ ans)	2 femmes 1 homme
PPMS	2	53,5 ans ($\pm 6,4$ ans)	2 hommes
Donneurs sains	11	28,9 ans ($\pm 4,1$ ans)	2 hommes 9 femmes

Tableau 3 Description des caractéristiques des patients et donneurs sains inclus dans les expériences d'immunomarquage

(A) Tableau récapitulatif des caractéristiques des patients et donneurs sains inclus dans l'expérience d'immunomarquage du sang total

(B) Tableau récapitulatif des caractéristiques des patients et donneurs sains inclus dans l'expérience d'immunomarquage des PBMCs

2.9 ELISA

L'enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) a été réalisé en suivant les instructions du manufacturier (R&D Systems, Human Galectin-3 DuoSet ELISA, Réf. DY1154). On incube 100µL de l'anticorps de capture dilué dans du PBS (2 µg/mL) dans une plaque 96 puits avec une haute capacité de liaison et fond plat durant la nuit. Le lendemain, on lave les puits deux fois avec du tampon de lavage (PBS 1X, 0,05% Tween[®] 20). Puis on dépose 300µL de diluent pour réactif (PBS 1X, 1% ASB) et on incube durant au moins 1 heure. Cela permet de saturer les sites aspécifiques. On répète les lavages. Puis on dépose le standard et les échantillons dilués avec le diluent pour réactif et on incube durant 2 heures. On répète les lavages. On ajoute 100µL d'anticorps de détection diluée dans le diluent pour réactif (25 ng/mL), on incube durant 2 heures. On répète les lavages. On dépose 100µL de Streptavidine-HRP (Streptavidine couplée à l'enzyme Horse Radish Peroxydase) diluée 1/200 dans du diluent pour réactif et on incube 20 minutes dans l'obscurité. On répète les lavages. On ajoute 100µL de solution substrat, on incube 20 minutes dans l'obscurité. Puis on ajoute 50µL de solution 2N H₂SO₄, cela permet de stopper la réaction enzymatique qui entraîne le changement de couleur. On détermine alors la densité optique aux longueurs d'onde 450nm et 540nm grâce à un lecteur de plaque.

2.9.1 Échantillons de LCR

Les échantillons de liquide céphalo-rachidien ont été obtenus de 18 patients, atteints de SEP et 11 d'autres maladies neurologiques (démence, neurosyphilis, encéphalopathie hypertensive, arrêt vasculaire cérébral, migraine, migraine avec lésions non spécifiques, névralgie trigeminale, sclérose latérale amyotrophique, ARSACS ou ataxie de Friedereich, tumeur de la glande pituitaire, syndrome de fatigue chronique), consentants ayant subi une ponction lombaire indiquée pour la clinique. Les échantillons ont été centrifugés 10 minutes à 1400 rpm, afin d'éliminer les cellules qu'ils peuvent contenir, puis on les a aliquoté et conservé à -80°C jusqu'à leur utilisation.

2.9.2 Échantillons de sérum

Les échantillons de sérum ont été obtenus de patients atteints de SEP (patients RRMS n=20 âge moyen de 41,9 ans ($\pm 10,9$ ans) ; patients RRMS en poussée n=19 âge moyen de 36,38 ans ($\pm 9,9$ ans) ; patients SPMS n=18 âge moyen de 60 ans ($\pm 7,6$ ans)), ou de donneurs sains (Donneurs sains n=22 âge moyen de 48,8 ans ($\pm 13,7$ ans)), consentants. Le sérum a été obtenu à partir de sang périphérique qui a été centrifugé à 1500 rpm durant 15 minutes dans un tube permettant de séparer le sérum des autres éléments du sang. Il a été aliquoté et conservé à -80°C jusqu'à son utilisation.

2.10 Classification des patients

Les patients inclus dans l'étude remplissent les critères révisés de McDonald 2010 de SEP (Polman, Reingold et al. 2011). Pour chaque prélèvement le consentement a été obtenu en accord avec les directions institutionnelles du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal.

2.11 Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été effectuées avec le logiciel GraphPad™ PRISM 6.0 (GraphPad™ Software). On a utilisé des :

- t-tests appariés pour la comparaison de deux groupes appariés suivant une distribution normale.
- Analyses de variance OneWay ANOVA pour étudier l'influence d'un facteur sur une variable entre trois groupes au moins qui suivent une distribution normale.
- Test de Mann-Whitney, test non paramétrique pour la comparaison de deux groupes qui ne suivent pas une distribution normale.
- Test de Kruskal-Wallis, test non paramétrique pour la comparaison d'au moins trois groupes qui ne suivent pas une distribution normale.

- T-tests non apparié, test pour la comparaison de deux groupes non appariés suivant une répartition normale
- Analyses de variance TwoWay ANOVA pour étudier l'influence de deux facteurs sur une variable entre trois groupes au moins qui suivent une distribution normale.

Les valeurs sont considérées significatives lorsque $p < 0,05$.

Tableau 4 Liste des anticorps

Compagnie	Marqueur	Fluorochrome	Référence
BD	CD19	V450	560353
eBioscience	CD8a	APC-eFluor®780	47-0088-42
BD	CD8	APC-Cy™7	557834
BD	CD4	PerCP-Cy™5.5	341654
BD	CD27	PE	555441
BD	CD38	FITC	560982
BD	IgD	PE-Cy™7	561314
BD	ALCAM (CD166)	BV786	564939
Biologend	Galectin-3	AF647	125408
BD	CD86	BV650	563412
BD	CD14	PE	555398
BD	CD80	FITC	557226
BD	CD3	FITC	555332
BD	CD20	V450	561164
Biologend	CD3	BV605	317322
Biologend	Galectin-3	AF488	125410
BD	IL-6	PE	559331
BD	GM-CSF	AF647	562257
BD	TNFa	PE-Cy™7	557647
BD	IFNg	AF700	557995
BD	mIgG1k	PE	555749
BD	mIgG1k	FITC	555748
BD	mIgG1k	BV786	563330
Biologend	rtIgG2ak	AF647	400526
BD	mIgG1k	BV650	563231
BD	mIgG1k	PE-Cy™7	557646
Biologend	rtIgG2ak	AF488	400525
BD	rtIgG2ak	PE	554689
BD	rtIgG2ak	AF647	557906

3 Résultats

3.1 La galectin-3 est absente de la surface des cellules B après l'isolation par gradient de Ficoll™

L'étude publiée par (Hoyer, Pang et al. 2004) a montré que les cellules B expriment la galectin-3 grâce à la technique d'immunobuvardage. Ils ont utilisé des protéines issues de lysat total de cellules B, ce qui ne permet pas de définir si la galectin-3 est exprimée à la surface de la cellule ou uniquement en intracellulaire. En premier lieu, afin de déterminer si la galectin-3 est présente à la surface des cellules B des donneurs sains nous avons isolé les PBMCs par gradient de Ficoll™ et réalisé un immunomarquage des cellules. Puis on a analysé l'expression de la galectin-3 à la surface des cellules B par cytométrie de flux (**Figure 6**). Le graphique de densité cellulaire CD19/Galectin-3 à la **Figure 4** est représentatif des résultats obtenus pour 15 donneurs sains, on utilise le contrôle isotypique pour la galectin-3 pour placer la fenêtre de sélection positive. Nos résultats montrent que les cellules B CD19⁺ *ex vivo* des donneurs sains ne présentent pas de galectin-3 à leur surface après l'isolation par gradient de Ficoll™.

3.2 La galectin-3 est présente à la surface des cellules B dans le sang total

3.2.1 Fréquence des cellules B CD19⁺ galectin-3⁺

La galectin-3 ne possède pas de domaine transmembranaire, elle est donc maintenue à la surface des cellules grâce à ses interactions avec ses différents ligands. Les liens qu'elle forme avec ces molécules pourraient ne pas être suffisamment forts pour maintenir la galectin-3 à la surface lors de l'isolation par gradient de Ficoll™. Cela pourrait expliquer pourquoi nous n'avons pas détecté la protéine à la surface des cellules B. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons immunomarcqué les cellules du sang total de donneurs sains. La stratégie de sélection des cellules B est décrite à la **Figure 7A, 7C**. L'analyse des résultats de cytométrie de flux montre qu'en moyenne

22,89% ($\pm 16,65\%$) des cellules B CD19⁺ totales expriment la galectin-3 à leur surface sur une cohorte de 12 donneurs sains.

De la même façon nous avons analysé l'expression de la galectin-3 à la surface des cellules T CD4⁺ et CD8⁺ des donneurs sains, il s'avère que cette expression est faible. En moyenne, 0,39% ($\pm 0,49\%$) des cellules T CD4⁺ et 2,65% ($\pm 2,98\%$) des cellules T CD8⁺ expriment la galectin-3 à leur surface (**Figure 7**). Les cellules B CD19⁺ expriment significativement plus de galectin-3 à leur surface que les cellules T CD4⁺ et CD8⁺ chez les donneurs sains (test de Kruskal-Wallis $p \leq 0,05$ *, $p \leq 0,0001$ ****). Nos résultats démontrent que la galectin-3 est présente à la surface des cellules B CD19⁺ et également à la surface des cellules T CD4 et CD8 dans une moindre mesure.

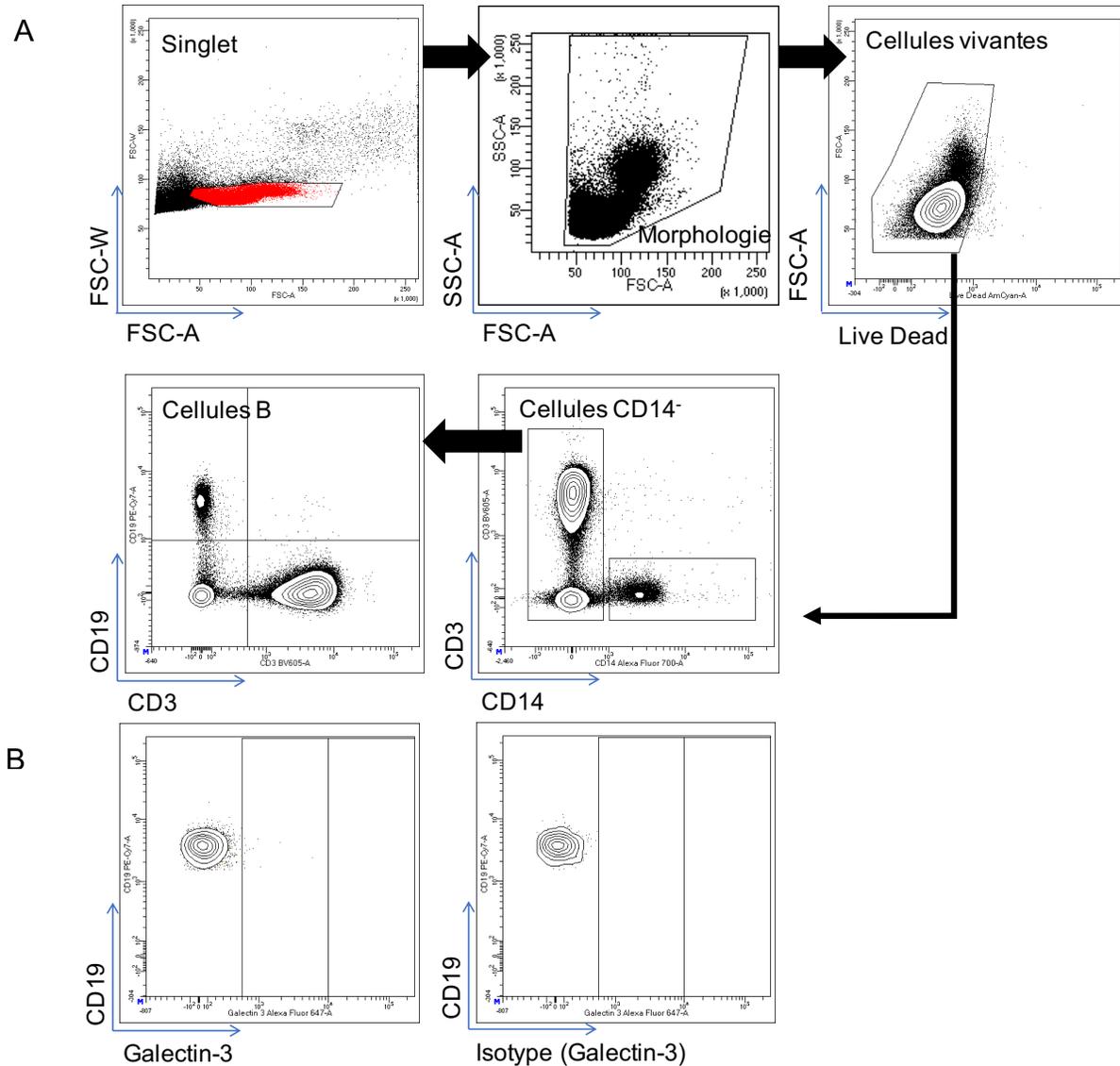


Figure 6 Expression de la galectin-3 par les cellules B CD19 de donneurs sains analysé par cytométrie de flux

(A) La stratégie de sélection consiste à cibler les cellules selon leurs caractéristiques de FSC et SSC. Les cellules sélectionnées sont les cellules seules (singlets). Parmi elles on sélectionne celles dont la morphologie est caractéristique des lymphocytes grâce au FSC/SSC. On conserve uniquement les cellules vivantes, puis les cellules CD14⁻. Parmi celles-ci on sélectionne les cellules B CD19⁺. (B) On utilise le contrôle isotypique de la galectin-3 pour placer la fenêtre de sélection positive. Les cellules B *ex vivo* isolées par gradient de Ficoll™ n'ont pas de Galectin-3 à leur surface. Le graphique de densité cellulaire CD19/Galectin-3 est représentatif des résultats obtenus pour N=15 donneurs sains.

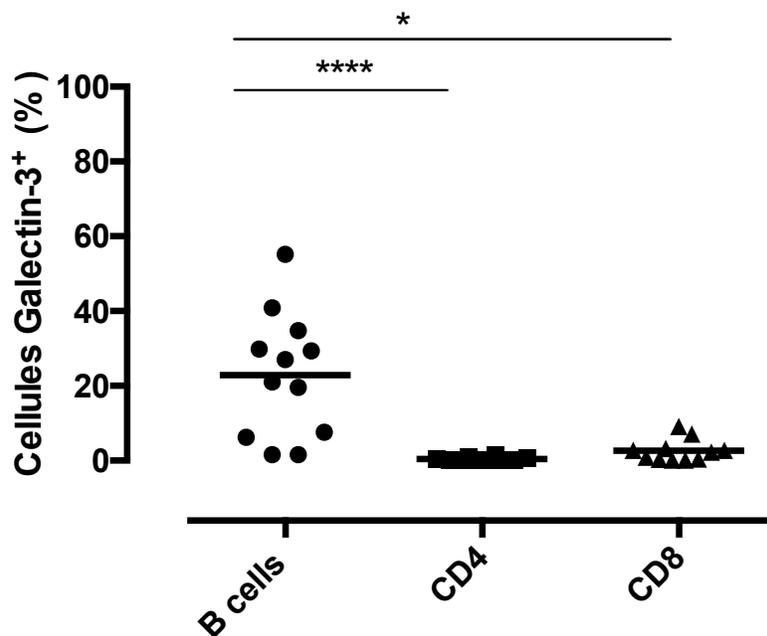


Figure 7 Expression de la galectin-3 à la surface des cellules B CD19+, T CD4+, T CD8+ dans le sang total des donneurs sains

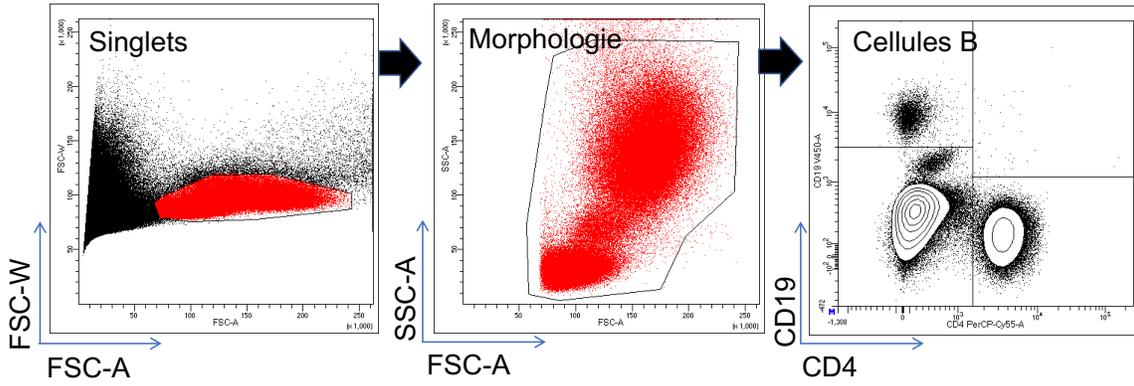
Graphique représentant le pourcentage de cellules B CD19⁺, cellules T CD4⁺, cellules T CD8⁺ dans le sang périphérique des donneurs sains. Chaque point représente un donneur. Le pourcentage moyen d'expression de la galectin-3 à la surface des cellules B CD19⁺ est 22,89% (±16,65%), des cellules T CD4⁺ est 0,39% (±0,49%), des cellules T CD8⁺ est 2,65% (±2,97%). Test de Kruskal-Wallis, $p \leq 0,05$ *, $p \leq 0,0001$ ****. Donneurs sains N=12.

3.2.2 Expression de la galectin-3 par les différents sous-types de cellules B

Par la suite, nous avons voulu caractériser l'expression de la galectin-3 à la surface des différents sous-types de cellules B CD19⁺ (**Figures 8, 9**). Pour cela, nous avons utilisé la combinaison de différents marqueurs comme décrits par (Claes, Fraussen et al. 2015) pour différencier ces groupes. Les cellules B transitionnelles (CD19⁺ CD38⁺ IgD⁺) sont des cellules immatures qui expriment encore CD38 et IgD. Elles vont maturer en cellules B naïves (CD19⁺ IgD⁺ CD27⁻) et perdre le marqueur CD38, mais elles n'ont pas encore acquis l'expression de CD27 qui caractérise les cellules B mémoires. Lorsqu'elles rencontrent l'antigène qui leur est spécifique, les cellules naïves vont proliférer et peuvent se différencier en plasmablastes (CD19⁺ CD27⁺ CD38⁺) ou en cellules plasmatisques (non incluses dans notre caractérisation) qui expriment à nouveau CD38. Les cellules naïves peuvent également acquérir un phénotype de cellules B mémoires suite à une réaction du centre germinatif. Les cellules mémoires peuvent conserver l'expression des IgD, on dit alors qu'elles sont *non class switched* (NCS) (CD19⁺ CD27⁺ IgD⁺). Ou bien, lorsqu'elles ont subi la commutation isotypique, elles perdent l'expression des IgD et peuvent alors produire des IgG, IgA, IgE, on les nomme alors cellules B mémoires *class switched* (CS) (CD19⁺ CD27⁺ IgD⁻). L'origine des cellules doubles négatives, n'exprimant ni IgD ni CD27, est moins bien définie et différentes hypothèses existent à ce sujet (Claes, Fraussen et al. 2016). Le contrôle isotypique de la galectin-3 a été utilisé pour placer la fenêtre de sélection positive et celle-ci est la même pour tous les sous-types de cellules B CD19⁺. Les plasmablastes et les cellules transitionnelles sont peu nombreux dans la circulation, l'analyse de ces populations est donc limitée par le nombre d'événements relativement faible enregistré lors de l'analyse par cytométrie de flux. L'analyse phénotypique des cellules B CD19⁺ exprimant la galectin-3 (**Figure 9**) a révélé les cellules transitionnelles étaient les cellules B avec le pourcentage d'expression moyen de la galectin-3 à la surface le plus élevé soit 82,16% ($\pm 27,29\%$), suivi par les cellules doubles négatives 36,27% ($\pm 19,73\%$), les cellules naïves 32,38% ($\pm 27,43\%$), les cellules mémoires CS 11,15% ($\pm 9,9\%$), les plasmablastes 10,07% ($\pm 13,67\%$), les cellules mémoires NCS 6,6% ($\pm 4,99\%$) (OneWay ANOVA, $p \leq 0,05$ *, $p \leq 0,01$ **, $p \leq 0,001$

, $p \leq 0,0001$ *). Cette expérience montre que l'expression de la galectin-3 à la surface des cellules B CD19⁺ des donneurs sains varie selon les sous-types. Il semble que les sous-types de cellules effectrices pro-inflammatoires, c'est-à-dire les cellules mémoires et plasmablastes, expriment moins de galectin-3 tandis que les cellules transitionnelles pour lesquelles un rôle anti-inflammatoire a été suggéré l'expriment de façon importante.

A



B

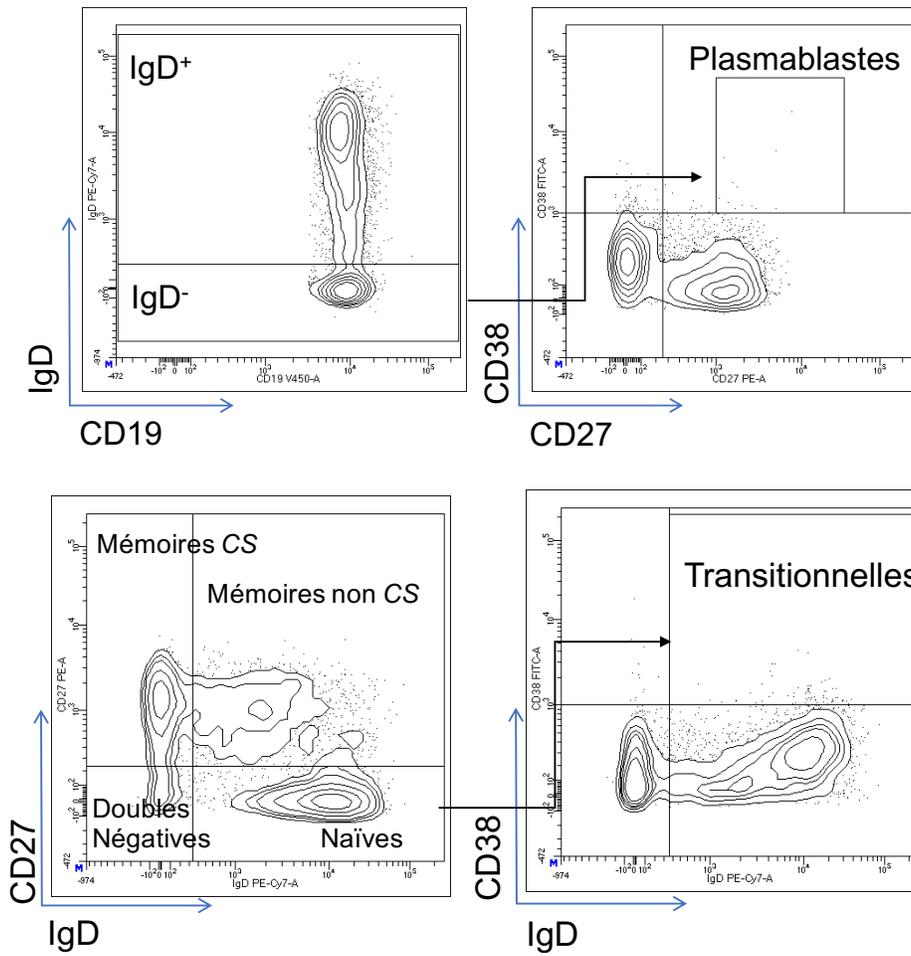


Figure 8 suite page 66

C

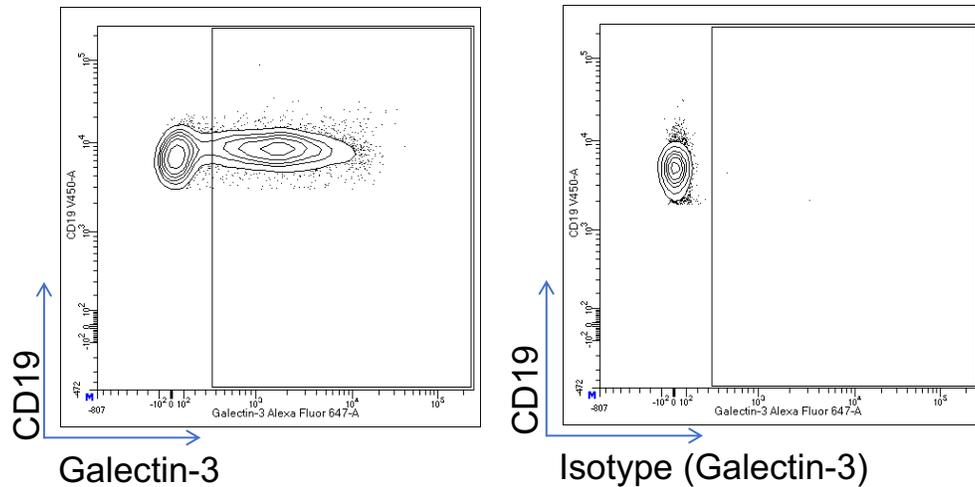


Figure 8 Stratégie de sélection pour l'analyse de l'expression de la galectin-3 par les sous-types de cellules B par cytométrie de flux

(A) La stratégie de sélection consiste à cibler les cellules seules (singlets), puis on sélectionne les cellules selon leur morphologie. (B) Parmi les cellules B $CD19^+$ on distingue 6 sous-types : Plasmablates ($CD19^+ IgD^- CD38^{++} CD27^{++}$), Doubles négatives ($CD19^+ CD27^- IgD^-$), Mémoires CS ($CD19^+ CD27^+ IgD^-$), Mémoires NCS ($CD19^+ CD27^+ IgD^+$), Naïves ($CD19^+ CD27^- IgD^+$), Transitionnelles ($CD19^+ CD27^- IgD^+ CD38^+$). (C) On mesure la proportion de cellules B exprimant Galectin-3 à la surface. Le contrôle isotypique est utilisé pour placer la fenêtre de sélection positive.

3.3 Les cellules B stimulées sont capables de produire la galectin-3 *in vitro*

Nos résultats montrent que la galectin-3 est présente à la surface des cellules B *ex vivo* dans le sang total des donneurs sains, mais qu'elle est retirée lors de l'isolation des PBMCs par gradient de Ficoll™. Bien que les mécanismes impliqués dans la sécrétion de la galectin-3 restent méconnus, de nombreuses études rapportent sa présence dans le milieu extracellulaire (Dumic, Dabelic et al. 2006).

Afin de déterminer si les cellules B sont capables de produire et libérer la galectin-3 nous avons mesuré la concentration en galectin-3 dans le surnageant de cellules B activées par ELISA (R&D™). On a isolé les cellules B CD19⁺ à partir des PBMCs de donneurs sains grâce à un kit d'isolation positive (Miltenyi™). Par conséquent, comme l'immunomarquage des PBMCs nous l'a montré, il est très probable que ce processus ait retiré la galectin-3 présente à la surface des cellules B. Elles ont été mises en culture durant 2 jours avec mCD40L et anti-BCR uniquement ou en combinaison avec IL-6, IL-23, TGF-β1, IL-4, IL-17, IL-10 respectivement. Le mCD40L et anti-BCR permettent d'induire l'activation des cellules B, ce protocole a été développé par l'équipe du Dr Bar-Or, il permet de générer des cellules B effectrices, ces cellules sécrètent des cytokines pro-inflammatoires (Li, Rezk et al. 2015). Cette condition sert de contrôle et nous permet d'évaluer l'influence des différentes cytokines sur la concentration en galectin-3 dans le milieu.

Comme le montrent les résultats de la **Figure 10** les cellules B activées sont capables de produire la galectin-3 et celle-ci est présente dans le milieu extracellulaire dans toutes les conditions évaluées. Bien que la concentration dans le milieu varie entre 948,6 pg/mL ($\pm 546,3$ pg/mL) pour la condition contrôle et 1115 pg/mL ($\pm 766,1$ pg/mL) pour la condition IL-4 il n'y a pas de différence significative. Cela suggère que les cellules B pourraient libérer la galectin-3. Cependant, lors de l'activation *in vitro* des cellules B une fraction d'entre elles meurent et leur contenu intracellulaire est relâché dans le milieu extracellulaire. Cela pourrait aussi expliquer la présence de galectin-3 dans le milieu extracellulaire.

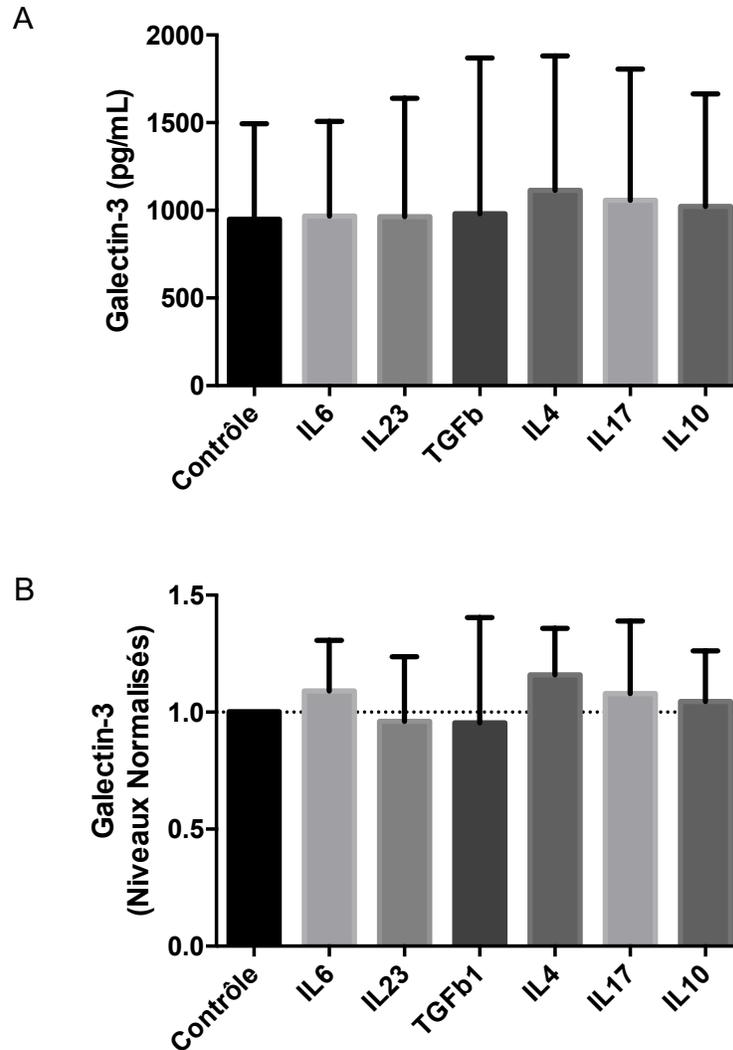
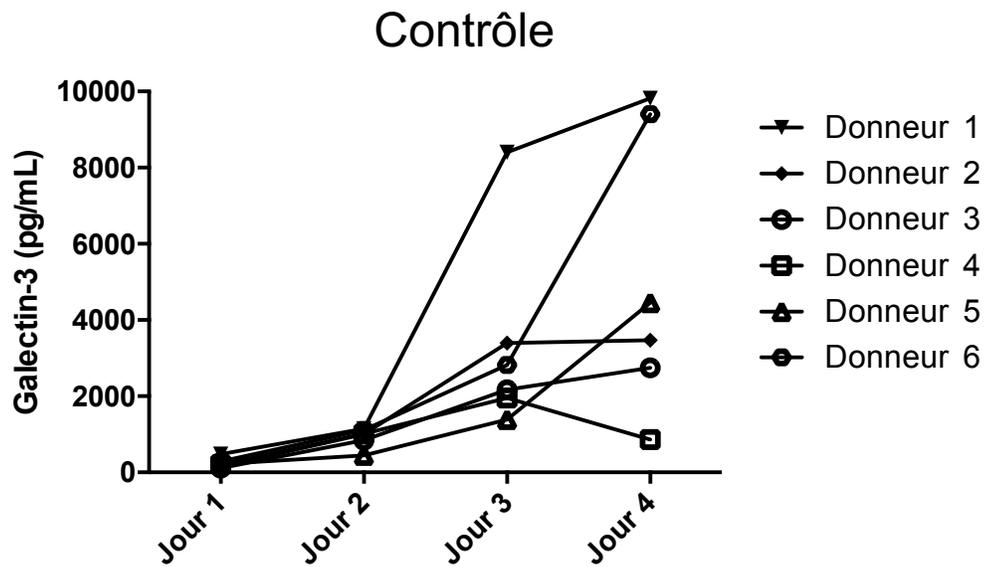


Figure 10 Mesure de la concentration en galectin-3 dans le surnageant des cellules B traitées avec différentes cytokines

(A) Graphique représentant la concentration en galectin-3 mesurée par ELISA dans le surnageant de cellules B stimulées durant 2 jours avec CD40L, anti-BCR et une des cytokines respectives : IL-6, IL-23, TGF- β 1, IL-4, IL-17, IL-10, ou sans cytokine ajoutée pour la condition contrôle. (B) Graphique représentant la concentration en galectin-3 dans le surnageant normalisée par rapport à la condition contrôle. La barre verticale représente la déviation standard. N=7 donneurs sains.

A



B

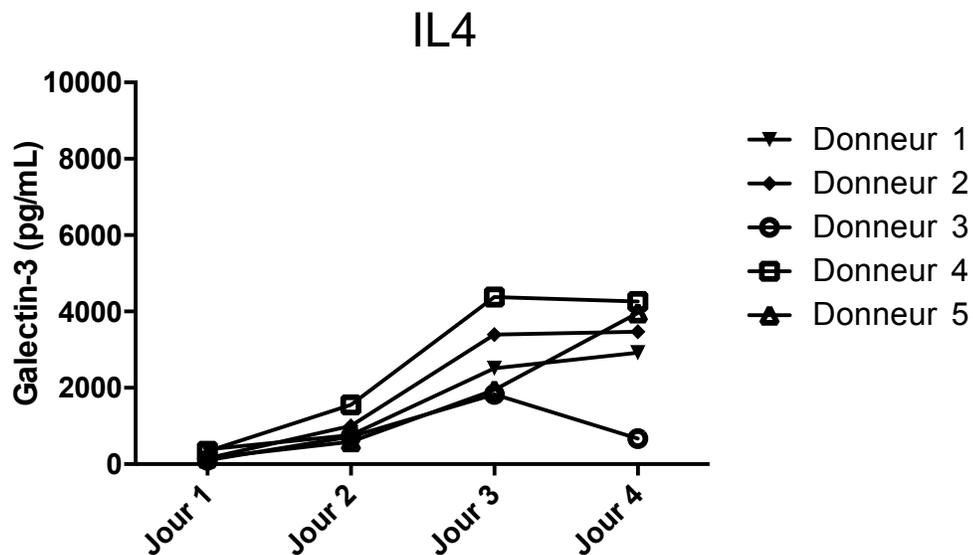


Figure 11 Évolution de la concentration en galectin-3 dans le surnageant des cellules B stimulées

Graphiques représentant l'évolution de la concentration en galectin-3 mesurée par ELISA dans le surnageant de cellules B stimulées avec CD40L, anti-BCR uniquement pour la condition Contrôle (A) ou avec IL-4 (B), entre 1 et 4 jours. Donneurs sains : (A) N=6, (B) N=5

Les résultats sont représentatifs d'une cohorte de 7 donneurs sains, la variabilité entre les donneurs est importante, ce qui pourrait expliquer l'absence de différence. On peut aussi supposer qu'une période de 2 jours en culture ne soit pas suffisante pour mettre en évidence une différence entre les conditions.

Nous avons donc choisi de comparer sur une période de temps plus longue la condition la plus proche d'une différence significative avec le contrôle après 2 jours. Il s'agit de la condition IL-4. On a donc isolé comme décrit précédemment les cellules B de donneurs sains et on les a laissés en culture durant 4 jours au lieu de 2 (**Figure 11**). On constate que la concentration en galectin-3 augmente dans le temps pour les deux conditions. La comparaison de l'aire sous la courbe des données groupées pour chaque jour entre les conditions contrôle et IL-4 montre qu'il n'y a pas de différence significative entre les deux groupes (Test de Mann-Whitney).

Cette expérience démontre que les cellules B sont capables de produire la galectin-3 lorsqu'elles sont activées *in vitro* et que celle-ci est présente dans le milieu extracellulaire. Cela pourrait être dû à la libération de la galectin-3 par les cellules B mais la concentration dans le milieu extracellulaire n'est pas affectée par la présence de diverses cytokines qu'elles soient pro- ou anti-inflammatoires. Enfin, il se pourrait que la galectin-3 présente dans le milieu extracellulaire ait été relâchée par des cellules mortes.

3.4 La galectin-3 est présente à la surface des cellules B activées *in vitro*

Nous avons établi que la galectin-3 était produite et sécrétée par les cellules B activées *in vitro*. Par la suite, nous avons cherché à savoir si la galectin-3 était présente à la surface des cellules B activées, ainsi qu'à évaluer l'influence de différentes conditions sur l'expression de la galectin-3 et de différentes cytokines par les cellules B. Pour cela nous avons analysé par cytométrie de flux des cellules B stimulées durant 2 jours avec mCD40L, anti-BCR uniquement pour la condition contrôle ou en combinaison avec IL-6, IL-23, TGF- β 1, IL-4, IL-17, IL-10 respectivement. Après deux

jours de stimulation, les cellules B ont été récoltées et restimulées durant 4 heures avec PMA, Ionomycin, GolgiPlug™. Après cela elles ont été immunomarquées et analysées par cytométrie de flux. On a choisi un anticorps dirigé contre le marqueur CD20 pour identifier la population de cellules B car nous avons utilisé un kit d'isolation positive (Miltenyi™) contenant des billes magnétiques qui se fixent sur le marqueur CD19. Les billes pourraient gêner la liaison de l'anticorps anti-CD19 et biaiser les résultats de l'analyse par cytométrie de flux. La stratégie de sélection des cellules est décrite à la **Figure 12**.

L'analyse montre que les cellules B CD20⁺ peuvent exprimer la galectin-3 à la surface, en moyenne le pourcentage de cellules B CD20⁺ exprimant la galectin-3 pour la condition contrôle est 2,93% ($\pm 2,92\%$), pour la condition IL-6 est 3,15% ($\pm 3,12\%$), pour la condition IL-23 est 3,07% ($\pm 3,15\%$), pour la condition est TGF- β 1 6,13% ($\pm 6,08\%$), pour la condition IL-4 est 6,23% ($\pm 5,74\%$), pour la condition IL-17 est 2,9% ($\pm 2,96\%$), pour la condition IL-10 est 4,25% ($\pm 4,07\%$). La stimulation des cellules en présence d'IL-4 induit une expression significativement plus élevée de la galectin-3 à la surface et on constate une tendance similaire en présence de TGF- β 1 (OneWay ANOVA, $p \leq 0,05$ *) (**Figure 13A, 13B**).

De plus, nous avons effectué un immunomarquage intracellulaire afin d'étudier l'expression de certaines cytokines par les cellules B. La stratégie de sélection est décrite à la **Figure 12**. Selon les conditions de stimulation, l'expression des cytokines par la population CD20⁺ globale varie (**Figure 14**). L'expression d'IL-6 est augmentée en présence d'IL-4 et réduite en présence d'IL-6 ou IL-23 par rapport au contrôle. L'expression de TNF- α est augmentée en présence d'IL-4 et diminuée en présence d'IL-10 par rapport au contrôle. L'expression du GM-CSF est augmentée en présence de TGF- β 1 et diminuée en présence d'IL-17 et IL-10 (OneWay ANOVA, $p \leq 0,05$ *, $p \leq 0,01$ **). Si on considère la population CD20⁺ globale, lorsque l'expression de la galectin-3 à la surface est augmentée, les cellules ont un profil davantage pro-inflammatoire.

Nous avons par la suite comparé pour chaque condition le profil d'expression de cytokines des cellules CD20⁺ galectin-3⁺ (Gal-3⁺) à celui des cellules CD20⁺ galectin-3⁻ (Gal-3⁻) afin d'évaluer si les cellules exprimant la galectin-3 étaient plus pro-

inflammatoires ou non. L'analyse des résultats de cytométrie de flux montre qu'il n'y a pas de différence entre les cellules Gal-3⁺ et Gal-3⁻ en ce qui concerne l'expression des cytokines IL-6 et TNF- α . En revanche, les cellules Gal-3⁺ produisent plus de GM-CSF, excepté lorsque les cellules sont stimulées en présence de TGF- β 1, bien qu'il semble y avoir une tendance similaire (**Figure 15**). Lorsque les cellules sont stimulées en présence d'IL-6, IL-23 ou IL-17 on observe que les cellules Gal-3⁺ produisent plus d'IFN- γ que les cellules Gal-3⁻ (t test apparié, $p \leq 0,05$ *, $p \leq 0,01$ **). Cette expérience démontre que les cellules B CD20⁺ activées *in vitro* sont capables de sécréter la galectin-3 comme mentionné précédemment et que celle-ci peut se lier à leur surface. De plus, les cellules B CD20⁺ présentant la galectin-3 à la surface ont un profil davantage pro-inflammatoire que les cellules Gal-3⁻, elles produisent plus de GM-CSF dans presque toutes les conditions testées et plus d'IFN- γ en présence des cytokines pro-inflammatoires IL-6, IL-23, IL-17.

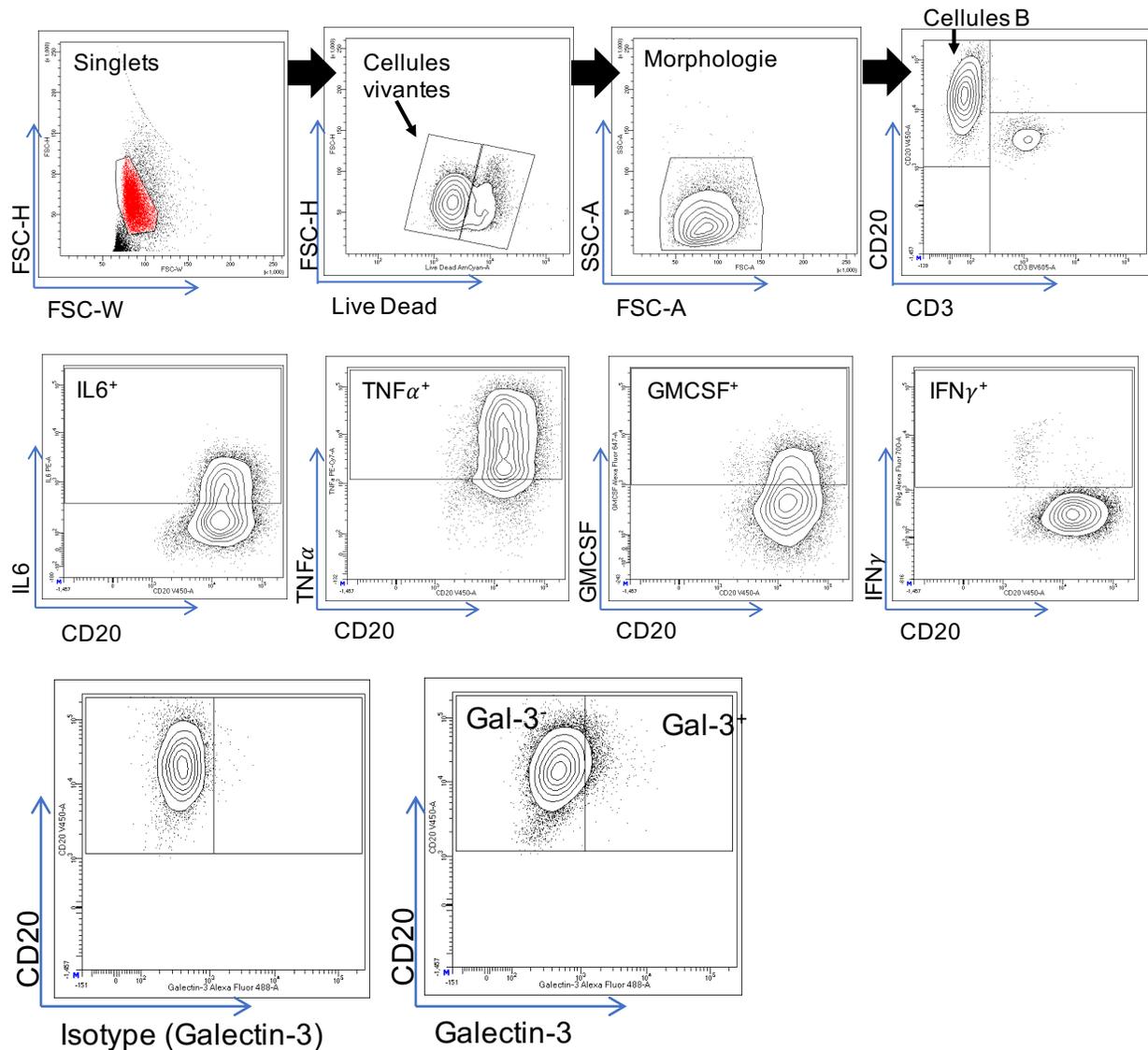


Figure 12 Stratégie de sélection pour l'analyse par cytométrie de flux de l'expression de la galectin-3 et de cytokines par les cellules B stimulées *in vitro*

Les cellules B ont été isolées à partir des PBMCs de donneurs sains à l'aide d'un kit de sélection positive pour les cellules CD19⁺. Les cellules sont stimulées durant 2 jours avec mCD40L, anti-BCR et une des cytokines respectives : IL-6, IL-23, TGF-β1, IL-4, IL-17, IL-10, ou sans cytokine ajoutée pour la condition contrôle. Puis elles sont restimulées durant 4 heures avec PMA, Ionomycin, GolgiPlug™ et immunomarquées. L'expression des cytokines est mesurée par cytométrie de flux. Les graphiques ci-dessus représentent la stratégie de sélection des cellules B par cytométrie de flux. On sélectionne les cellules seules (singlets), puis parmi celles-ci les cellules vivantes. On cible ensuite les cellules selon leur morphologie (FSC/SSC). On sélectionne ensuite

les cellules B CD20⁺ et on étudie l'expression de la galectin-3 à leur surface, ainsi que des cytokines, IL-6, TNF- α , GM-CSF, IFN- γ en intracellulaire. On utilise les contrôles isotypiques appropriés afin de placer les fenêtres de sélection positives. Graphiques représentatifs de la condition contrôle pour N=6 donneurs sains après 2 jours de stimulation et 4 heures de restimulation.

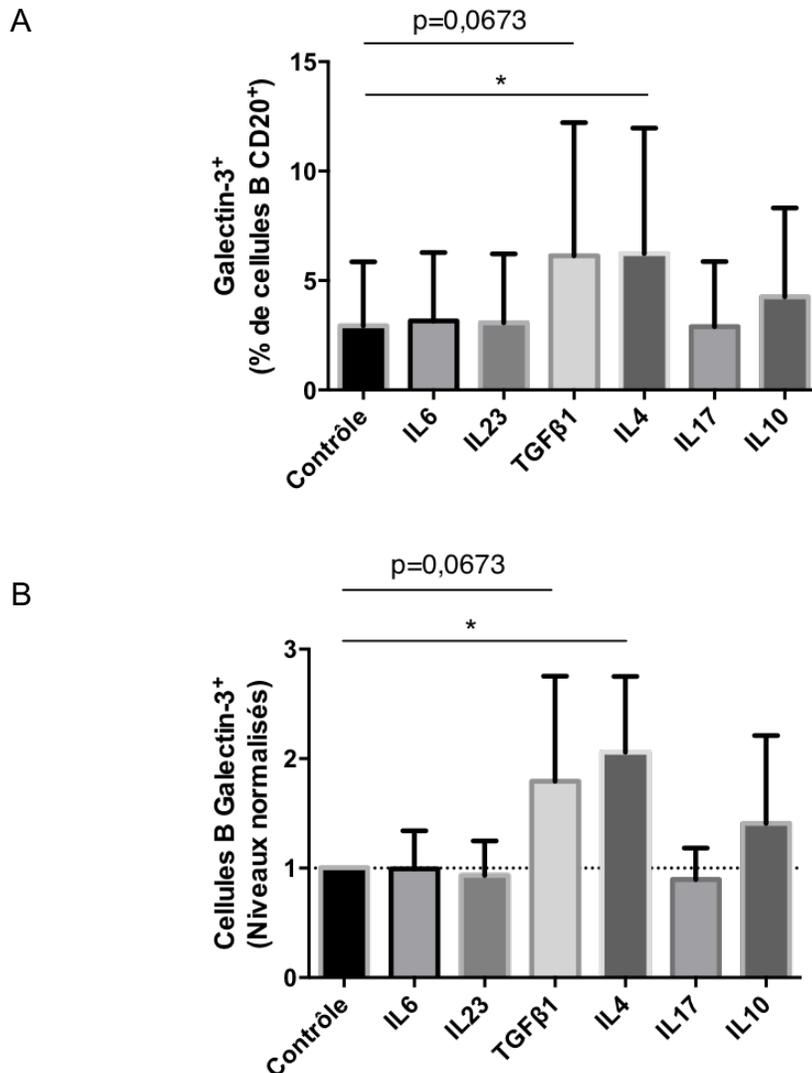


Figure 13 Influence de différentes cytokines sur l'expression de la galectin-3 à la surface des cellules B CD20 stimulées durant 2 jours *in vitro*

Les cellules B ont été isolées et stimulées comme décrit à la Figure 9. L'expression de la galectin-3 est mesurée par cytométrie de flux. (A) Graphique représentant le pourcentage de cellules B CD20⁺ exprimant la galectin-3 à leur surface. (B) Graphique représentant l'expression normalisée de la galectin-3 à la surface des cellules B CD20⁺ pour les différentes conditions. L'expression est normalisée par rapport à la condition contrôle. La barre verticale représente la déviation standard. OneWay ANOVA, $p \leq 0,05$ *. N=6 donneurs sains.

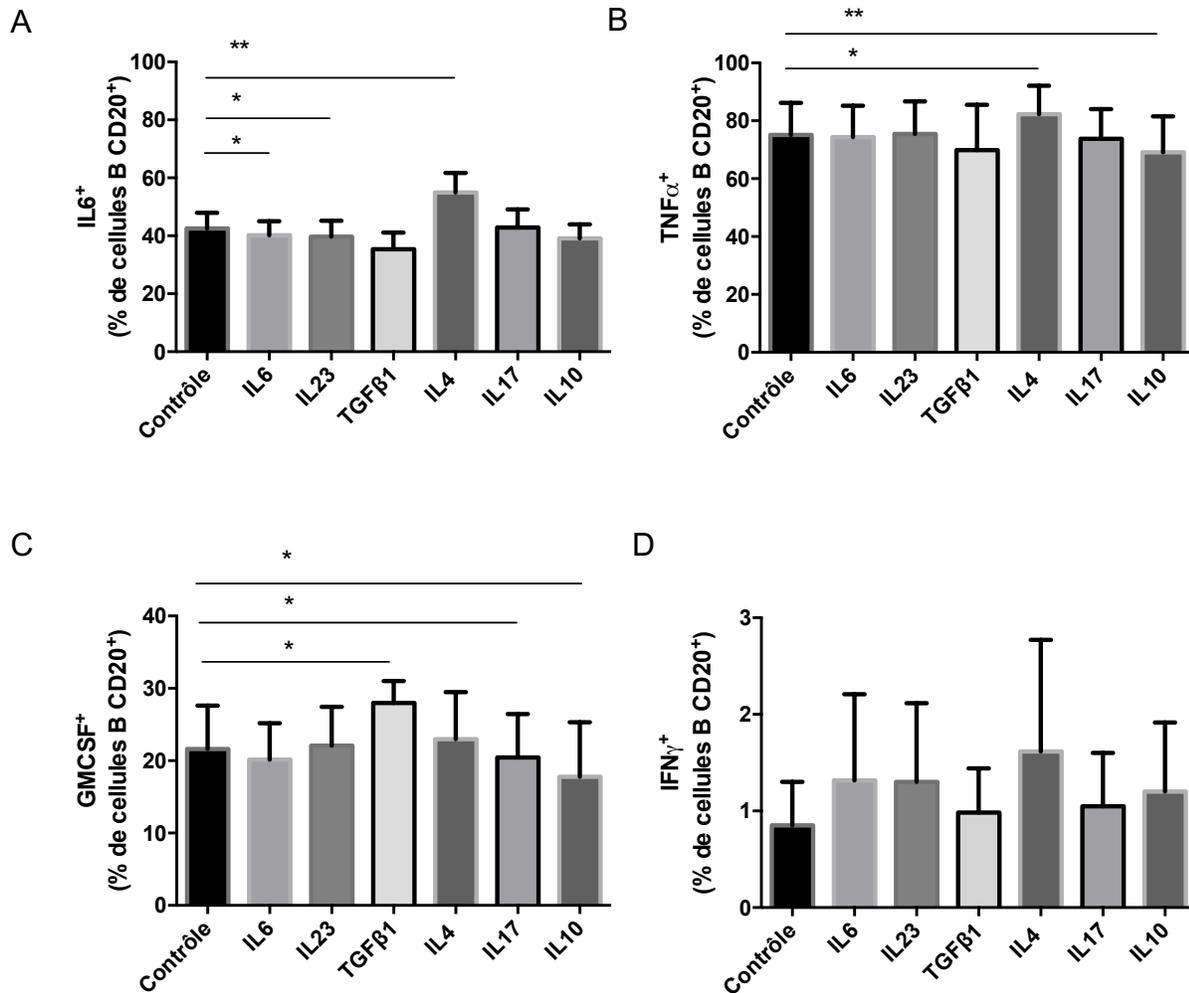


Figure 14 Influence de différents traitements sur le profil d'expression de cytokines des cellules B CD20 stimulées durant 2 jours *in vitro*

Les cellules B ont été isolées et stimulées comme décrit à la Figure 9. L'expression des cytokines est mesurée par cytométrie de flux. Graphiques représentant le pourcentage de cellules B CD20⁺ exprimant les cytokines (A) IL-6, (B) TNF- α , (C) GM-CSF, (D) IFN- γ , pour les différentes conditions. La barre verticale représente la déviation standard. OneWay ANOVA, $p \leq 0,05$ *, $p \leq 0,01$ **. N=6 donneurs sains.

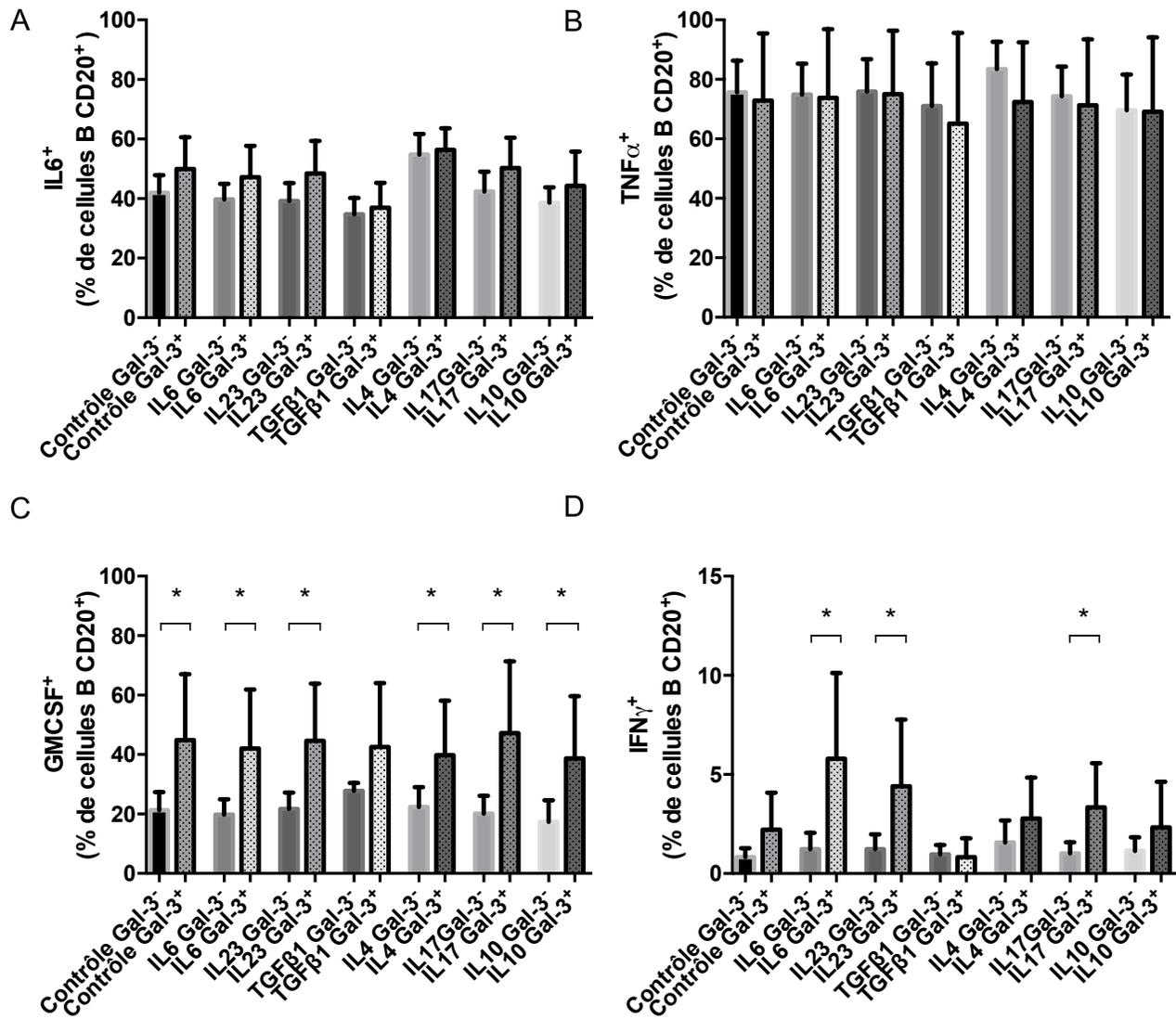


Figure 15 Comparaison de l'expression de cytokines par les cellules B galectin-3⁺ versus galectin-3⁻ après 2 jours de stimulation *in vitro*

Les cellules B ont été isolées et stimulées comme décrit à la Figure 9. L'expression des cytokines est mesurée par cytométrie de flux. On a analysé le profil d'expression de cytokines des cellules B CD20⁺ exprimant la galectin-3 à leur surface (Gal-3⁺) et de celles qui ne l'expriment pas (Gal-3⁻). On a comparé l'expression des cytokines (A) IL-6, (B) TNF-α, (C) GM-CSF, (D) IFN-γ entre les populations Gal-3⁺ et Gal-3⁻ pour chaque condition. La barre verticale représente la déviation standard. T test apparié, p ≤ 0,05 *. Donneurs sains N=6.

3.5 Influence de la galectin-3 sur l'expression de cytokines par les cellules B *in vitro*

Nos résultats démontrent que les cellules B activées *in vitro* peuvent exprimer la galectin-3 à leur surface et que les cellules qui l'expriment présentent un profil pro-inflammatoire. On a voulu ensuite évaluer l'influence de la galectin-3 sur le profil d'expression de cytokines des cellules B effectrices avec un profil pro-inflammatoire, ces cellules et le protocole pour les générer ont été décrits par l'équipe du Dr Bar-Or (Duddy, Niino et al. 2007, Li, Rezk et al. 2015). Les cellules B ont été isolées à partir des PBMCs de donneurs sains à l'aide d'un kit de sélection positive pour les cellules CD19⁺. Puis elles ont été mises en culture, durant 1 ou 2 jours, avec mCD40L, anti-BCR, IL-4 et différentes concentrations de galectin-3 respectivement 1nM, 10nM, 100nM ou bien sans galectin-3 pour la condition contrôle. On a récolté les cellules après 1 ou 2 jours de culture, elles ont été restimulées avec PMA, Ionomycin, GolgiPlug™ pendant 4 heures et ensuite immunomarquées puis analysées par cytométrie de flux. Pour les mêmes raisons que mentionnées précédemment, nous avons utilisé un anticorps dirigé contre CD20 afin d'identifier les cellules B.

La stratégie de sélection des cellules est décrite à la **Figure 16**. On constate qu'après une journée les concentrations les plus élevées de galectin-3 (10 nM, 100nM) induisent une diminution de l'expression de l'IL-6 et de l'IFN- γ par les cellules B activées (OneWay ANOVA, $p < 0,05$ *) (**Figure 17**). Il semble y avoir une tendance similaire en ce qui concerne le TNF- α en présence de 100nM de galectin-3 et l'IFN- γ en présence de 10nM cependant la différence avec la condition contrôle n'est pas significative. Après deux jours en culture, on n'observe plus les effets bien qu'il semble que certaines tendances soient toujours présentes notamment l'inhibition de l'expression de l'IFN- γ par les concentrations les plus élevées de galectin-3 (10nM, 100nM). Le traitement avec la galectin-3 n'influe pas sur la production de GM-CSF qui reste stable après 1 ou 2 jours. Cette expérience montre que des concentrations élevées de galectin-3 diminuent, de façon temporaire, l'expression de certaines cytokines pro-inflammatoires par les cellules B activées.

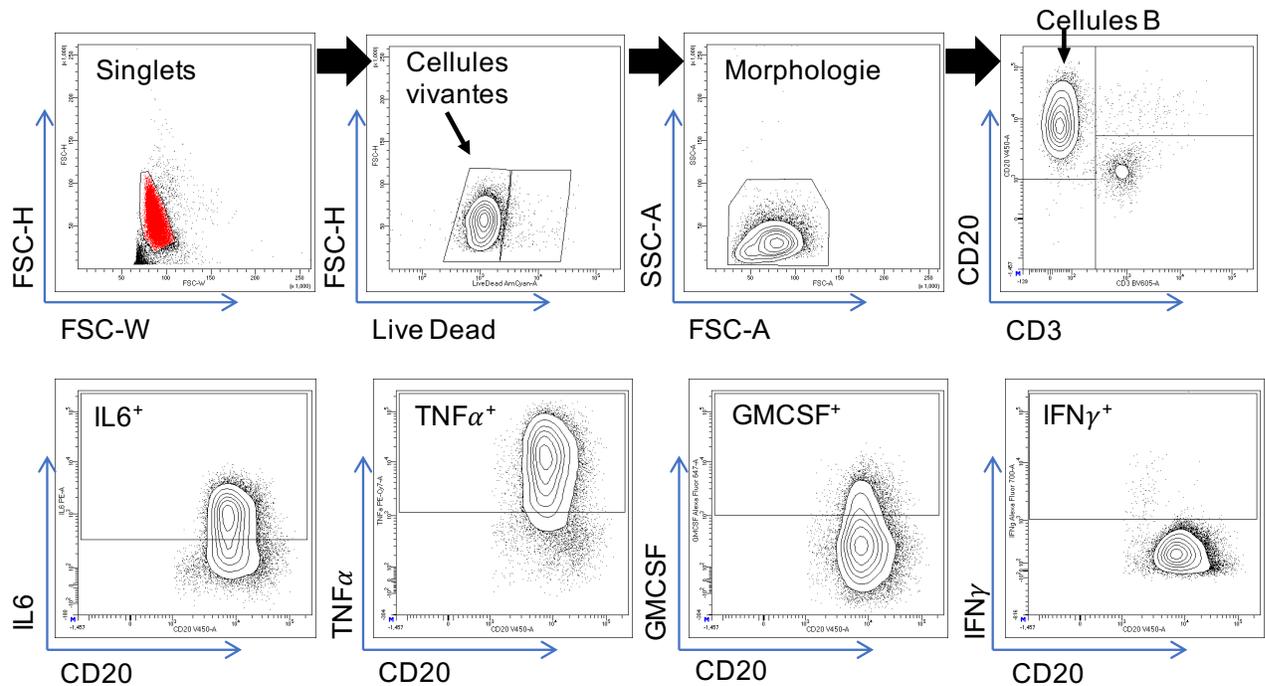
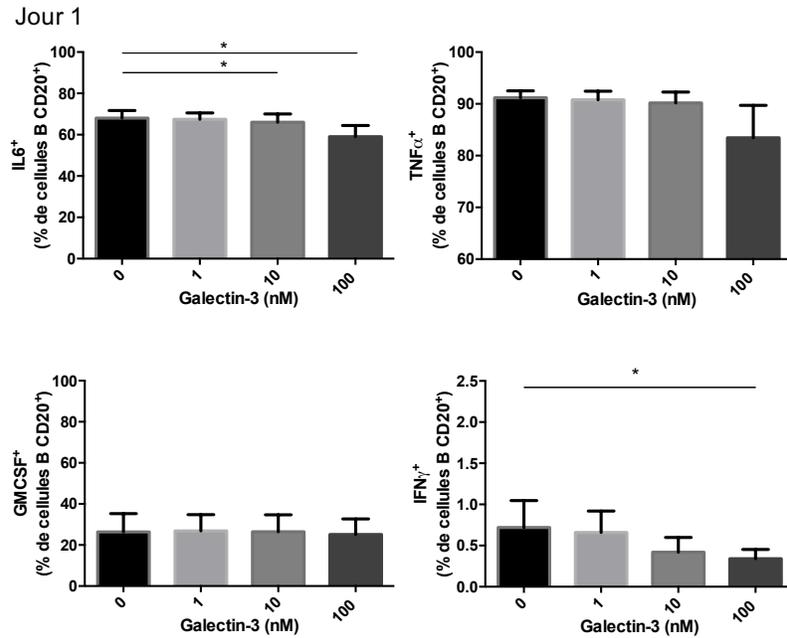


Figure 16 Stratégie de sélection pour les cellules B stimulées en présence de galectin-3 *in vitro*

Les cellules B ont été isolées à partir des PBMCs de donneurs sains à l'aide d'un kit de sélection positive pour les cellules CD19⁺. Les cellules sont stimulées durant 1 ou 2 jours avec mCD40L, anti-BCR, IL-4 et avec différentes concentrations de galectin-3 ou sans galectin-3 pour la condition 0nM. Puis elles sont restimulées durant 4 heures avec PMA, Ionomycin, GolgiPlug™ et immunomarquées. L'expression des cytokines est mesurée par cytométrie de flux. (A) Stratégie de sélection des cellules B par cytométrie de flux. On sélectionne les cellules seules (singlets), puis parmi celles-ci les cellules vivantes. On cible ensuite les cellules selon leur morphologie (FSC/SSC). On sélectionne ensuite les cellules B CD20⁺. On étudie l'expression des cytokines, IL-6, TNF- α , GM-CSF, IFN- γ par les cellules B CD20⁺. On utilise les contrôles isotypiques appropriés afin de placer les fenêtres de sélection positives. Graphiques de densité cellulaires représentatifs de la condition sans galectin-3 pour n=5 donneurs sains après 1 jour de stimulation et 4 heures de restimulation.

A



B

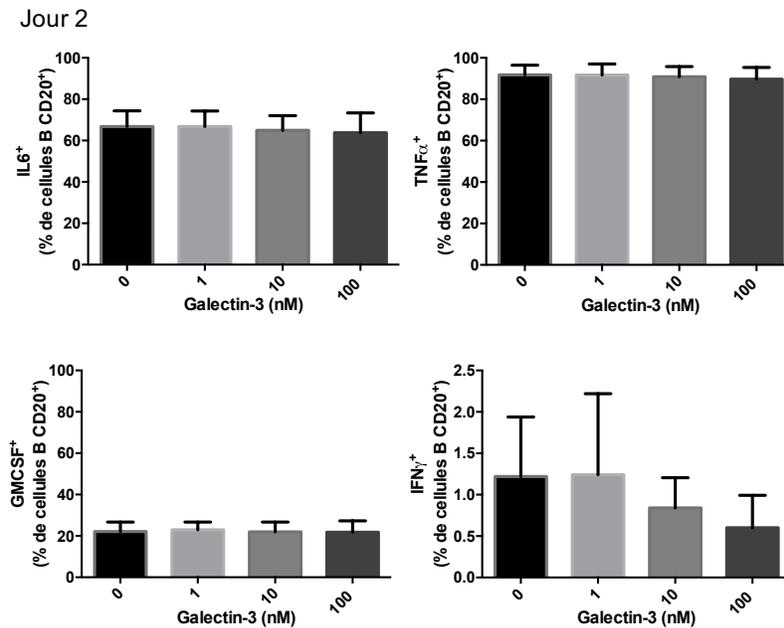


Figure 17 Influence de la galectin-3 sur l'expression de cytokines par les cellules B stimulées *in vitro*

Expression des cytokines par les cellules B stimulées en présence ou non de galectin-3. Graphiques représentant le pourcentage de cellules B CD20⁺ exprimant les cytokines IL-6, TNF- α , GM-CSF, IFN- γ dans les différentes conditions après (A) 1 ou (B) 2 jours. La barre verticale représente la déviation standard. N=5 donneurs sains. OneWay ANOVA, p<0,05.

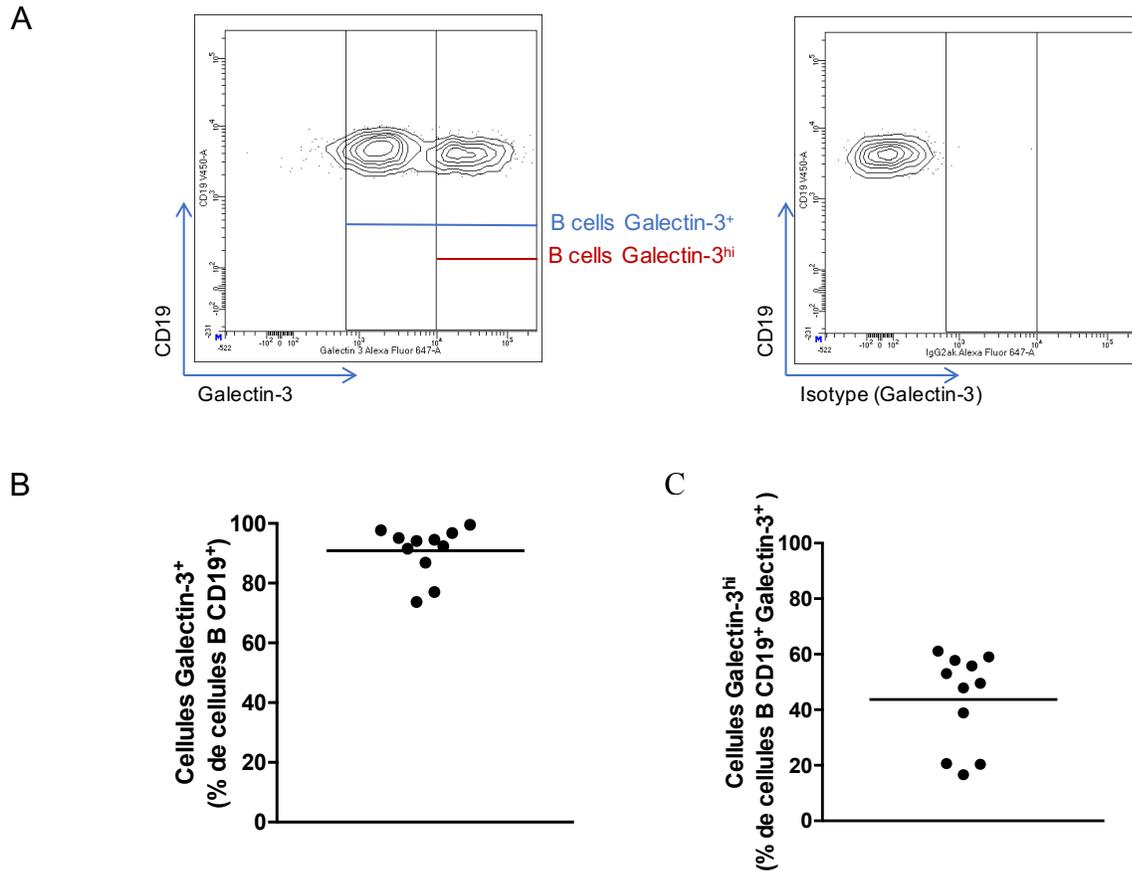


Figure 18 Mesure de la capacité d'adhésion de la galectin-3 à la surface des cellules B ex vivo

Les PBMCs sont isolés par gradient de Ficoll™ puis incubés durant 30 minutes dans du milieu Xvivo avec 100nM de Galectin-3 avant d'être immunomarqués. On utilise la même stratégie de sélection que celle décrite à la Figure 1. (A) Graphique de densité cellulaire représentant les cellules B CD19⁺ après 30 minutes d'incubation avec de la galectin-3. Le contrôle isotypique pour la galectin-3 est utilisé pour placer les fenêtres de sélection positives pour les populations galectin-3⁺ et galectin-3^{hi}. (B) Graphique représentant le pourcentage de cellules B CD19⁺ qui sont Galectin-3⁺, chaque point représente un donneur sain. En moyenne, la Galectin-3 adhère à 90,84% ($\pm 8,39\%$) des cellules B CD19⁺. (C) Graphique représentant le pourcentage de cellules B CD19⁺ Galectin-3⁺ qui sont Galectin-3^{hi}, chaque point représente un donneur sain. En moyenne, la Galectin-3 adhère de façon importante à 43,69% ($\pm 16,89\%$) des cellules B CD19⁺.

3.6 Influence de la galectin-3 sur la migration des cellules B *in vitro*

3.6.1 Les cellules B *ex vivo* sont capables de lier la galectin-3 exogène présente dans le milieu extracellulaire

Nous avons montré que la galectin-3 endogène pouvait se lier à la surface des cellules B. Cependant, pour nos tests de migrations nous avons choisi d'ajouter de la galectin-3 recombinante humaine étant donné qu'*ex vivo* suite à l'isolation par gradient de Ficoll la galectin-3 est absente de la surface des cellules B et que suite à la stimulation *in vitro* seul un faible pourcentage de cellules lie la galectin-3 endogène à leur surface. Nous avons donc voulu déterminer si la galectin-3 recombinante humaine ajoutée dans le milieu extracellulaire pouvait adhérer à la surface des cellules B *ex vivo*. Pour cela nous avons isolé les PBMCs de donneurs sains par gradient de Ficoll™, comme nous l'avons déjà observé après cette étape il n'y a pas de galectin-3 à la surface des cellules B. On a ensuite incubé les cellules dans du milieu Xvivo additionné de galectin-3 (100nM) ou de PBS pour la condition contrôle durant 30 minutes. Par la suite les cellules ont été immunomarquées et analysées par cytométrie de flux (**Figure 18**). L'analyse des résultats montre que la galectin-3 est présente à la surface des cellules B. En moyenne 90,84% ($\pm 8,39\%$) des cellules B CD19⁺ présentent la galectin-3 à leur surface après 30 minutes d'incubation. On peut distinguer deux populations positives, une population galectin-3⁺ et une autre galectin-3^{hi}. En moyenne, chez les donneurs sains les cellules galectin-3^{hi} représentent 43,69% ($\pm 16,89\%$) des cellules B CD19⁺ Galectin-3⁺ (**Figure 15**). Cette expérience nous permet de conclure que la galectin-3 présente dans le milieu extracellulaire est capable d'adhérer à la surface des cellules B CD19⁺ *ex vivo* après une isolation par gradient de Ficoll™.

3.6.2 Tests de migration

La galectin-3 favorise l'adhésion aux cellules endothéliales et la migration de cellules immunitaires telles que les neutrophiles ou éosinophiles, de plus, elle est en général considérée comme pro-inflammatoire. Ces éléments ainsi que le fait qu'elle

soit exprimée par les cellules B ALCAM⁺ nous ont amenés à supposer qu'elle augmentait la migration des cellules B à travers les barrières du SNC. Afin d'évaluer l'influence de la galectin-3 sur la migration des cellules B nous avons réalisé des tests de migrations *in vitro* (**Figures 19-23**). Dans le laboratoire du Dr Prat le modèle *in vitro* de la BHE/BHM humaine est bien établi. Pour réaliser les tests, on utilise des chambres Boyden modifiées (**Figure 19**). Ce sont des inserts (chambre supérieure) dont le fond possède des pores de 3µm, on les dépose dans des plaques de 24 puits (chambre inférieure). Dans la chambre supérieure, on met en culture primaire des cellules endothéliales de la BHE/BHM humaine sur une couche de gélatine. Lorsque les cellules ont atteint la confluence et forment une monocouche sur la membrane poreuse on peut alors les utiliser comme cela ou bien les traiter avec IFN-γ+TNF-α durant 18 heures afin de modéliser la BHE/BHM inflammée. La chambre inférieure contient 1,5mL de milieu de culture (ECM3) et dans la chambre supérieure on dépose 1.10⁶ de cellules B dans 700µL de milieu de culture (ECM3) contenant de la galectin-3 (10-1000nM), ou bien sans galectin-3 pour la condition contrôle. On laisse les cellules migrer durant 20 à 24 heures, après quoi, on récolte le contenu de la chambre inférieure et on compte les cellules B ayant migré.

L'analyse des résultats de la migration des cellules B à travers la BHE non inflammée ne montre pas de différence significative entre les différentes concentrations de galectin-3 et le contrôle (**Figure 20**). La galectin-3 ne semble pas influencer la migration dans ces conditions. Nous avons également testé l'influence de la galectin-3 sur la migration des cellules B à travers une monocouche de cellules endothéliales de BHM non inflammée. Les cellules endothéliales de la BHM sont cultivées de la même façon que celles de la BHE et les tests de migration sont réalisés comme décrit plus haut. Les résultats pour les 2 donneurs sains montrent qu'un plus grand nombre de cellules B semble migrer à travers la BHM que la BHE, mais on n'observe pas d'effet de la galectin-3 sur cette migration (**Figure 21**).

On sait que les cellules endothéliales de la BHE expriment la galectin-3 comme le montre les travaux de (Stancic, van Horssen et al. 2011). Nous nous sommes demandé si les cellules endothéliales étaient capables de sécréter la galectin-3. Nous

avons donc réalisé un ELISA sur le milieu de culture des cellules après 24 heures d'incubation. Les composants du milieu de culture ont également été testés pour la présence de galectin-3 comme contrôle, notamment le clone M3 et le sérum humain. Il s'avère que la galectin-3 était présente en quantité détectable par le kit utilisé (R&D™) dans ces deux composants. Cela signifie que nous ne contrôlions pas la quantité de galectin-3 dans le milieu de culture lors des tests de migration ce qui a pu biaiser nos résultats. Pour remédier à ce problème, nous avons retiré le clone M3 et le sérum humain de la composition et testé si ce nouveau milieu de culture modifié convenait à la culture des cellules endothéliales. Nous avons constaté que les cellules se développaient de façon similaire qu'avec l'ancien milieu de culture. On a alors répété le test de migration à travers la BHE avec le milieu de culture modifié, on a seulement pu tester les concentrations 10 et 100nM car nous étions limités par le nombre de cellules B du donneur. On a choisi de tester les ces concentrations, car elles sont les plus proches des conditions physiologiques. Les résultats ne montrent pas d'influence de la galectin-3 sur la migration des cellules B à travers le modèle *in vitro* de la BHE (**Figure 22**).

En conditions inflammatoires l'expression de certaines molécules d'adhésion est augmentée à la surface des cellules endothéliales de la BHE, notamment ALCAM, MCAM, qui sont des ligands de la galectin-3 (Larochelle, Alvarez et al. 2011). Cela pourrait favoriser la migration des cellules à travers le modèle *in vitro* de la BHE. Nous avons donc réalisé des tests de migration avec des cellules endothéliales de la BHE traitées durant 18 heures avec IFN- γ +TNF- α . Après cela, on a retiré le milieu de culture modifié contenant IFN- γ +TNF- α et on a procédé au test de migration comme décrit précédemment. Les résultats montrent que pour 2 des donneurs sains il semble y avoir une diminution du nombre de cellules ayant migré avec l'augmentation de la galectin-3 dans le milieu, tandis que pour le troisième donneur on observe une tendance inverse (**Figure 23**).

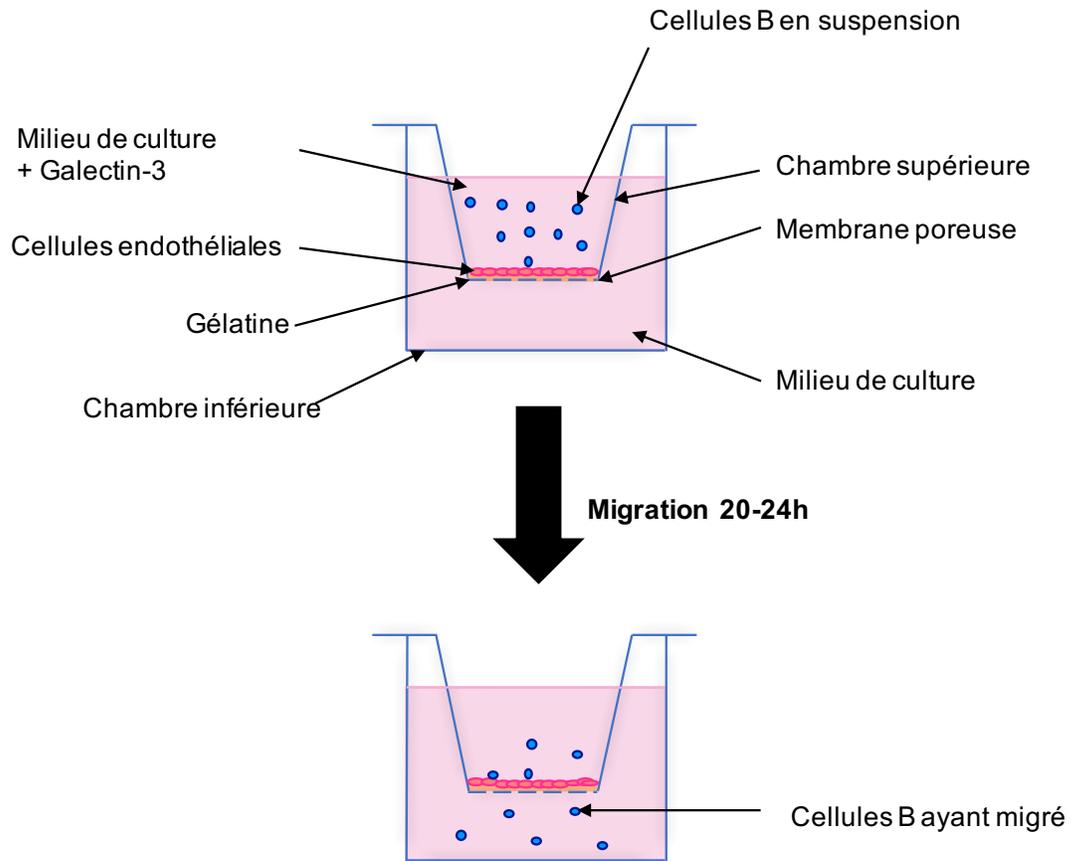


Figure 19 Schéma d'un test de migration *in vitro*

Schémas représentant un test de migration *in vitro*. Les cellules B sont déposées dans la chambre supérieure en présence de galectin-3 (ou non selon les conditions) dans un volume de 700 μ L. Au cours de la migration les cellules B vont franchir la monocouche de cellules endothéliales de la BHE ou de la BHM, la couche de gélatine, la membrane poreuse. Après 20 à 24 heures on compte le nombre de cellules ayant migré vers la chambre inférieure

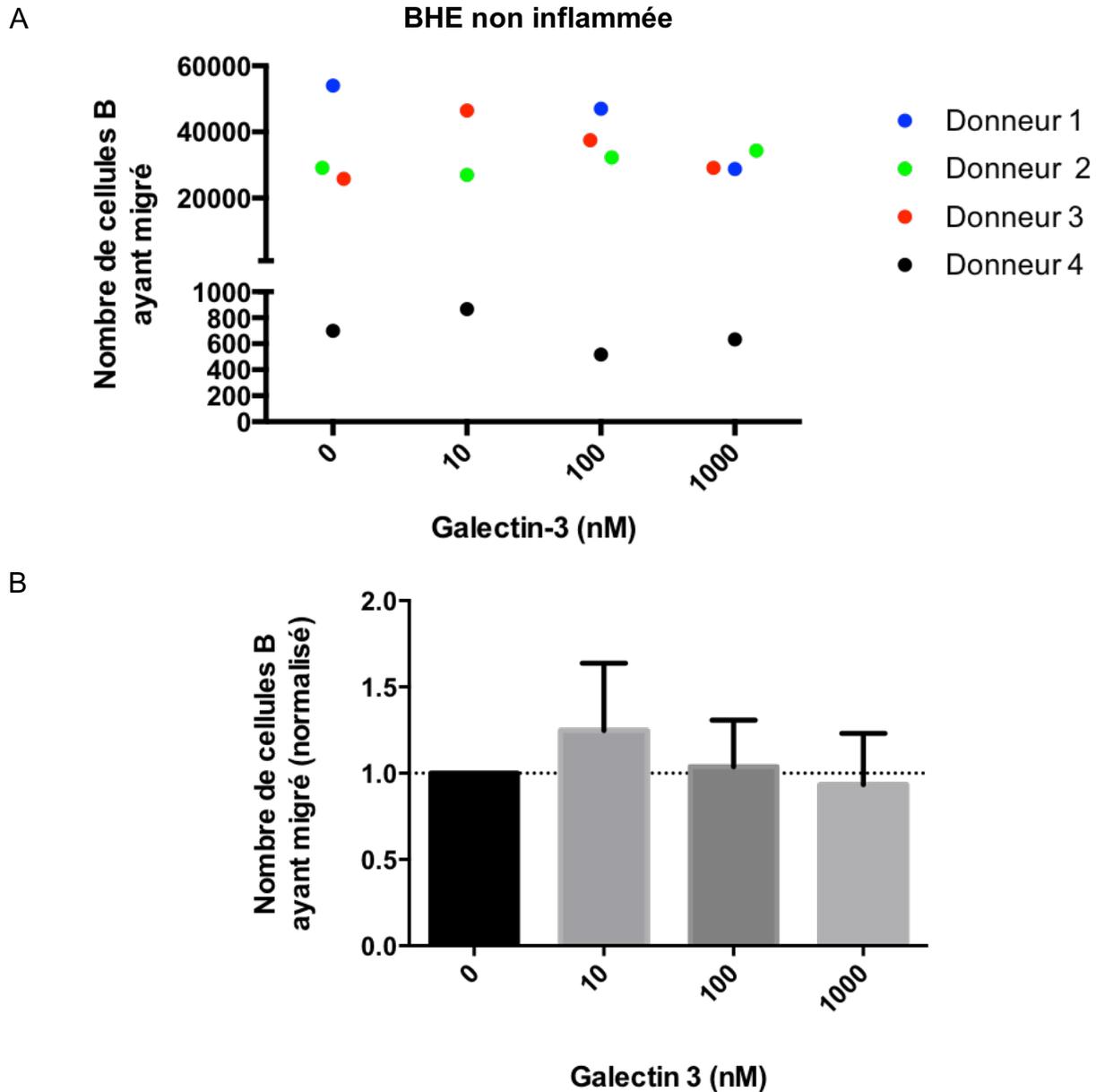
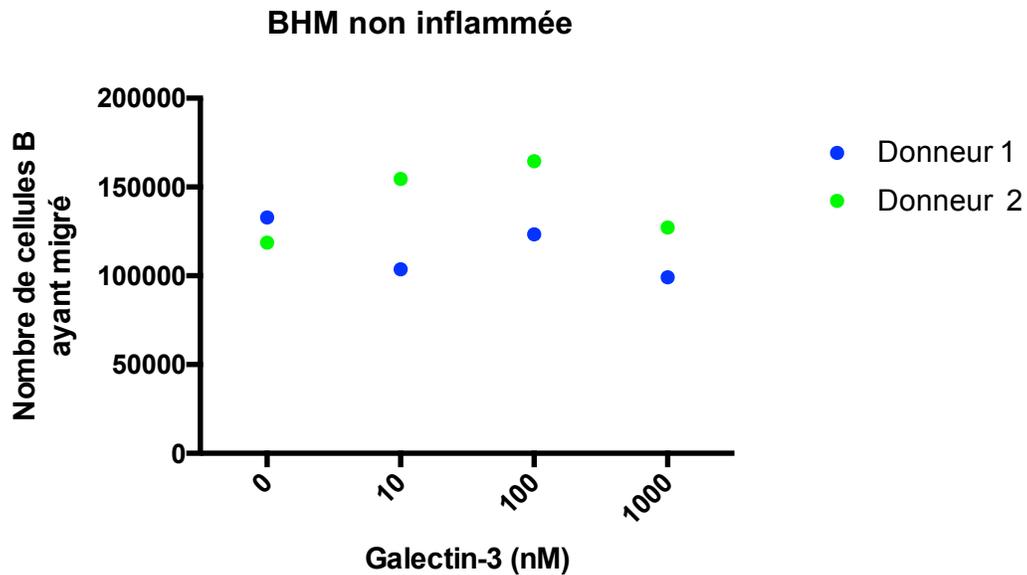


Figure 20 Influence de la galectin-3 extracellulaire sur la migration des cellules B à travers le modèle *in vitro* de la BHE non inflammée

(A) Graphique représentant le nombre de cellules B ayant migré à travers la monocouche de cellules endothéliales de la BHE après 20 à 24 heures, en présence de galectin-3 (10-1000nM) ou non selon les conditions. Les points d'une même couleur représentent le nombre de cellules B d'un même donneur ayant migré pour les différentes conditions. N=4 (B) Graphique représentant le nombre de cellules B ayant migré normalisé par rapport à la condition 0nM. Les données des 4 donneurs sains sont regroupées. La barre verticale représente la déviation standard.

A



B

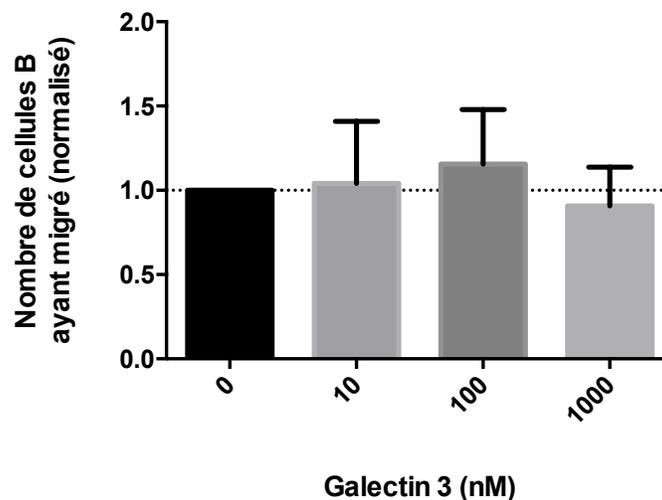


Figure 21 Influence de la galectin-3 extracellulaire sur la migration des cellules B à travers le modèle *in vitro* de la BHM non inflammée

(A) Graphique représentant le nombre de cellules B ayant migré à travers la monocouche de cellules endothéliales de la BHM après 20 à 24 heures, en présence de galectin-3 (10-1000nM) ou non selon les conditions. Les points d'une même couleur représentent le nombre de cellules B d'un même donneur ayant migré pour les différentes conditions. N=2 (B) Graphique représentant le nombre de cellules B ayant migré normalisé par rapport à la condition 0nM. Les données des 2 donneurs sains sont regroupées. La barre verticale représente la déviation standard. Donneurs sains N=2.

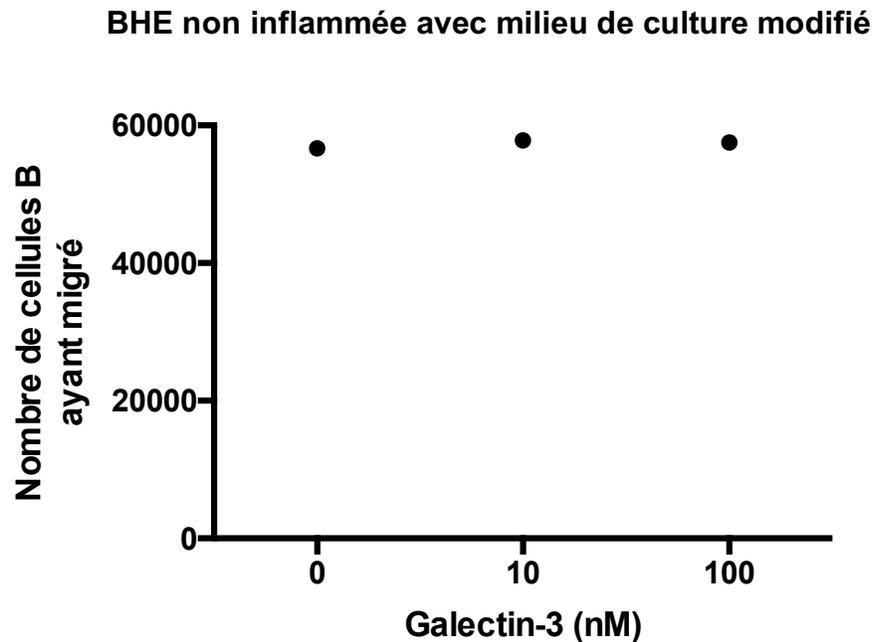


Figure 22 Influence de la galectin-3 sur la migration des cellules B à travers le modèle *in vitro* de la BHE non inflammée avec milieu de culture modifié

Graphique représentant le nombre de cellules B ayant migré à travers la monocouche de cellules endothéliales de la BHE après 24 heures, en présence de galectin-3 (10-1000nM) ou non selon les conditions. Les cellules endothéliales sont cultivées dans du milieu de culture dépourvu de clone M3 et de sérum humain et la migration est réalisée dans le milieu de culture modifié également. Les points d'une même couleur représentent le nombre de cellules B d'un même donneur ayant migré pour les différentes conditions. N=1

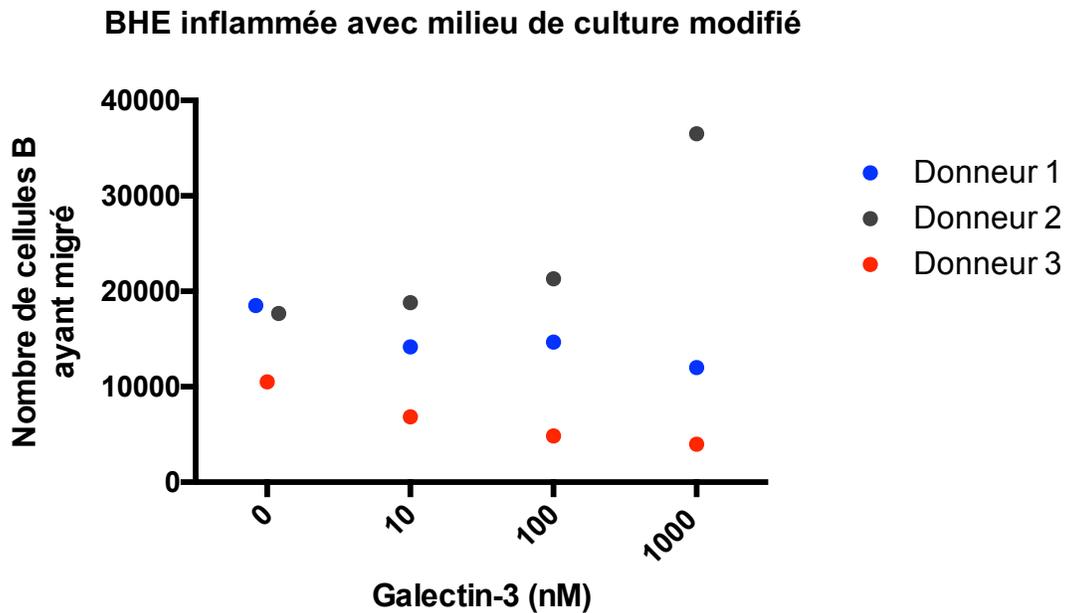


Figure 23 Influence de la galectin-3 sur la migration des cellules B à travers le modèle *in vitro* de la BHE inflammée (avec milieu de culture modifié)

Graphique représentant le nombre de cellules B ayant migré à travers la monocouche de cellules endothéliales de la BHE, en présence de galectin-3 (10-1000nM) ou non selon les conditions. Les cellules endothéliales ont été cultivées dans un milieu dépourvu de clone M3 et sérum humain. Elles ont été traitées durant 18 heures avec IFN- γ +TNF- α avant le test de migration. La migration est réalisée dans le milieu de culture modifié sans IFN- γ +TNF- α . Les points d'une même couleur représentent le nombre de cellules B d'un même donneur ayant migré pour les différentes conditions. N=3.

On ne peut donc pas conclure quant à l'influence de la galectin-3 sur la migration des cellules B à travers les cellules endothéliales de la BHE inflammée.

Les résultats des expériences menées sur les cellules B de donneurs sains montrent que la galectin-3 est présente à la surface des cellules B et qu'elle est exprimée différemment selon les sous-types de cellules B. *In vitro*, on a pu observer que les cellules B galectin-3⁺ avaient un profil pro-inflammatoire. Cependant lorsqu'on stimule les cellules B en présence de hautes concentrations de galectin-3 on constate un effet anti-inflammatoire temporaire. Enfin, la galectin-3 ne semble pas influencer la migration des cellules B à travers les modèles *in vitro* de la BHE et BHM. Étant donné que la banque de données protéomique générée par le laboratoire du Dr Prat a mis en évidence que seules les cellules B ALCAM⁺, dont le rôle pro-inflammatoire a été établi, exprimaient la galectin-3 et que celle-ci peut également influencer l'adhésion, la migration et la réponse inflammatoire nous avons voulu étudier son implication dans la SEP.

3.7 Expression de la galectin-3 chez les patients SEP

3.7.1 Expression de la galectin-3 dans le sérum et le LCR des patients SEP

Différentes études ont mesuré la concentration en galectin-3 dans le sérum de donneurs sains, de patients atteints de cancer ou de maladie cardiaques entre autres (Balan, Nangia-Makker et al. 2010, Dong, Zhang et al. 2018). On sait donc, que la galectin-3 peut être détectée dans le sérum, cependant aucune étude n'a été menée afin de déterminer la concentration en galectin-3 dans le sérum des patients SEP ou bien dans leur LCR.

Nous avons donc réalisé des ELISA sur le sérum et le LCR des patients afin de déterminer si la galectin-3 y était présente. Les résultats montrent que la galectin-3 est présente dans le LCR des patients SEP ainsi que des patients atteints d'autres maladies neurologiques (OND) (**Figure 24**). La concentration moyenne en galectin-3 dans le LCR des patients OND est de 103,1pg/mL ($\pm 118,8$ pg/mL) et de 121 pg/mL

($\pm 66,43$ pg/mL) chez les patients SEP. On ne constate pas de différence significative de concentration entre les deux groupes (test de Mann-Whitney $p=0,10$) (**Figure 24**).

Les résultats des ELISA réalisés avec le sérum de donneurs sains et de patients SEP montrent que ces derniers présentent une concentration en galectin-3 plus élevée. Lorsque les données des patients SEP sont regroupées, on constate cette différence (test de Mann-Whitney) (**Figure 25A**). La concentration moyenne en galectin-3 dans le sérum des donneurs sains est 586,5 pg/mL ($\pm 445,9$ pg/mL) et dans le sérum des patients SEP elle est de 934,2 pg/mL ($\pm 558,3$ pg/mL) (**Figure 25A**). Si on distingue les sous-types de SEP : RRMS, RRMS en poussée et les formes progressives (SPMS et PPMS), on observe une différence entre les donneurs sains et les patients atteints des formes progressives de la maladie (**Figure 25B**). La concentration moyenne en galectin-3 dans le sérum des patients RRMS est de 928,4 ($\pm 491,8$ pg/mL), chez les patients RRMS en poussée elle est de 880,8 pg/mL ($\pm 612,1$ pg/mL), chez les patients atteints d'une forme progressive elle est de 958,5 pg/mL ($\pm 590,3$ pg/mL) (**Figure 25B**). Nos résultats démontrent que la galectin-3 est présente dans le LCR des patients SEP en concentration relativement faible. D'autre part, la concentration en galectin-3 dans le sérum des patients est plus élevée que celle des donneurs sains.

3.7.2 Les cellules B galectin-3⁺ sont plus fréquentes chez les patients SEP que chez les donneurs sains

On a montré que les cellules B CD19⁺ dans le sang total des donneurs sains présentent la galectin-3 à leur surface, mais que celle-ci est retirée par l'isolation par gradient de Ficoll™. Nous avons constaté que la même chose se produisait avec les cellules des patients, comme l'ont révélé les immunomarquages réalisés sur les PBMCs de 14 patients SEP.

Nous avons donc comparé l'expression de la galectin-3 à la surface des cellules B CD19⁺ dans le sang total des donneurs sains à celle des patients SEP.

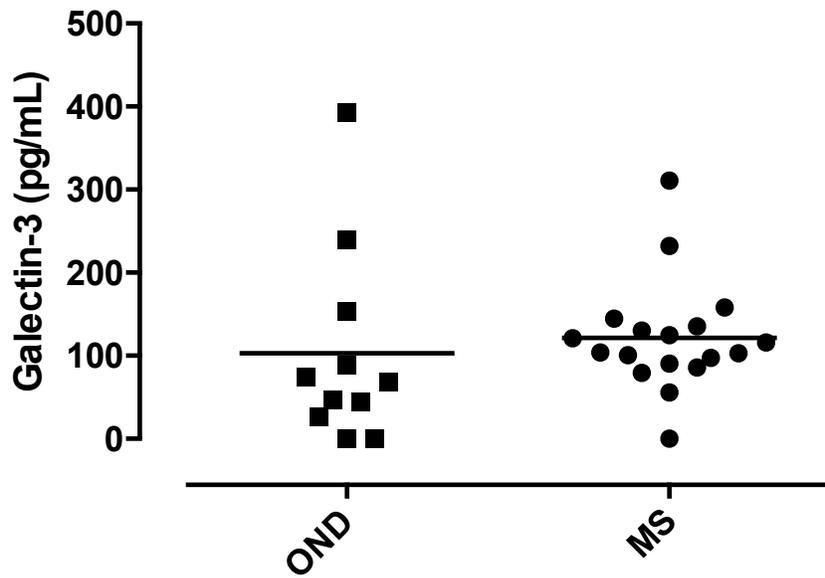


Figure 24 Mesure de la concentration en galectin-3 dans le LCR de patients SEP et OND

Graphique représentant la concentration mesurée par ELISA en galectin-3 dans le LCR de patients SEP et de patients atteints d'autres maladies neurologiques (OND). La concentration moyenne en galectin-3 dans le LCR des patients SEP est 121,7pg/mL ($\pm 66,43$ pg/mL) et de 103,1pg/mL ($\pm 118,8$ pg/mL) pour les patients OND. Patients SEP N=18, patients OND N=11.

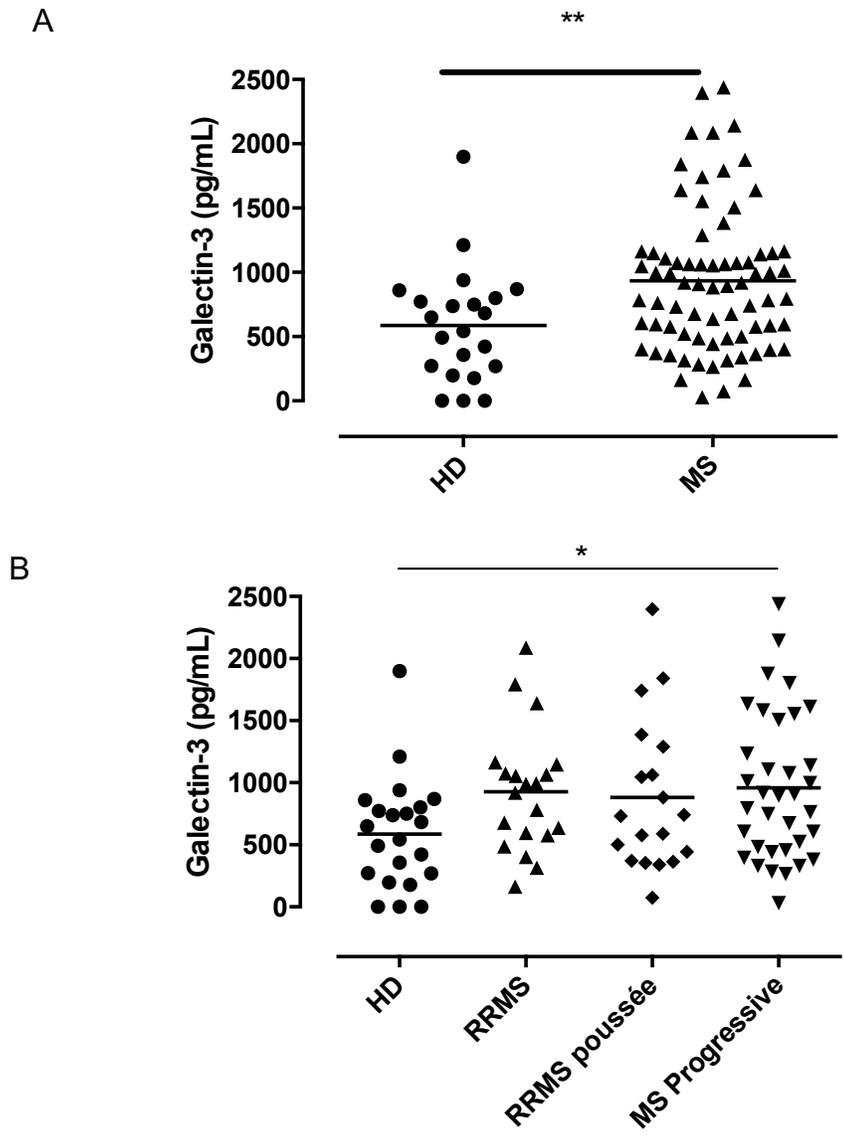
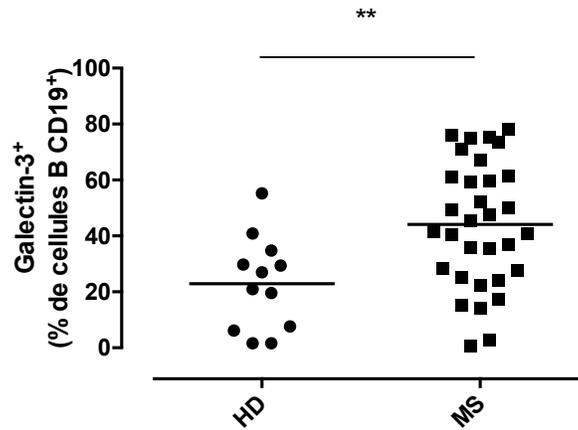


Figure 25 Mesure de la concentration en galectin-3 dans le sérum des patients SEP et donneurs sains

Graphiques représentant la concentration mesurée par ELISA de la concentration en galectin-3 dans le sérum des patients SEP et donneurs sains. (A) Les patients sont regroupés sans distinction du type de SEP. La concentration moyenne en galectin-3 dans le sérum des donneurs sains est de 586,5 pg/mL ($\pm 445,9$ pg/mL), des patients SEP 934,2 pg/mL ($\pm 558,3$ pg/mL). Test de Mann-Whitney, $p \leq 0,01$ **. (B) Comparaison de la concentration en galectin-3 dans le sérum des patients SEP selon le type de maladie et des donneurs sains. La concentration moyenne en galectin-3 dans le sérum des donneurs sains est de 586,5 pg/mL ($\pm 445,9$ pg/mL), des patients RRMS est 928,4 ($\pm 491,8$ pg/mL), des patients MS progressive est 958,5 ($\pm 590,3$ pg/mL). Test de

Kruskal-Wallis, $p \leq 0,05$ *. Donneurs sains N=22, Patients RRMS N=20; Patients RRMS en poussée N=19; Patients SPMS N=18 ; Patients PPMS N=17 ; Patients MS progressive (SPMS+PPMS) N=35.

A



B

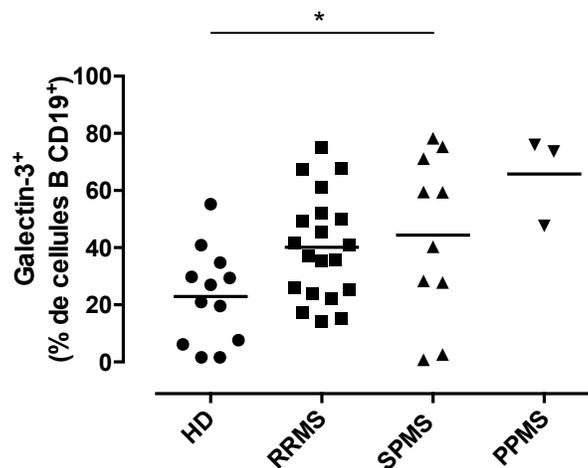


Figure 26 Expression de la galectin-3 à la surface des cellules B CD19⁺ du sang périphérique des patients SEP et donneurs sains

La stratégie de sélection des cellules B est la même que celle détaillée dans la Figure 5. (A) Graphique représentant le pourcentage de cellules B CD19⁺ exprimant la galectin-3 à la surface chez les donneurs sains et les patients atteints de SEP sans distinction du sous-type de maladie. Chaque point représente un donneur. En moyenne les donneurs sains expriment 22,89% ($\pm 16,65\%$) et les patients atteints de SEP 44,10% ($\pm 22,36\%$). T test non apparié, $p \leq 0,01$ **. (B) Graphique représentant le pourcentage de cellules B CD19⁺ exprimant la galectin-3 à la surface chez les donneurs sains et les patients atteints de SEP en distinguant le type de la maladie (RRMS, SPMS, PPMS). En moyenne, les patients RRMS expriment 40,11% ($\pm 18,33\%$), les patients SPMS expriment 44,37% ($\pm 28,82\%$), les patients PPMS expriment 65,75% ($\pm 15,76\%$). OneWay ANOVA, $p \leq 0,05$ *. Donneurs sains N=12, patients RRMS N=19, patients SPMS N=9, patients PPMS N=3.

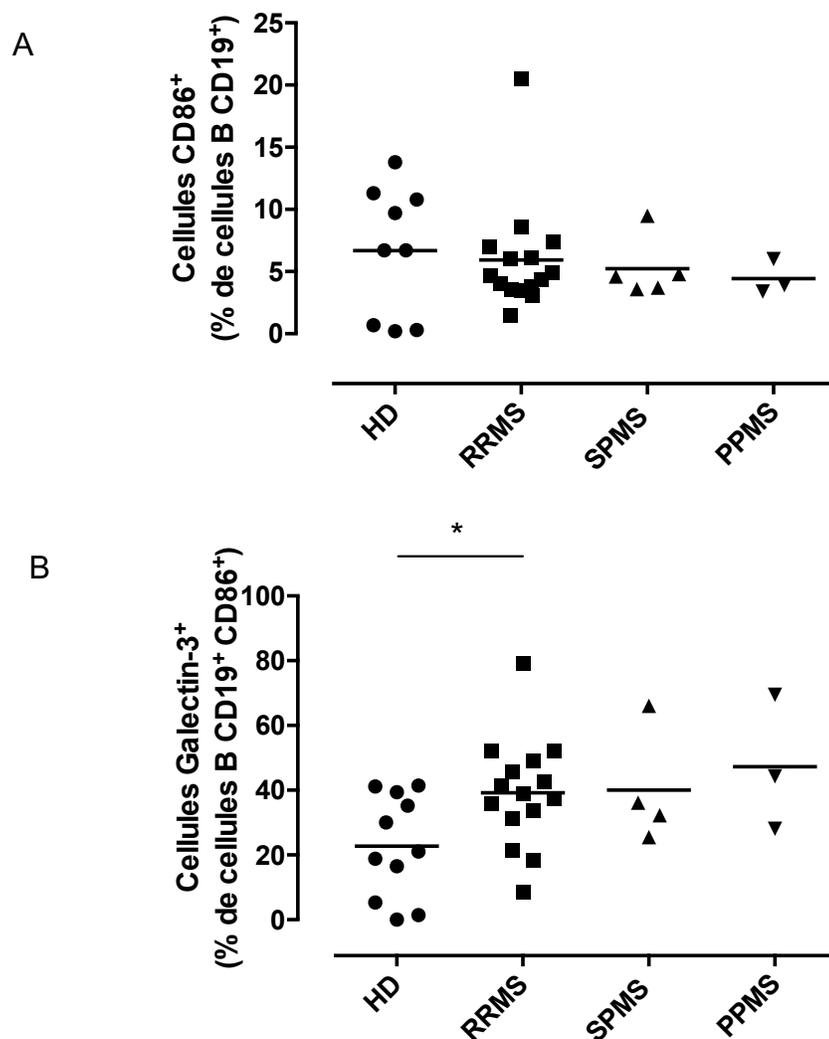


Figure 27 Expression de la galectin-3 à la surface des cellules CD19⁺CD86⁺ chez les patients SEP et les donneurs sains

(A) Graphique représentant le pourcentage de cellules B CD19⁺ exprimant CD86 chez les donneurs sains et les patients SEP. Chaque point représente un donneur. En moyenne le pourcentage de cellules B CD19⁺ exprimant CD86 chez les donneurs sains est 6,69% ($\pm 5,20\%$), chez les patients RRMS 5,94% ($\pm 4,43\%$), chez les patients SPMS 5,24% ($\pm 2,44\%$), les patients PPMS 4,43% ($\pm 1,38\%$). Donneurs sains N=9, patients RRMS N=15, patients SPMS N=5, patients PPMS N=3. (B) Graphique représentant le pourcentage de cellules B CD19⁺CD86⁺ exprimant la galectin-3 chez les donneurs sains et les patients SEP. Chaque point représente un donneur. En moyenne le pourcentage de cellules B CD19⁺CD86⁺ exprimant la galectin-3 chez les donneurs sains est de 22,75% ($\pm 15,84\%$), chez les patients RRMS est 39,21% ($\pm 16,68\%$), chez les

patients SPMS est 40,03% ($\pm 17,94\%$), chez les patients PPMS est 47,3% ($\pm 20,86\%$). OneWay ANOVA, $p \leq 0,05$ *. Donneurs sains N=11, patients RRMS N=15, patients SPMS N=4, patients PPMS N=3.

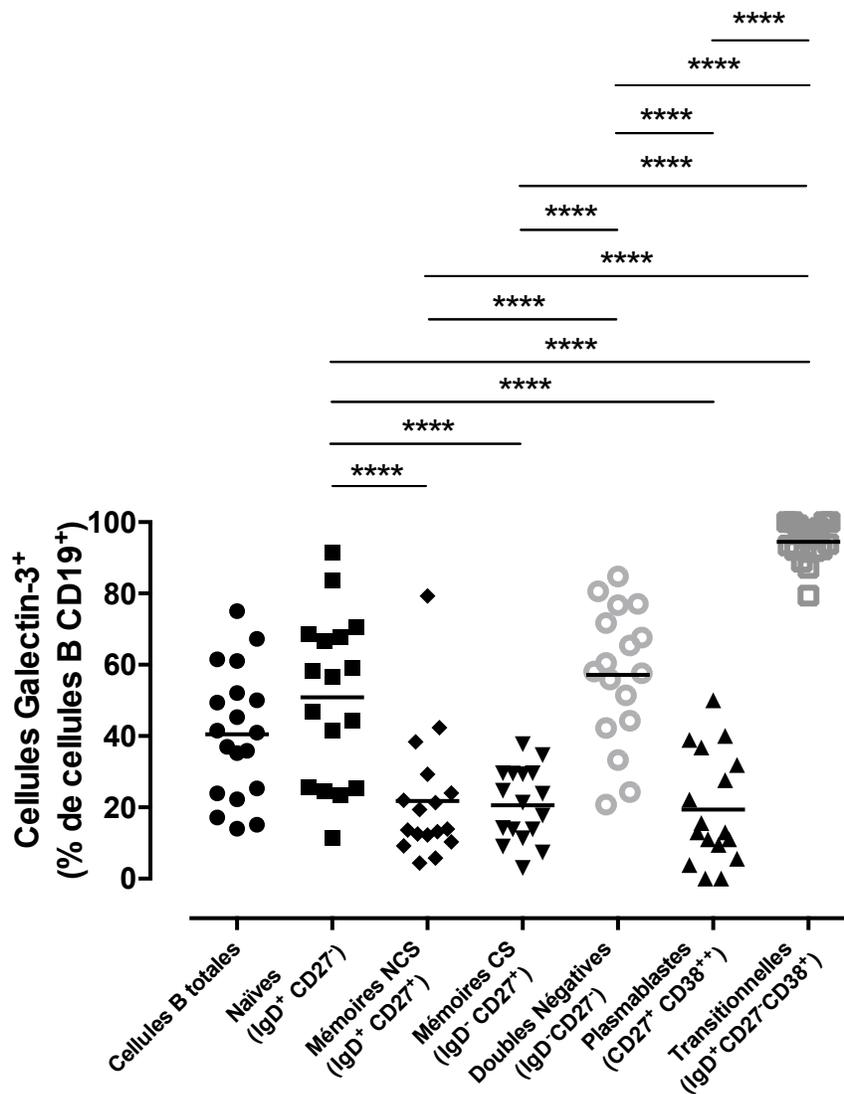


Figure 28 Comparaison de l'expression de la galectin-3 à la surface des sous-types de cellules B CD19⁺ chez les patients RRMS

Graphique représentant le pourcentage des différents sous-types de cellules B exprimant la galectin-3 à la surface chez les patients RRMS. Chaque point représente un donneur. En moyenne, les cellules B totales expriment 40,54% (±18,08%) les cellules naïves expriment 50,92% (±23,11%), les cellules mémoires NCS expriment 21,85% (±18,20%), les cellules mémoires CS expriment 20,61% (±10,25%), les cellules doubles négatives expriment 57,20% (±19,18%), les plasmablastes expriment 19,42% (±15,40%), les cellules transitionnelles expriment 94,53% (±5,63%). OneWay ANOVA, $p \leq 0,0001$ ****. Patients RRMS : Cellules B totales N=19, sous-types N=17.

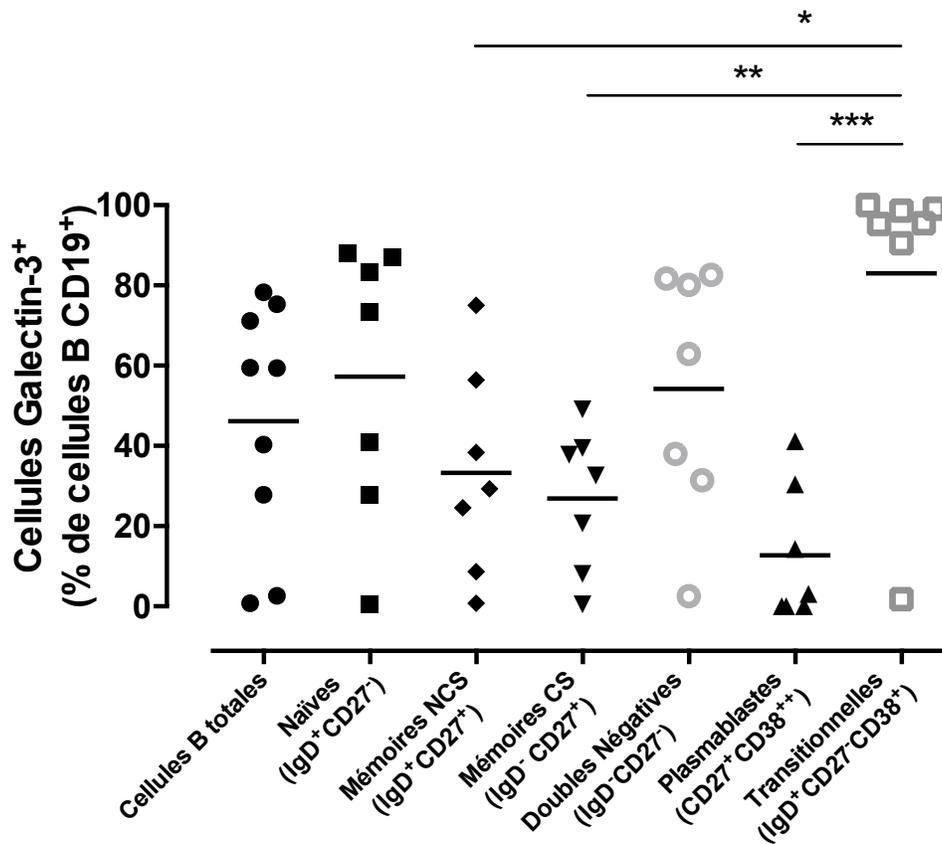


Figure 29 Comparaison de l'expression de la galectin-3 à la surface des sous-types de cellules B CD19⁺ chez les patients SPMS

Graphique représentant le pourcentage des différents sous-types de cellules B exprimant la galectin-3 à la surface chez les patients SPMS. Chaque point représente un donneur. En moyenne, les cellules B totales expriment 46,15% (±29,98) cellules naïves expriment 57,30% (±34,42%), les cellules mémoires NCS expriment 33,31% (±25,99%), les cellules mémoires CS expriment 26,90% (±17,76%), les cellules doubles négatives expriment 54,17% (±31%), les plasmablastes expriment 12,71% (±16,85%), les cellules transitionnelles expriment 82,99% (±35,94%). OneWay ANOVA, $p \leq 0,05$ *, $p \leq 0,01$ **, $p \leq 0,005$ ***. Patients SPMS : cellules B totales N=7, sous-types N=7 .

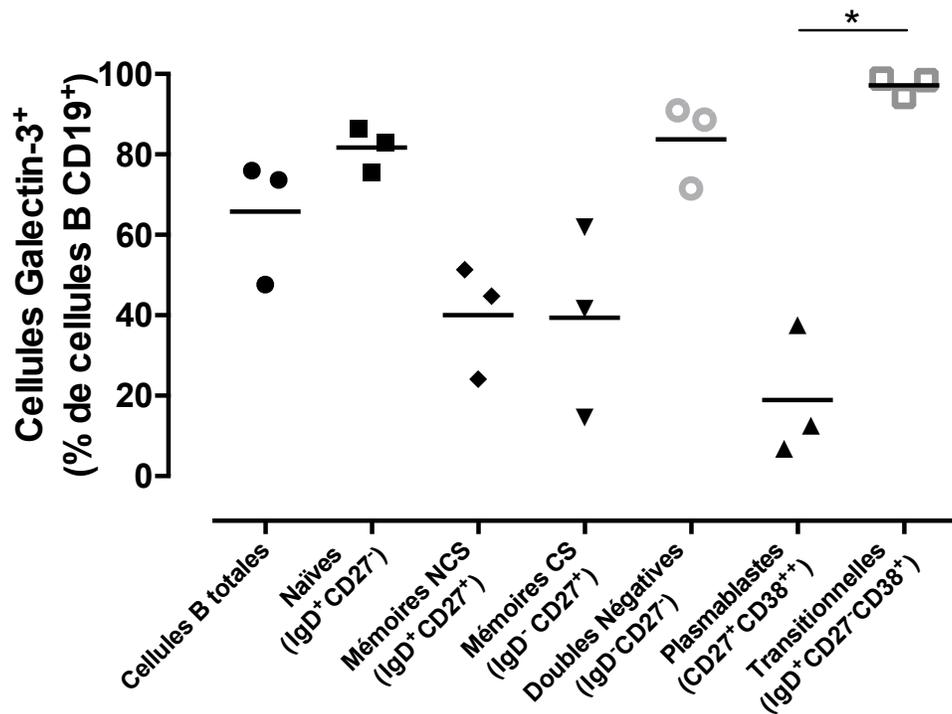


Figure 30 Comparaison de l'expression de la galectin-3 à la surface des sous-types de cellules B CD19+ chez les patients PPMS

Graphique représentant le pourcentage des différents sous-types de cellules B exprimant la galectin-3 à la surface chez les patients PPMS. Chaque point représente un donneur. En moyenne, les cellules B totales expriment 65,75% ($\pm 15,76\%$) cellules naïves expriment 81,70% ($\pm 5,57\%$), les cellules mémoires NCS expriment 40,07% ($\pm 14,20\%$), les cellules mémoires CS expriment 39,37% ($\pm 23,73\%$), les cellules doubles négatives expriment 83,73% ($\pm 10,66\%$), les plasmablastes expriment 18,93% ($\pm 16,33\%$), les cellules transitionnelles expriment 97,20% ($\pm 2,51\%$). OneWay ANOVA, $p \leq 0,05$ *. Patients PPMS N=3.

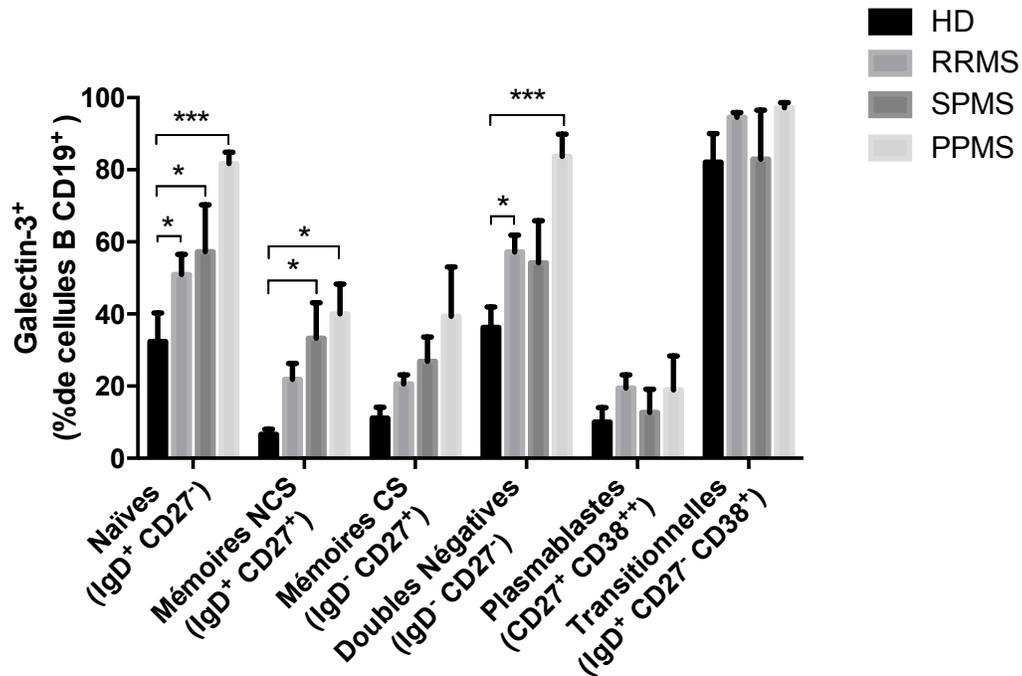


Figure 31 Comparaison de l'expression de la galectin-3 à la surface des sous-types de cellules B CD19+ chez les patients SEP et donneurs sains

Graphique représentant le pourcentage de cellules B exprimant la galectin-3 à la surface pour chaque sous-type chez les donneurs sains et les patients SEP. En moyenne, les cellules B naïves des donneurs sains expriment 32,38% ($\pm 27,43\%$) des patients RRMS expriment 50,92% ($\pm 23,11\%$), des patients SPMS expriment 57,30% ($\pm 34,42\%$), des patients PPMS expriment 81,7% ($\pm 5,57\%$). En moyenne, les cellules B mémoire NCS des donneurs sains expriment 6,60% ($\pm 4,99\%$), des patients RRMS expriment 21,85% ($\pm 18,20\%$), des patients SPMS expriment 33,31% ($\pm 25,99\%$), des patients PPMS expriment 40,07% ($\pm 14,2\%$). En moyenne, les cellules B mémoires CS des donneurs sains expriment 11,15% ($\pm 9,9\%$), des patients RRMS expriment 20,61% ($\pm 10,25\%$), des patients SPMS expriment 26,9% ($\pm 17,76\%$), des patients PPMS expriment 39,37% ($\pm 23,73\%$). En moyenne, les cellules B doubles négatives des donneurs sains expriment 36,27% ($\pm 19,73\%$), des patients RRMS expriment 57,20% ($\pm 19,18\%$), des patients SPMS expriment 54,17% ($\pm 31\%$), des patients PPMS expriment 83,73% ($\pm 10,66\%$). En moyenne, les plasmablastes des donneurs sains expriment 10,07% ($\pm 13,67\%$), des patients RRMS expriment 19,42% ($\pm 15,40\%$), des patients SPMS expriment 12,71% ($\pm 16,85\%$), des patients PPMS expriment 18,93% ($\pm 16,33\%$). En moyenne, les cellules B transitionnelles des donneurs sains expriment 82,16% ($\pm 27,29\%$), des patients RRMS expriment 94,53% ($\pm 5,63\%$), des patients SPMS expriment 82,99% ($\pm 35,94\%$), des patients PPMS expriment 97,2% ($\pm 2,52\%$).

La barre verticale représente la déviation standard. 2Way ANOVA, $p \leq 0,05$ *, $p \leq 0,01$ **, $p \leq 0,005$ ***. Donneurs sains N=12, patients RRMS N=17, patients SPMS N=7, patients PPMS N=3.

Pour cela nous avons réalisé des immunomarquages sur le sang total des patients de la même façon que pour les donneurs sains, nous avons utilisé la même stratégie de sélection des cellules B lors de l'analyse par cytométrie de flux (**Figure 5**). Les résultats montrent que chez les patients SEP les cellules B exprimant la galectin-3 à la surface sont plus fréquentes que chez les donneurs sains. Le pourcentage de cellules B CD19⁺ exprimant la galectin-3 à la surface est en moyenne de 22,89% ($\pm 16,65\%$) chez les donneurs sains et de 44,10% ($\pm 22,36\%$) chez les patients SEP sans distinction du type de maladie (T test non apparié, $p \leq 0,01$ **) (**Figure 26A**). Si on distingue les types de SEP on constate que les patients SPMS présentent un pourcentage moyen de cellules B CD19⁺ galectin-3⁺ plus élevé que les donneurs sains (OneWay ANOVA, $p \leq 0,05$ *) (**Figure 26B**). En moyenne, le pourcentage de cellules B CD19⁺ exprimant la galectin-3 à la surface est de 40,11% ($\pm 18,33\%$) chez les patients RRMS, 44,37% ($\pm 28,82\%$) chez les patients SPMS, 65,75% ($\pm 15,76\%$) chez les patients PPMS. Il semble que la fréquence des cellules B CD19⁺ galectin-3⁺ soit plus importante chez les patients atteints des formes progressives de la SEP, cependant le nombre de patients atteints de PPMS inclus dans l'étude doit être augmenté afin de confirmer cette tendance.

Nos résultats montrent également que le pourcentage moyen de cellules T CD8⁺ exprimant la galectin-3 à la surface est plus élevé chez les patients SEP que chez les donneurs sains, mais ce n'est pas le cas pour les cellules T CD4⁺ (**Annexe 1**).

3.7.3 Expression de la galectin-3 par les cellules B CD19⁺ activées

Par la suite nous avons cherché à déterminer si les cellules B activées en circulation dans la périphérie exprimaient la galectin-3. Nous avons donc analysé par cytométrie de flux l'expression de la galectin-3 par les cellules B exprimant CD86, une molécule exprimée par les cellules B activées qui est impliquée dans la costimulation

des cellules T. Les résultats ne montrent pas de différence de fréquence des cellules B CD86+ entre les groupes (**Figure 27B**), mais les cellules activées des patients RRMS expriment significativement plus de galectin-3 que celles des donneurs sains (OneWay ANOVA, $p \leq 0,05$ *) (**Figure 27B**). Il semble y avoir une tendance similaire chez les patients atteints des formes progressives, néanmoins davantage de patients devront être inclus dans l'étude afin de confirmer cela. Ainsi, on montre que chez les patients RRMS l'expression de la galectin-3 par les cellules activées est plus importante que chez les donneurs sains.

3.7.4 Expression de la galectin-3 par les différents sous-types de cellules B chez les patients SEP

Nous avons caractérisé l'expression de la galectin-3 par les différents sous-types de cellules B chez les patients SEP de la même façon que décrite précédemment (voir **Figure 5**). On constate que chez les patients RRMS ainsi que SPMS l'expression de la galectin-3 à la surface des cellules B CD19⁺ varie entre les sous-types. Ainsi, chez les patients RRMS les cellules transitionnelles ont le pourcentage moyen d'expression le plus élevé avec 94,53% ($\pm 5,63\%$), suivi des cellules doubles négatives avec 57,20% ($\pm 19,18\%$), des cellules naïves avec 50,92% ($\pm 23,11\%$), des cellules mémoires NCS avec 21,85% ($\pm 18,20\%$), des cellules mémoires CS 20,61% ($\pm 10,25\%$) et enfin des plasmablastes avec 19,42% ($\pm 15,40\%$) (OneWay ANOVA, $p \leq 0,0001$ ****) (**Figure 28**). Chez les patients SPMS ce sont également les cellules transitionnelles qui ont le pourcentage moyen de cellules galectin-3⁺ le plus élevé avec 82,99% ($\pm 35,94\%$), suivi des cellules naïves avec 57,30% ($\pm 34,42\%$), des cellules doubles négatives avec 54,17% ($\pm 31\%$), des cellules mémoire NCS avec 33,31% ($\pm 25,99\%$), des cellules mémoires CS avec 26,90% ($\pm 17,76\%$), des plasmablastes avec 12,71% ($\pm 16,85\%$) (OneWay ANOVA, $p \leq 0,05$ *, $p \leq 0,01$ **, $p \leq 0,005$ ***) (**Figure 29**).

Enfin, chez les patients PPMS, les cellules transitionnelles présentent également le pourcentage moyen de cellules galectin-3⁺ le plus élevé avec 97,20% ($\pm 2,51\%$), suivi des cellules doubles négatives avec 83,73% ($\pm 10,66\%$), des cellules naïves avec 81,70% ($\pm 5,57\%$), des cellules mémoires NCS avec 40,07% ($\pm 14,20\%$),

des cellules mémoires CS avec 39,37% ($\pm 23,73\%$), des plasmablastes avec 18,93% ($\pm 16,33\%$) (OneWay ANOVA, $p \leq 0,05$ *) (**Figure 30**).

Ces données montrent que chez les patients RRMS la galectin-3 semble être moins exprimée à la surface des sous-types de cellules B pro-inflammatoires, soit les cellules mémoires, comme on l'a constaté chez les donneurs sains. Il semble y avoir une tendance similaire chez les patients atteints des formes progressives de la SEP, cependant le nombre de patients inclus dans l'étude est trop faible pour conclure.

3.7.5 Comparaison de l'expression de la galectin-3 par les différents sous-types de cellules B CD19+ entre les patients SEP et les donneurs sains

Nous avons ensuite comparé l'expression de la galectin-3 par les sous-types de cellules B CD19⁺ entre les patients SEP et les donneurs sains. Les résultats obtenus montrent que pour certains sous-types de cellules B CD19⁺ le pourcentage moyen de cellules exprimant la galectin-3 est plus élevé chez les patients SEP (**Figure 31**). Notamment, un pourcentage plus important des cellules naïves exprime la galectin-3 à la surface que chez les donneurs sains. Les cellules mémoires NCS exprimant la galectin-3 à la surface sont plus fréquentes chez les patients atteints des formes progressives de la SEP que chez les donneurs sains. Les cellules doubles négatives exprimant la galectin-3 à la surface sont plus fréquentes chez les patients PPMS et RRMS que chez les donneurs sains (2Way ANOVA, $p \leq 0,05$ *, $p \leq 0,01$ **, $p \leq 0,005$ ***). Nos données révèlent que l'expression de la galectin-3 à la surface de certains groupes de cellules B CD19⁺ est augmentée chez les patients SEP, particulièrement chez les patients PPMS.

4 Discussion

L'efficacité des traitements dirigés contre le marqueur CD20 a renouvelé l'intérêt pour la recherche sur le rôle des cellules B dans la SEP. On sait maintenant qu'elles jouent un rôle clef dans la maladie. Cependant, les groupes de cellules B pathogènes sont encore mal définis et leurs mécanismes de migration vers le SNC méconnus. Nos travaux visaient à étudier l'influence de la galectin-3 sur la pathogénicité et la migration des cellules B vers le SNC dans le contexte de la SEP.

Cette étude a permis de mettre en évidence que les cellules B du sang total exprimaient la galectin-3 à leur surface. La caractérisation de l'expression par les différents sous-types de cellules B ainsi que les cellules B activées montre qu'elle est augmentée chez les patients SEP par rapport aux donneurs sains. De plus, la concentration en galectin-3 dans le sérum est augmentée par rapport aux contrôles, en particulier chez les patients atteints des formes progressives de la maladie. Cependant ce n'est pas le cas pour le LCR. D'autre part, on a démontré qu'*in vitro*, les cellules B effectrices exprimant la galectin-3 produisaient plus de cytokines pro-inflammatoires que celles ne l'exprimant pas. Cependant, lorsqu'on ajoute une concentration élevée de galectin-3 cela induit une diminution de l'expression de l'IL-6 et IFN- γ chez les cellules B effectrices. Enfin, les tests de migration de cellules B à travers les modèles *in vitro* de la BHE et BHM n'ont pas permis de mettre en évidence d'influence de la galectin-3.

Des travaux menés dans le laboratoire du Dr Prat ont permis d'établir qu'ALCAM favorisait la migration des cellules B vers le SNC et qu'elle était exprimée par des cellules B avec un profil pro-inflammatoire. La galectin-3 a été identifiée dans la banque de données protéomique générée par la comparaison des cellules B ALCAM⁺ et ALCAM⁻ et elle a la capacité à moduler l'adhésion et la migration de certaines cellules ainsi que la réponse inflammatoire. De plus, une étude a rapporté une sévérité diminuée de l'EAE chez des souris KO pour la galectin-3, avec une diminution de l'infiltration cellulaire dans le SNC ainsi que de la production d'IFN- γ et IL-17.

Cependant, les animaux présentaient une délétion totale de la galectin-3, il est donc possible que ces effets aient été causés par l'absence de galectin-3 intracellulaire qui pourrait induire l'augmentation de la mortalité cellulaire observée. Notre étude s'est portée sur l'influence de la galectin-3 extracellulaire sur la pathogénicité des cellules B et leur migration ainsi que son implication dans la SEP.

L'expression de la galectin-3 à la surface des cellules B a été analysée chez les donneurs sains par cytométrie de flux. La galectin-3 est présente à la surface des cellules B du sang total. Différentes études menées sur des lignées de cellules B cancéreuses ont montré qu'elles exprimaient la galectin-3 par immunobuvardage et qu'elle était présente à la surface grâce à la cytométrie de flux (Hoyer, Pang et al. 2004, Clark, Pang et al. 2012). D'autre part, Hoyer et al ont mis en évidence par immunobuvardage la présence de galectin-3 dans les cellules B de donneurs sains isolées à partir des amygdales. Leurs résultats montrent qu'elle est abondante dans les cellules B mémoires et naïves, mais qu'elle est faiblement exprimée par les cellules B du centre germinatif (centroblastes) et les cellules plasmatiques. Néanmoins, ces données ne permettent pas de déterminer de quel compartiment cellulaire provient la galectin-3.

Nos données permettent d'établir que la galectin-3 est présente à la surface de tous les sous-types de cellules B inclus dans notre étude. Elle est exprimée surtout par les cellules transitionnelles, naïves et doubles négatives et dans une moindre mesure par les cellules mémoires (CS et non CS) et les plasmablastes. L'étude réalisée par Hoyer et al (Hoyer, Pang et al. 2004) montre que les cellules B mémoires sont celles qui expriment le plus de galectin-3, on peut supposer que celle-ci est majoritairement exprimée en intracellulaire et que seule une faible fraction se trouve à la surface. On peut également supposer que l'expression de la galectin-3 varie entre les cellules provenant du sang total et celles trouvées dans les amygdales.

D'un point de vue fonctionnel, les cellules B mémoires ainsi que les plasmablastes sont des cellules effectrices. Les cellules mémoires activées possèdent un profil pro-inflammatoire et les plasmablastes produisent des anticorps, de plus ce sont les cellules B les plus représentées dans le LCR des patients SEP (Duddy, Niino et al.

2007, Li, Rezk et al. 2015). Blair et al ont identifié des cellules transitionnelles productrices d'IL-10 (Blair, Norena et al. 2010), cependant, les marqueurs utilisés pour les identifier diffèrent de ceux utilisés dans notre étude. D'autre part, l'origine et la fonction des cellules doubles négatives restent moins bien définies, elles présentent des points communs avec les cellules mémoires et sont capables de présenter des antigènes ainsi que de produire des cytokines pro-inflammatoires et du granzyme-B lorsqu'elles sont activées *in vitro*. Elles constituent une petite population dans la circulation chez les sujets sains et elles sont associées au vieillissement du système immunitaire (Claes, Fraussen et al. 2016). Ainsi, les cellules B exprimant le plus de galectin-3 *ex vivo* à la surface sont considérées comme anti-inflammatoires (excepté les cellules doubles négatives dont le rôle est moins bien défini) et celles l'exprimant faiblement comme pro-inflammatoires.

Nous avons évalué la concentration en galectin-3 dans les fluides corporels par ELISA. Les résultats montrent que la galectin-3 est présente dans le LCR des patients SEP mais que sa concentration n'est pas supérieure à celle mesurée chez les patients OND. Seuls 3 patients PPMS ont été inclus et nous n'avons pas d'échantillons de patients SPMS à notre disposition. Il serait difficile d'obtenir ces échantillons et donc d'observer une éventuelle différence entre les formes de SEP, étant donné qu'une ponction lombaire est rarement indiquée chez ces patients. En ce qui concerne le sérum, la concentration en galectin-3 est plus élevée chez les patients SEP que les donneurs sains. On constate une différence en particulier avec les patients atteints de SEP progressive. Cette augmentation de la concentration en galectin-3 est également observée chez les patients atteints d'autres maladies auto-immunes telles que l'arthrite rhumatoïde, la maladie de Crohn, le syndrome de Sjörger ou bien chez les patients atteints de certains cancers (de Oliveira, Gatto et al. 2015). Cette hausse de la galectin-3 pourrait être associée à un contexte inflammatoire, mais la source de la galectin-3 n'est pas connue.

Par ailleurs, nous avons comparé l'expression de la galectin-3 à la surface des cellules B des patients et des donneurs sains par cytométrie de flux. Les résultats

mettent en évidence qu'un plus grand nombre de cellules B expriment la galectin-3 à la surface chez les patients SEP que les donneurs sains. Cette différence est observée en particulier avec les patients SPMS. De plus, les cellules B activées des patients RRMS expriment davantage la galectin-3 que celles des donneurs sains. La caractérisation du phénotype des cellules B exprimant la galectin-3 nous a permis de constater que l'expression varie entre les différents groupes de cellules B mais qu'ils l'expriment tous. Les sous-types exprimant le plus la galectin-3 à la surface chez les patients sont les mêmes que chez les donneurs sains. De plus, la comparaison de l'expression de la galectin-3 par les différents groupes de cellules B entre les donneurs sains et les patients révèle que les cellules naïves, les cellules mémoires NCS et les cellules doubles négatives de ces derniers ont une expression augmentée. L'augmentation de la concentration en galectin-3 dans le sérum et le fait qu'elle soit exprimée de façon plus importante chez les patients SEP, en particulier ceux atteints des formes progressives de la maladie, suggère qu'elle joue un rôle dans la progression de celle-ci.

Cependant, il est important de noter certaines limitations de notre étude. Notamment la différence d'âge entre les donneurs sains et les patients qui est importante, ainsi que le nombre de donneurs sains inclus dans l'étude qui est inférieur au nombre de patients SEP. Il sera nécessaire d'inclure davantage de donneurs sains d'âge similaire aux patients dans le groupe contrôle afin que les moyennes d'âge ne soient pas trop éloignées et que les groupes soient de tailles équivalentes. Cela permettra de confirmer ou non que les résultats observés par cytométrie ne soient pas dus à la différence d'âge ou de taille entre les groupes. Ceci s'avère primordial étant donné que la concentration en galectin-3 dans le sang est influencée par l'âge (de Boer, van Veldhuisen et al. 2012) on peut penser que cela pourrait aussi être le cas pour la galectin-3 à la surface des cellules B. De plus, il faudrait évaluer les potentielles différences d'expression liées au sexe des individus.

Par la suite, différentes expériences *in vitro* ont été menées afin de déterminer si les cellules B activées produisaient et exprimaient la galectin-3. Nous avons mis en

évidence par ELISA que les cellules B activées selon le protocole permettant de générer des cellules B effectrices (productrices de cytokines pro-inflammatoires) produisent la galectin-3. Celle-ci est présente dans le milieu extracellulaire et sa concentration augmente avec le temps. Cela pourrait être expliqué par la libération de galectin-3 par les cellules ou bien par leur mort menant au relâchement de leur contenu dans le milieu extracellulaire. Il sera important dans le futur d'évaluer dans quelle mesure la mort des cellules B peut influencer la concentration de la galectin-3 dans le milieu extracellulaire. De plus, nous avons constaté que la concentration en galectin-3 dans le surnageant n'est pas influencée par la présence de diverses cytokines. Pour cette expérience, nous avons utilisé comme contrôle des cellules B activées en présence de mCD40L et anti-BCR, il serait intéressant d'ajouter comme contrôle négatif des cellules B non stimulées conservées en culture durant la même période.

L'expression de la galectin-3 peut être modulée par différents médiateurs, plusieurs études ont cherché à identifier les mécanismes de régulation impliqués dans l'expression et la sécrétion de la galectin-3. Cela a permis de déterminer que les monocytes libèrent la galectin-3 lorsqu'ils sont stimulés en présence de GM-CSF mais pas d'IL-4, de plus, la concentration en galectin-3 dans le milieu extracellulaire augmente avec le temps comme nous l'avons constaté dans notre étude (van Stijn, van den Broek et al. 2009). Mais, de façon intéressante, la stimulation des macrophages en présence d'IL-4 induit la sécrétion de galectin-3, qui va permettre de maintenir leur phénotype par une boucle de régulation autocrine (MacKinnon, Farnworth et al. 2008). Il semble donc que la sécrétion de galectin-3 soit régulée différemment selon les types cellulaires et l'environnement. On peut supposer que les cellules B ne répondent pas de la même façon peut-être à cause d'une différence des voies de signalisation activées.

D'autre part, nous avons analysé par cytométrie de flux l'expression de la galectin-3 à la surface des cellules B activées *in vitro* durant 2 jours afin de déterminer si elle était modulée par certaines cytokines. Bien que nous n'ayons pas constaté d'influence des cytokines sur la sécrétion de la galectin-3 nous avons pu observer une différence d'expression à la surface des cellules B. L'expression de la galectin-3 est augmentée par la présence d'IL-4, de plus, l'immunomarquage intracellulaire a permis

de mettre en évidence que les cellules B exprimant la galectin-3 avaient un profil pro-inflammatoire et exprimaient davantage de GM-CSF et IFN- γ que les cellules galectin-3 négatives. Nos résultats concordent avec la littérature qui montre que l'expression de la galectin-3 est augmentée dans un contexte pro-inflammatoire et qu'elle peut également participer à l'induire ou le maintenir (Saada, Reichert et al. 1996, Burguillos, Svensson et al. 2015, Yip, Carrillo-Jimenez et al. 2017). En effet, elle peut induire la production de cytokines pro-inflammatoires ou d'espèces réactives de l'oxygène et elle module l'activation de la voie JAK-STAT qui joue un rôle important dans la l'inflammation (Jeng, Frigeri et al. 1994, Yamaoka, Kuwabara et al. 1995, Jeon, Yoon et al. 2010). Cela suggère que la sécrétion de galectin-3 par les cellules B pourrait agir de façon paracrine ou autocrine sur les cellules de l'environnement et augmenter leur production de cytokines pro-inflammatoires en se liant à leur surface. Il est également possible que la présence de la galectin-3 à la surface des cellules B activées reflète uniquement une augmentation de l'expression de ses ligands à la surface de celles-ci sur lesquels la galectin-3 va se lier. Par exemple, la galectin-3 pourrait se lier à ALCAM dont l'expression est augmentée à la surface des cellules B activées (données non publiées du laboratoire du Dr Prat).

Chez les patients SEP on observe un débalancement dans la production de cytokines qui aboutit à un excès de cytokines pro-inflammatoires. Le GM-CSF et de l'IFN- γ sont impliqués dans la pathophysiologie de la SEP et d'autres maladies auto-immunes (Fillatreau 2015, Li, Rezk et al. 2015). Nous avons démontré qu'*in vitro* les cellules B activées exprimant la galectin-3 présentent un profil pro-inflammatoire avec une expression augmentée du GM-CSF et de l'IFN- γ , ce qui laisse supposer qu'elles pourraient constituer un nouveau groupe de cellules B effectrices. L'importance des cellules B productrices de GM-CSF a été mise en évidence récemment (Li, Rezk et al. 2015), mais peu de choses sont connues au sujet des cellules B productrices d'IFN- γ dans la SEP. En 2015 une étude a démontré qu'elles étaient nécessaires à l'induction d'un modèle murin de l'arthrite rhumatoïde (Olalekan, Cao et al. 2015) et qu'elles avaient la capacité à activer les cellules Th1 productrices de cytokines pro-inflammatoires favorisant ainsi une réponse auto-immunitaire. La comparaison du profil

d'expression de cytokines des cellules B galectin-3⁺ et galectin-3⁻ du sang total chez les donneurs sains et patients SEP permettrait de déterminer si les cellules B galectin-3⁺ produisent également davantage de cytokines pro-inflammatoires et si l'expression de cytokines est modifiée chez les patients SEP.

Nous avons par la suite testé si l'ajout de galectin-3 exogène augmentait la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires. Pour cela, nous avons stimulé des cellules B de donneurs sains selon le protocole permettant de générer des cellules B effectrices et nous les avons traités avec de galectin-3, ou non, afin d'évaluer l'influence de celle-ci sur le profil d'expression de cytokines. Les concentrations élevées de galectin-3 ont induit une diminution temporaire de l'expression de l'IFN- γ et de l'IL-6. Cependant, au second jour de stimulation ces effets n'étaient plus observables. Ces résultats ne concordent pas avec l'hypothèse selon laquelle l'ajout de galectin-3 exogène augmente la pathogénicité des cellules B. De nombreuses études ont montré que la galectin-3 présente dans le milieu extracellulaire pouvait induire la production et sécrétion de molécules et cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-6, G-CSF par les cellules endothéliales (Chen, Duckworth et al. 2013), la libération de superoxyde et d'IL-1 par les monocytes (Jeng, Frigeri et al. 1994, Liu, Hsu et al. 1995). Toutefois, il a aussi été constaté qu'elle pouvait avoir une action suppressive, elle peut induire l'apoptose des cellules T et également limiter leur capacité à être activée via leur TCR. La galectin-3 formerait des structures avec ses ligands à la surface des cellules T et limiterait le regroupement des TCR nécessaire à leur activation (Hsu, Chen et al. 2009). On peut supposer qu'en présence de fortes concentrations de galectin-3 dans le milieu extracellulaire, la formation de structures limitant le regroupement des BCR à la surface des cellules B mène à une diminution modeste et temporaire de l'activation des cellules B et donc à la diminution de la production de cytokines.

Dans l'expérience de stimulation des cellules B en présence de galectin-3 les concentrations de galectin-3 ajoutées sont supra-physiologiques. En effet, 100nM équivaut à 2,6 mg/L. Or la concentration moyenne dans le sérum des donneurs sains de notre étude est de 586,5 pg/mL (soit 586,5 ng/L), ce qui est similaire à d'autres

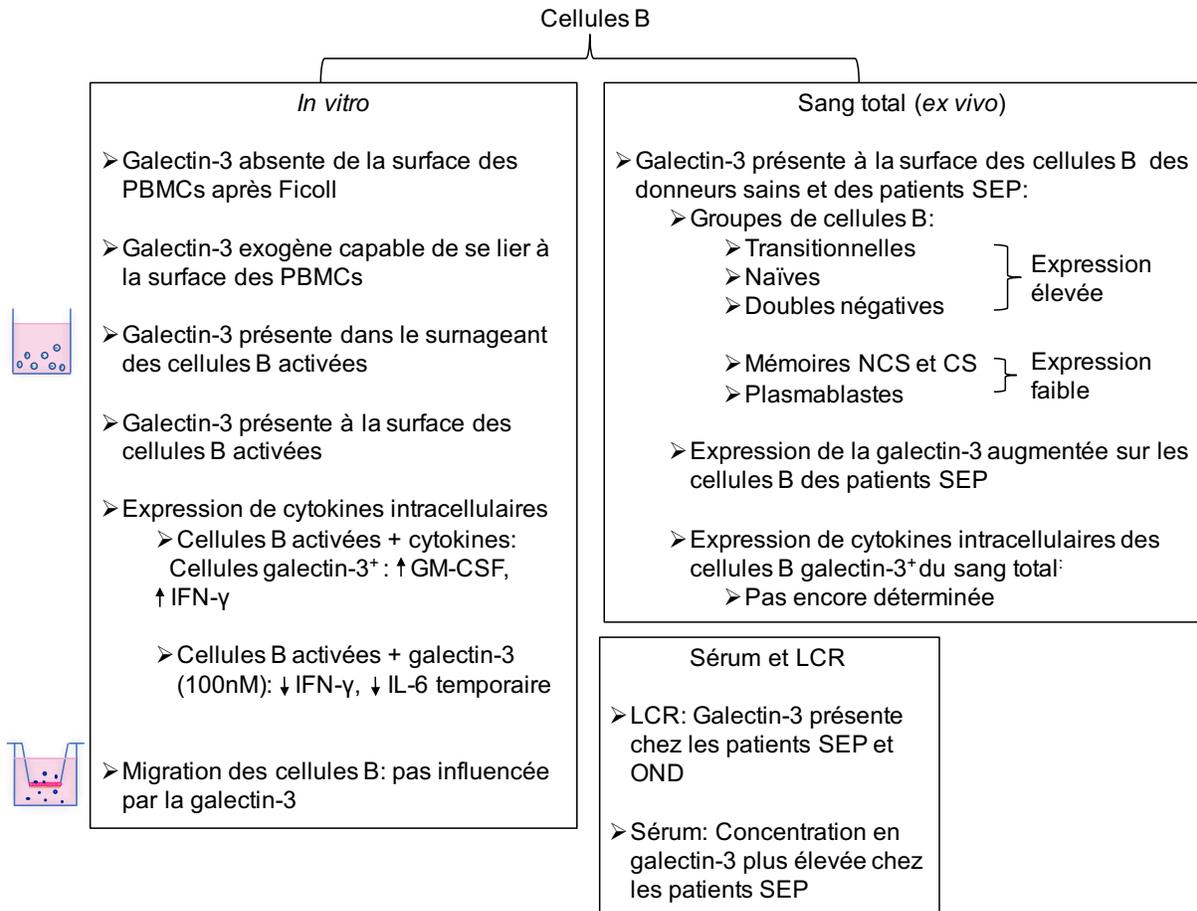
résultats dans la littérature (Sakaki, Oka et al. 2008). D'autre part, nos résultats montrent que, dans le surnageant de cellules B stimulées deux jours *in vitro* selon les conditions la concentration était comprise entre 948,6 pg/mL (soit 948,6 ng/L) et 1115 pg/mL (soit 1115 ng/L) ce qui est bien plus faible que les 100nM ajoutés durant la stimulation des cellules B en présence de galectin-3 exogène. Ainsi, l'ajout de concentrations supra-physiologiques de galectin-3 pourraient induire la formation de structure limitant le regroupement des BCR de façon temporaire. Mais en présence de concentrations plus faibles, s'approchant davantage des conditions physiologiques, la formation de ces structures n'aurait pas lieu et il n'y aurait donc pas d'action suppressive. Cela pourrait expliquer pourquoi, dans l'expérience de stimulation des cellules B en présence de cytokines, les cellules galectin-3⁺ produisent davantage de cytokines pro-inflammatoires que celles qui n'expriment pas la protéine. Cela expliquerait également que lorsqu'on ajoute de fortes concentrations de galectin-3 on ait une diminution de la production de cytokines.

Par ailleurs, nous avons constaté que suite à l'isolation par gradient de Ficoll que la galectin-3 était absente de la surface des cellules B. Étant donné que la galectin-3 ne possède pas de domaine transmembranaire, cela pourrait indiquer que la galectin-3 et ses ligands sont altérés ou bien que les liens qu'ils forment sont trop faibles pour persister. Nous avons donc testé la capacité des cellules B à lier la galectin-3 exogène. Les résultats montrent qu'après l'incubation la galectin-3 s'est liée à la surface de la surface de la majorité des cellules B. Cela suggère la présence de nombreux récepteurs capables de lier la galectin-3 à la surface des cellules B et donc que probablement c'est la faiblesse des liens entre la galectin-3 et ses ligands qui font qu'elle est retirée de la surface au cours de l'isolation. De plus, cela confirme que la galectin-3 exogène est en capacité de lier les cellules B dans les tests de migrations. Nous avons constaté que deux populations de cellules B se distinguaient dans leurs capacités à lier la galectin-3 exogène, une population *mid* et une population *high*. Nos résultats ne permettent pas de déterminer quels sous-types de cellules B constituent ces populations. Il serait intéressant d'investiguer cette piste dans le futur, cela permettrait de déterminer si les groupes de cellules B ayant la plus grande capacité à

lier la galectin-3 sont également ceux qui l'expriment le plus à la surface.

Par la suite, nous avons testé le rôle fonctionnel de la galectin-3 dans la migration des cellules B à travers les barrières du SNC grâce aux modèles *in vitro* de la BHE et BHM disponibles dans le laboratoire. Nous avons constaté que les concentrations de galectin-3 testées ici ne semblent pas avoir d'influence sur la migration des cellules B à travers la monocouche de cellules de la BHE non inflammée. En ce qui concerne la migration à travers la BHM il est difficile de conclure à la vue des résultats des deux donneurs. Une hypothèse que nous avons émise pouvant expliquer cette absence d'effet était que la galectin-3 présente dans le milieu de culture utilisé originalement biaisait nos résultats. Cependant, il s'est avéré que le test réalisé avec le milieu modifié (dépourvu de galectin-3) en condition non inflammée n'a pas mis en évidence d'influence du traitement avec la galectin-3 sur la migration. De plus, les trois tests réalisés avec le milieu modifié en condition d'inflammation n'ont pas non plus permis de distinguer d'influence de la galectin-3 sur la migration des cellules B. Ces données divergent de ce que nous attendions, en effet, nous avons émis l'hypothèse que la galectin-3 induirait une augmentation de la migration des cellules B à travers les barrières du SNC. Nous avons basé notre hypothèse sur les nombreuses études démontrant que la galectin-3 favorise l'adhésion ainsi que la migration cellulaire. De plus, certaines CAM exprimées par les cellules endothéliales sont des ligands de la galectin-3 comme ALCAM ou MCAM (Escoda-Ferran, Carrasco et al. 2014, Colomb, Wang et al. 2017). Cependant, l'influence de la galectin-3 sur ces mécanismes est complexe et varie selon le contexte, elle peut induire une augmentation de l'adhésion et une diminution de la migration (Vray, Camby et al. 2004), ou bien une diminution de l'adhésion (Furtak, Hatcher et al. 2001). Les conditions dans lesquelles nous avons évalué le rôle de la galectin-3 sur la migration des cellules B n'ont pas permis de mettre en évidence d'effet, mais cela n'exclut pas qu'elle puisse influencer ce processus dans un autre contexte comme une action chimiotactique ou bien sur l'adhérence en condition de flux.

Il semble qu'elle pourrait induire une diminution de la migration à travers le modèle de la BHE inflammée lorsqu'elle est ajoutée à la chambre supérieure chez certains donneurs. Ceci pourrait être dû à une adhésion accrue des cellules B sur les cellules endothéliales possiblement causée par l'augmentation de l'expression de certaines CAM qui se lient à la galectin-3. Afin de confirmer cette hypothèse, on pourrait réaliser des tests d'adhésion en flux sur des cellules endothéliales. La migration peut également être influencée par des gradients d'expression de molécules avec un effet chimiotactique. Or, la galectin-3 possède un effet chimiotactique sur les monocytes et macrophages, elle induit une augmentation de leur migration *in vitro* à haute concentration (1 μ M). L'ajout de galectin-3 uniquement dans la chambre inférieure lors des tests de migrations permettrait de déterminer si elle influe sur la migration des cellules B d'une façon similaire. D'autre part, la comparaison de la fréquence des cellules B galectin-3⁺ dans le sang total et le LCR des patients SEP permettrait également de nous informer sur l'influence de la galectin-3 sur la migration vers le SNC. En effet, le contenu cellulaire du LCR reflète celui du SNC et nous informe sur le type de leucocytes qui y sont présents c'est-à-dire ceux qui ont pu franchir les barrières du SNC. Une fréquence augmentée des cellules B galectin-3⁺ indiquerait un rôle favorisant la migration et inversement.



Sérum et LCR

- LCR: Galectin-3 présente chez les patients SEP et OND
- Sérum: Concentration en galectin-3 plus élevée chez les patients SEP



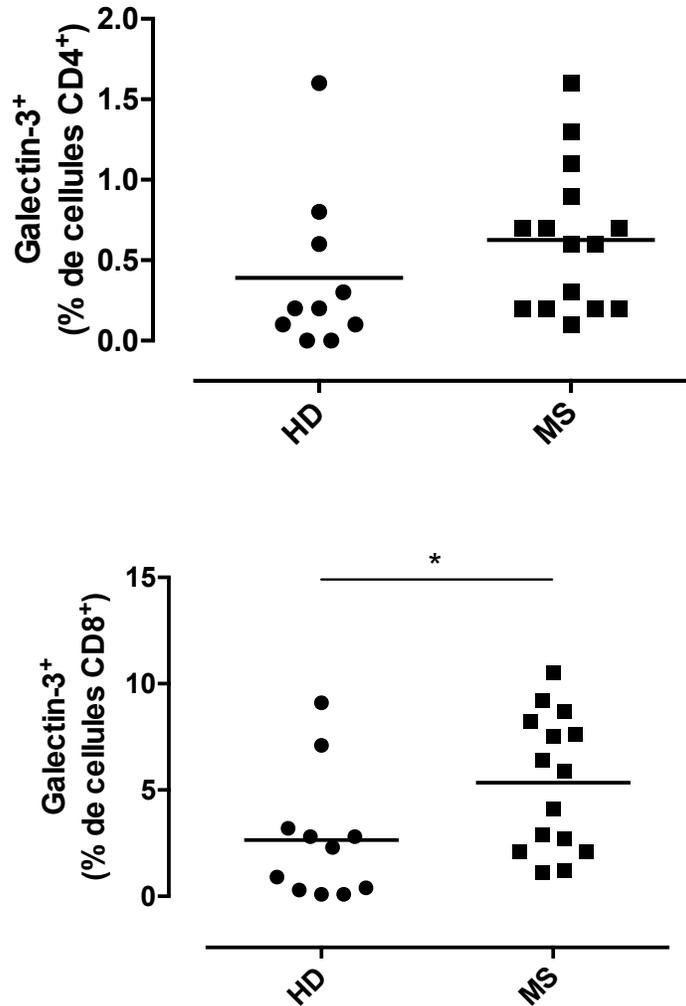
Figure 32 Schéma récapitulatif des principaux résultats de l'étude

4.1 Conclusion

Dans la présente étude, nous avons démontré et caractérisé l'expression de la galectin-3 à la surface des cellules B. *In vitro* l'effet de la galectin-3 sur la production de cytokines semble dépendre de sa concentration dans le milieu. Lorsque la concentration est proche de celle en conditions physiologiques les cellules B activées galectin-3⁺ ont un profil pro-inflammatoire. Cependant, l'ajout de galectin-3 à des concentrations supra-physiologiques induit une diminution de la production de cytokines. D'autre part, dans le sang total, la galectin-3 est plus faiblement exprimée par les cellules B considérées pro-inflammatoires. Mais le profil d'expression de cytokines des cellules B galectin-3⁺ du sang total reste à déterminer. Enfin, l'expression de la galectin-3 est augmentée chez les patients SEP ce qui suggère son implication dans la maladie et notamment un rôle dans sa progression.

La galectin-3 pourrait être un marqueur lié à la progression de la maladie. Une meilleure compréhension des mécanismes liés à la progression de la maladie et au rôle que peuvent jouer les cellules B exprimant la galectin-3 dans celle-ci permettrait d'ouvrir des pistes thérapeutiques. Plusieurs éléments suggèrent que les cellules B sont impliquées dans la progression de la SEP (Fraussen, de Bock et al. 2016). Mais, à ce jour, les traitements offerts aux patients SEP atteints d'une forme progressive sont relativement limités (Feinstein, Freeman et al. 2015). Ainsi, l'identification de nouveaux marqueurs pourrait permettre une amélioration du pronostic et de la prise en charge des patients. Afin d'évaluer le potentiel de la galectin-3 comme marqueur, on pourrait étudier la relation entre sa concentration dans le sérum et le nombre de poussées, le nombre de lésions observées par IRM ainsi que la progression de l'EDSS des patients SEP.

5 Annexe



Annexe 1 Comparaison de l'expression de la galectin-3 par les cellules T du le sang total entre les patients SEP et les donneurs sains

Graphique représentant le pourcentage de cellules T (A) CD4⁺ et (B) CD8⁺ exprimant la galectin-3 à la surface chez les donneurs sains et les patients SEP. (A) Le pourcentage moyen de cellules T CD4⁺ exprimant la galectin-3 à la surface est de 0,39% ($\pm 0,49\%$) chez les donneurs sains et de 0,63% ($\pm 0,45\%$) chez les patients SEP. (B) Le pourcentage moyen de cellules T CD8⁺ exprimant la galectin-3 à la surface est de 2,65% ($\pm 2,97\%$) chez les donneurs sains et de 5,35% ($\pm 3,19\%$) chez les patients SEP (T test non apparié, $p \leq 0,05$ *).

6 Bibliographies

- (1999). "TNF neutralization in MS: results of a randomized, placebo-controlled multicenter study. The Lenercept Multiple Sclerosis Study Group and The University of British Columbia MS/MRI Analysis Group." Neurology **53**(3): 457-465.
- Acosta-Rodriguez, E. V., C. L. Montes, C. C. Motran, E. I. Zuniga, F. T. Liu, G. A. Rabinovich and A. Gruppi (2004). "Galectin-3 mediates IL-4-induced survival and differentiation of B cells: functional cross-talk and implications during *Trypanosoma cruzi* infection." J Immunol **172**(1): 493-502.
- Adams, E., A. Basten and C. C. Goodnow (1990). "Intrinsic B-cell hyporesponsiveness accounts for self-tolerance in lysozyme/anti-lysozyme double-transgenic mice." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(15): 5687-5691.
- Adler, L. N., W. Jiang, K. Bhamidipati, M. Millican, C. Macaubas, S. C. Hung and E. D. Mellins (2017). "The Other Function: Class II-Restricted Antigen Presentation by B Cells." Front Immunol **8**: 319.
- Ahmad, N., H. J. Gabius, S. Andre, H. Kaltner, S. Sabesan, R. Roy, B. Liu, F. Macaluso and C. F. Brewer (2004). "Galectin-3 precipitates as a pentamer with synthetic multivalent carbohydrates and forms heterogeneous cross-linked complexes." J Biol Chem **279**(12): 10841-10847.
- Akahani, S., P. Nangia-Makker, H. Inohara, H. R. Kim and A. Raz (1997). "Galectin-3: a novel antiapoptotic molecule with a functional BH1 (NWGR) domain of Bcl-2 family." Cancer Res **57**(23): 5272-5276.
- Allt, G. and J. G. Lawrenson (1997). "Is the pial microvessel a good model for blood-brain barrier studies?" Brain Res Brain Res Rev **24**(1): 67-76.
- Alter, A., M. Duddy, S. Hebert, K. Biernacki, A. Prat, J. P. Antel, V. W. Yong, R. K. Nuttall, C. J. Pennington, D. R. Edwards and A. Bar-Or (2003). "Determinants of human B cell migration across brain endothelial cells." J Immunol **170**(9): 4497-4505.
- Alvarez, J. I., R. Cayrol and A. Prat (2011). "Disruption of central nervous system barriers in multiple sclerosis." Biochim Biophys Acta **1812**(2): 252-264.
- Amanna, I. J. and M. K. Slifka (2010). "Mechanisms that determine plasma cell lifespan and the duration of humoral immunity." Immunol Rev **236**: 125-138.
- Armulik, A., G. Genové and C. Betsholtz (2011). "Pericytes: Developmental, Physiological, and Pathological Perspectives, Problems, and Promises." Developmental Cell **21**(2): 193-215.
- Armulik, A., G. Genove, M. Mae, M. H. Nisancioglu, E. Wallgard, C. Niaudet, L. He, J. Norlin, P. Lindblom, K. Strittmatter, B. R. Johansson and C. Betsholtz (2010). "Pericytes regulate the blood-brain barrier." Nature **468**(7323): 557-561.
- Aspelund, A., S. Antila, S. T. Proulx, T. V. Karlsen, S. Karaman, M. Detmar, H. Wiig and K. Alitalo (2015). "A dural lymphatic vascular system that drains brain interstitial fluid and macromolecules." J Exp Med **212**(7): 991-999.
- Babbe, H., A. Roers, A. Waisman, H. Lassmann, N. Goebels, R. Hohlfeld, M. Friese, R. Schroder, M. Deckert, S. Schmidt, R. Ravid and K. Rajewsky (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.
- Balan, V., P. Nangia-Makker and A. Raz (2010). "Galectins as cancer biomarkers." Cancers (Basel) **2**(2): 592-610.
- Bar-Or, A., L. Fawaz, B. Fan, P. J. Darlington, A. Rieger, C. Ghorayeb, P. A. Calabresi, E. Waubant, S. L. Hauser, J. Zhang and C. H. Smith (2010). "Abnormal B-cell cytokine responses a trigger of T-cell-mediated disease in MS?" Ann Neurol **67**(4): 452-461.
- Barnett, M. H. and J. W. Prineas (2004). "Relapsing and remitting multiple sclerosis: pathology of the newly forming lesion." Ann Neurol **55**(4): 458-468.
- Barr, T. A., P. Shen, S. Brown, V. Lampropoulou, T. Roch, S. Lawrie, B. Fan, R. A. O'Connor, S. M. Anderton, A. Bar-Or, S. Fillatreau and D. Gray (2012). "B cell depletion therapy ameliorates autoimmune disease through ablation of IL-6-producing B cells." J Exp Med **209**(5): 1001-1010.
- Bartholomaeus, I., N. Kawakami, F. Odoardi, C. Schlager, D. Miljkovic, J. W. Ellwart, W. E. Klinkert, C. Flugel-Koch, T. B. Issekutz, H. Wekerle and A. Flugel (2009). "Effector T cell interactions with meningeal vascular structures in nascent autoimmune CNS lesions." Nature **462**(7269): 94-98.
- Barun, B. and A. Bar-Or (2012). "Treatment of multiple sclerosis with Anti-CD20 antibodies." Clinical Immunology **142**(1): 31-37.
- Batista, F. D. and N. E. Harwood (2009). "The who, how and where of antigen presentation to B cells." Nat Rev Immunol **9**(1): 15-27.
- Batoulis, H., K. Addicks and S. Kuerten (2010). "Emerging concepts in autoimmune encephalomyelitis beyond the CD4/T(H)1 paradigm." Ann Anat **192**(4): 179-193.
- Bazzoni, G. and E. Dejana (2004). "Endothelial cell-to-cell junctions: molecular organization and role in vascular homeostasis." Physiol Rev **84**(3): 869-901.
- Bettelli, E., Y. Carrier, W. Gao, T. Korn, T. B. Strom, M. Oukka, H. L. Weiner and V. K. Kuchroo (2006). "Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells." Nature **441**(7090): 235-238.
- Blair, P. A., L. Y. Norena, F. Flores-Borja, D. J. Rawlings, D. A. Isenberg, M. R. Ehrenstein and C. Mauri (2010). "CD19(+)CD24(hi)CD38(hi) B cells exhibit regulatory capacity in healthy individuals but are functionally impaired in systemic Lupus Erythematosus patients." Immunity **32**(1): 129-140.
- Blauth, K., J. Soltys, A. Matschulat, C. R. Reiter, A. Ritchie, N. L. Baird, J. L. Bennett and G. P. Owens (2015). "Antibodies produced by clonally expanded plasma cells in multiple sclerosis cerebrospinal fluid cause demyelination of spinal cord explants." Acta Neuropathol **130**(6): 765-781.
- Bradley, J. R. (2008). "TNF-mediated inflammatory disease." J Pathol **214**(2): 149-160.
- Broux, B., E. Gowing and A. Prat (2015). "Glial regulation of the blood-brain barrier in health and disease." Semin Immunopathol **37**(6): 577-590.
- Bubien, J. K., L. J. Zhou, P. D. Bell, R. A. Frizzell and T. F. Tedder (1993). "Transfection of the CD20 cell surface molecule into ectopic cell types generates a Ca²⁺ conductance found constitutively in B lymphocytes." J Cell Biol **121**(5): 1121-1132.

- Burguillos, Miguel A., M. Svensson, T. Schulte, A. Boza-Serrano, A. Garcia-Quintanilla, E. Kavanagh, M. Santiago, N. Viceconte, Maria J. Oliva-Martin, Ahmed M. Osman, E. Salomonsson, L. Amar, A. Persson, K. Blomgren, A. Achour, E. Englund, H. Leffler, Jose L. Venero, B. Joseph and T. Deierborg (2015). "Microglia-Secreted Galectin-3 Acts as a Toll-like Receptor 4 Ligand and Contributes to Microglial Activation." Cell Reports **10**(9): 1626-1638.
- Carrasco, Y. R. and F. D. Batista (2007). "B Cells Acquire Particulate Antigen in a Macrophage-Rich Area at the Boundary between the Follicle and the Subcapsular Sinus of the Lymph Node." Immunity **27**(1): 160-171.
- Carson, M. J., J. M. Doose, B. Melchior, C. D. Schmid and C. C. Ploix (2006). "CNS immune privilege: hiding in plain sight." Immunol Rev **213**: 48-65.
- Carter, N. A., E. C. Rosser and C. Mauri (2012). "Interleukin-10 produced by B cells is crucial for the suppression of Th17/Th1 responses, induction of T regulatory type 1 cells and reduction of collagen-induced arthritis." Arthritis Res Ther **14**(1): R32.
- Carter, N. A., R. Vasconcellos, E. C. Rosser, C. Tulone, A. Munoz-Suano, M. Kamanaka, M. R. Ehrenstein, R. A. Flavell and C. Mauri (2011). "Mice lacking endogenous IL-10-producing regulatory B cells develop exacerbated disease and present with an increased frequency of Th1/Th17 but a decrease in regulatory T cells." J Immunol **186**(10): 5569-5579.
- Cayrol, R., 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 and A. Prat (2008). "Activated leukocyte cell adhesion molecule promotes leukocyte trafficking into the central nervous system." Nat Immunol **9**(2): 137-145.
- Cepok, S., M. Jacobsen, S. Schock, B. Omer, S. Jaekel, I. Boddeker, W. H. Oertel, N. Sommer and B. Hemmer (2001). "Patterns of cerebrospinal fluid pathology correlate with disease progression in multiple sclerosis." Brain **124**(Pt 11): 2169-2176.
- Cepok, S., B. Rosche, V. Grummel, F. Vogel, D. Zhou, J. Sayn, N. Sommer, H. P. Hartung and B. Hemmer (2005). "Short-lived plasma blasts are the main B cell effector subset during the course of multiple sclerosis." Brain **128**(Pt 7): 1667-1676.
- Cerutti, A., M. Cols and I. Puga (2012). "Activation of B cells by non-canonical helper signals." EMBO Rep **13**(9): 798-810.
- Chaplin, D. D. (2010). "Overview of the immune response." J Allergy Clin Immunol **125**(2 Suppl 2): S3-23.
- Chen, C., C. A. Duckworth, Q. Zhao, D. M. Pritchard, J. M. Rhodes and L. G. Yu (2013). "Increased circulation of galectin-3 in cancer induces secretion of metastasis-promoting cytokines from blood vascular endothelium." Clin Cancer Res **19**(7): 1693-1704.
- Chen, C., M. Z. Radic, J. Erikson, S. A. Camper, S. Litwin, R. R. Hardy and M. Weigert (1994). "Deletion and editing of B cells that express antibodies to DNA." J Immunol **152**(4): 1970-1982.
- Chiarini, M., A. Sottini, D. Bertoli, F. Serana, L. Caimi, S. Rasia, R. Capra and L. Imberti (2015). "Newly produced T and B lymphocytes and T-cell receptor repertoire diversity are reduced in peripheral blood of fingolimod-treated multiple sclerosis patients." Mult Scler **21**(6): 726-734.

- Choi, S. R., O. W. Howell, D. Carassiti, R. Magliozzi, D. Gveric, P. A. Muraro, R. Nicholas, F. Roncaroli and R. Reynolds (2012). "Meningeal inflammation plays a role in the pathology of primary progressive multiple sclerosis." Brain **135**(Pt 10): 2925-2937.
- Claes, N., J. Fraussen, P. Stinissen, R. Hupperts and V. Somers (2015). "B Cells Are Multifunctional Players in Multiple Sclerosis Pathogenesis: Insights from Therapeutic Interventions." Front Immunol **6**: 642.
- Claes, N., J. Fraussen, M. Vanheusden, N. Hellings, P. Stinissen, B. Van Wijmeersch, R. Hupperts and V. Somers (2016). "Age-Associated B Cells with Proinflammatory Characteristics Are Expanded in a Proportion of Multiple Sclerosis Patients." J Immunol **197**(12): 4576-4583.
- Clark, M. C., M. Pang, D. K. Hsu, F. T. Liu, S. de Vos, R. D. Gascoyne, J. Said and L. G. Baum (2012). "Galectin-3 binds to CD45 on diffuse large B-cell lymphoma cells to regulate susceptibility to cell death." Blood **120**(23): 4635-4644.
- Collison, L. W., C. J. Workman, T. T. Kuo, K. Boyd, Y. Wang, K. M. Vignali, R. Cross, D. Sehy, R. S. Blumberg and D. A. Vignali (2007). "The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function." Nature **450**(7169): 566-569.
- Colomb, F., W. Wang, D. Simpson, M. Zafar, R. Beynon, J. M. Rhodes and L. G. Yu (2017). "Galectin-3 interacts with the cell-surface glycoprotein CD146 (MCAM, MUC18) and induces secretion of metastasis-promoting cytokines from vascular endothelial cells." J Biol Chem **292**(20): 8381-8389.
- Compston, A. and A. Coles (2008). "Multiple sclerosis." Lancet **372**(9648): 1502-1517.
- Coomber, B. L. and P. A. Stewart (1985). "Morphometric analysis of CNS microvascular endothelium." Microvasc Res **30**(1): 99-115.
- Corsiero, E., A. Nerviani, M. Bombardieri and C. Pitzalis (2016). "Ectopic Lymphoid Structures: Powerhouse of Autoimmunity." Front Immunol **7**: 430.
- Cross, A. H. and E. Waubant (2011). "MS and the B cell controversy." Biochim Biophys Acta **1812**(2): 231-238.
- Crotty, S. (2011). "Follicular helper CD4 T cells (TFH)." Annu Rev Immunol **29**: 621-663.
- Daneman, R. and A. Prat (2015). "The blood-brain barrier." Cold Spring Harb Perspect Biol **7**(1): a020412.
- de Boer, R. A., D. J. van Veldhuisen, R. T. Gansevoort, A. C. Muller Kobold, W. H. van Gilst, H. L. Hillege, S. J. Bakker and P. van der Harst (2012). "The fibrosis marker galectin-3 and outcome in the general population." J Intern Med **272**(1): 55-64.
- de Oliveira, F. L., M. Gatto, N. Bassi, R. Luisetto, A. Ghirardello, L. Punzi and A. Doria (2015). "Galectin-3 in autoimmunity and autoimmune diseases." Exp Biol Med (Maywood) **240**(8): 1019-1028.
- de Waard, A., S. Hickman and S. Kornfeld (1976). "Isolation and properties of beta-galactoside binding lectins of calf heart and lung." J Biol Chem **251**(23): 7581-7587.
- Deans, J. P., H. Li and M. J. Polyak (2002). "CD20-mediated apoptosis: signalling through lipid rafts." Immunology **107**(2): 176-182.
- Demetriou, M., M. Granovsky, S. Quaggin and J. W. Dennis (2001). "Negative regulation of T-cell activation and autoimmunity by Mgat5 N-glycosylation." Nature **409**(6821): 733-739.

- Dendrou, C. A., L. Fugger and M. A. Friese (2015). "Immunopathology of multiple sclerosis." Nat Rev Immunol **15**(9): 545-558.
- Dhirapong, A., A. Lleo, P. Leung, M. E. Gershwin and F. T. Liu (2009). "The immunological potential of galectin-1 and -3." Autoimmun Rev **8**(5): 360-363.
- Disanto, G., J. M. Morahan, M. H. Barnett, G. Giovannoni and S. V. Ramagopalan (2012). "The evidence for a role of B cells in multiple sclerosis." Neurology **78**(11): 823-832.
- Dohgu, S., F. Takata, A. Yamauchi, S. Nakagawa, T. Egawa, M. Naito, T. Tsuruo, Y. Sawada, M. Niwa and Y. Kataoka (2005). "Brain pericytes contribute to the induction and up-regulation of blood-brain barrier functions through transforming growth factor- β production." Brain Research **1038**(2): 208-215.
- Dong, R., M. Zhang, Q. Hu, S. Zheng, A. Soh, Y. Zheng and H. Yuan (2018). "Galectin-3 as a novel biomarker for disease diagnosis and a target for therapy (Review)." Int J Mol Med **41**(2): 599-614.
- Doverhag, C., M. Hedtjarn, F. Poirier, C. Mallard, H. Hagberg, A. Karlsson and K. Savman (2010). "Galectin-3 contributes to neonatal hypoxic-ischemic brain injury." Neurobiol Dis **38**(1): 36-46.
- Duddy, M., M. Niino, F. Adatia, S. Hebert, M. Freedman, H. Atkins, H. J. Kim and A. Bar-Or (2007). "Distinct effector cytokine profiles of memory and naive human B cell subsets and implication in multiple sclerosis." J Immunol **178**(10): 6092-6099.
- Duddy, M. E., A. Alter and A. Bar-Or (2004). "Distinct profiles of human B cell effector cytokines: a role in immune regulation?" J Immunol **172**(6): 3422-3427.
- Dumic, J., S. Dabelic and M. Flogel (2006). "Galectin-3: an open-ended story." Biochim Biophys Acta **1760**(4): 616-635.
- Ebers, G. C., A. D. Sadovnick and N. J. Risch (1995). "A genetic basis for familial aggregation in multiple sclerosis. Canadian Collaborative Study Group." Nature **377**(6545): 150-151.
- Elliott, C., M. Lindner, A. Arthur, K. Brennan, S. Jarius, J. Hussey, A. Chan, A. Stroet, T. Olsson, H. Willison, S. C. Barnett, E. Meinl and C. Linington (2012). "Functional identification of pathogenic autoantibody responses in patients with multiple sclerosis." Brain **135**(Pt 6): 1819-1833.
- Engelhardt, B. and R. M. Ransohoff (2012). "Capture, crawl, cross: the T cell code to breach the blood-brain barriers." Trends Immunol **33**(12): 579-589.
- Engelhardt, B. and L. Sorokin (2009). "The blood-brain and the blood-cerebrospinal fluid barriers: function and dysfunction." Semin Immunopathol **31**(4): 497-511.
- Escoda-Ferran, C., E. Carrasco, M. Caballero-Banos, C. Miro-Julia, M. Martinez-Florensa, M. Consuegra-Fernandez, V. G. Martinez, F. T. Liu and F. Lozano (2014). "Modulation of CD6 function through interaction with Galectin-1 and -3." FEBS Lett **588**(17): 2805-2813.
- Feinstein, A., J. Freeman and A. C. Lo (2015). "Treatment of progressive multiple sclerosis: what works, what does not, and what is needed." Lancet Neurol **14**(2): 194-207.
- Feldmann, M. and R. N. Maini (2001). "Anti-TNF alpha therapy of rheumatoid arthritis: what have we learned?" Annu Rev Immunol **19**: 163-196.

- Festa, E. D., K. Hankiewicz, S. Kim, J. Skurnick, L. J. Wolansky, S. D. Cook and D. Cadavid (2009). "Serum levels of CXCL13 are elevated in active multiple sclerosis." Mult Scler **15**(11): 1271-1279.
- Feuk-Lagerstedt, E., E. T. Jordan, H. Leffler, C. Dahlgren and A. Karlsson (1999). "Identification of CD66a and CD66b as the major galectin-3 receptor candidates in human neutrophils." J Immunol **163**(10): 5592-5598.
- Fillatreau, S. (2015). "Pathogenic functions of B cells in autoimmune diseases: IFN-gamma production joins the criminal gang." Eur J Immunol **45**(4): 966-970.
- Fillatreau, S., C. H. Sweenie, M. J. McGeachy, D. Gray and S. M. Anderton (2002). "B cells regulate autoimmunity by provision of IL-10." Nat Immunol **3**(10): 944-950.
- Fletcher, J. M., S. J. Lalor, C. M. Sweeney, N. Tubridy and K. H. Mills (2010). "T cells in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis." Clin Exp Immunol **162**(1): 1-11.
- Flores-Borja, F., A. Bosma, D. Ng, V. Reddy, M. R. Ehrenstein, D. A. Isenberg and C. Mauri (2013). "CD19+CD24hiCD38hi B cells maintain regulatory T cells while limiting TH1 and TH17 differentiation." Sci Transl Med **5**(173): 173ra123.
- Fortuna-Costa, A., A. M. Gomes, E. O. Kozlowski, M. P. Stelling and M. S. Pavao (2014). "Extracellular galectin-3 in tumor progression and metastasis." Front Oncol **4**: 138.
- Fraussen, J., N. Claes, B. Van Wijmeersch, J. van Horsen, P. Stinissen, R. Hupperts and V. Somers (2016). "B cells of multiple sclerosis patients induce autoreactive proinflammatory T cell responses." Clinical Immunology **173**(Supplement C): 124-132.
- Fraussen, J., L. de Bock and V. Somers (2016). "B cells and antibodies in progressive multiple sclerosis: Contribution to neurodegeneration and progression." Autoimmun Rev **15**(9): 896-899.
- Freedman, M. S., J. M. Kaplan and S. Markovic-Plese (2013). "Insights into the Mechanisms of the Therapeutic Efficacy of Alemtuzumab in Multiple Sclerosis." J Clin Cell Immunol **4**(4).
- Freedman, M. S., E. J. Thompson, F. Deisenhammer, G. Giovannoni, G. Grimsley, G. Keir, S. Ohman, M. K. Racke, M. Sharief, C. J. Sindic, F. Sellebjerg and W. W. Tourtellotte (2005). "Recommended standard of cerebrospinal fluid analysis in the diagnosis of multiple sclerosis: a consensus statement." Arch Neurol **62**(6): 865-870.
- Friese, M. A. and L. Fugger (2005). "Autoreactive CD8+ T cells in multiple sclerosis: a new target for therapy?" Brain **128**(Pt 8): 1747-1763.
- Friese, M. A., K. B. Jakobsen, L. Friis, R. Etzensperger, M. J. Craner, R. M. McMahon, L. T. Jensen, V. Huygelen, E. Y. Jones, J. I. Bell and L. Fugger (2008). "Opposing effects of HLA class I molecules in tuning autoreactive CD8+ T cells in multiple sclerosis." Nat Med **14**(11): 1227-1235.
- Furtak, V., F. Hatcher and J. Ochieng (2001). "Galectin-3 mediates the endocytosis of beta-1 integrins by breast carcinoma cells." Biochem Biophys Res Commun **289**(4): 845-850.
- Gatto, D. and R. Brink (2010). "The germinal center reaction." J Allergy Clin Immunol **126**(5): 898-907; quiz 908-899.

- Gausas, J., P. Y. Paterson, E. D. Day and M. C. Dal Canto (1982). "Intact B-cell activity is essential for complete expression of experimental allergic encephalomyelitis in Lewis rats." Cell Immunol **72**(2): 360-366.
- Gay, F. W., T. J. Drye, G. W. Dick and M. M. Esiri (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.
- Gbadamosi, J., C. Buhmann, W. Tessmer, A. Moench, F. Haag and C. Heesen (2003). "Effects of mitoxantrone on multiple sclerosis patients' lymphocyte subpopulations and production of immunoglobulin, TNF-alpha and IL-10." Eur Neurol **49**(3): 137-141.
- Gee, J. R. and J. N. Keller (2005). "Astrocytes: regulation of brain homeostasis via apolipoprotein E." The International Journal of Biochemistry & Cell Biology **37**(6): 1145-1150.
- Genc, K., D. L. Dona and A. T. Reder (1997). "Increased CD80(+) B cells in active multiple sclerosis and reversal by interferon beta-1b therapy." J Clin Invest **99**(11): 2664-2671.
- Gittens, B. R., J. V. Bodkin, S. Nourshargh, M. Perretti and D. Cooper (2017). "Galectin-3: A Positive Regulator of Leukocyte Recruitment in the Inflamed Microcirculation." J Immunol **198**(11): 4458-4469.
- Goodin, D. S. (2014). "The epidemiology of multiple sclerosis: insights to disease pathogenesis." Handb Clin Neurol **122**: 231-266.
- Haas, J., I. Bekeredjian-Ding, M. Milkova, B. Balint, A. Schwarz, M. Korporal, S. Jarius, B. Fritz, H. M. Lorenz and B. Wildemann (2011). "B cells undergo unique compartmentalized redistribution in multiple sclerosis." J Autoimmun **37**(4): 289-299.
- Hauser, S. L., 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 and L. Kappos (2017). "Ocrelizumab versus Interferon Beta-1a in Relapsing Multiple Sclerosis." N Engl J Med **376**(3): 221-234.
- Hauser, S. L., E. Waubant, D. L. Arnold, T. Vollmer, J. Antel, R. J. Fox, A. Bar-Or, M. Panzara, N. Sarkar, S. Agarwal, A. Langer-Gould and C. H. Smith (2008). "B-cell depletion with rituximab in relapsing-remitting multiple sclerosis." N Engl J Med **358**(7): 676-688.
- Hawkins, B. T. and T. P. Davis (2005). "The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease." Pharmacol Rev **57**(2): 173-185.
- Hemmer, B., S. Cepok, S. Nessler and N. Sommer (2002). "Pathogenesis of multiple sclerosis: an update on immunology." Curr Opin Neurol **15**(3): 227-231.
- Henderson, A. P., M. H. Barnett, J. D. Parratt and J. W. Prineas (2009). "Multiple sclerosis: distribution of inflammatory cells in newly forming lesions." Ann Neurol **66**(6): 739-753.
- Hohlfeld, R., K. Dornmair, E. Meinl and H. Wekerle (2016). "The search for the target antigens of multiple sclerosis, part 2: CD8+ T cells, B cells, and antibodies in the focus of reverse-translational research." Lancet Neurol **15**(3): 317-331.
- Hollenbach, J. A. and J. R. Oksenberg (2015). "The immunogenetics of multiple sclerosis: A comprehensive review." Journal of Autoimmunity **64**: 13-25.

- Holman, D. W., R. S. Klein and R. M. Ransohoff (2011). "The blood–brain barrier, chemokines and multiple sclerosis." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease **1812**(2): 220-230.
- Hoyer, K. K., M. Pang, D. Gui, I. P. Shintaku, I. Kuwabara, F. T. Liu, J. W. Said, L. G. Baum and M. A. Teitell (2004). "An anti-apoptotic role for galectin-3 in diffuse large B-cell lymphomas." Am J Pathol **164**(3): 893-902.
- Hoyos, H. C., M. Marder, R. Ulrich, V. Gudi, M. Stangel, G. A. Rabinovich, L. A. Pasquini and J. M. Pasquini (2016). "The Role of Galectin-3: From Oligodendroglial Differentiation and Myelination to Demyelination and Remyelination Processes in a Cuprizone-Induced Demyelination Model." Adv Exp Med Biol **949**: 311-332.
- Hoyos, H. C., M. Rinaldi, S. P. Mendez-Huergo, M. Marder, G. A. Rabinovich, J. M. Pasquini and L. A. Pasquini (2014). "Galectin-3 controls the response of microglial cells to limit cuprizone-induced demyelination." Neurobiol Dis **62**: 441-455.
- Hsu, D. K., H. Y. Chen and F. T. Liu (2009). "Galectin-3 regulates T-cell functions." Immunol Rev **230**(1): 114-127.
- Huang, H., K. Ito, F. Dangond and S. Dhib-Jalbut (2013). "Effect of interferon beta-1a on B7.1 and B7.2 B-cell expression and its impact on T-cell proliferation." J Neuroimmunol **258**(1-2): 27-31.
- Huber, J. D., R. D. Egleton and T. P. Davis (2001). "Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions in the blood–brain barrier." Trends in Neurosciences **24**(12): 719-725.
- Hughes, R. C. (2001). "Galectins as modulators of cell adhesion." Biochimie **83**(7): 667-676.
- Huseby, E. S., D. Liggitt, T. Brabb, B. Schnabel, C. Ohlen and J. Goverman (2001). "A pathogenic role for myelin-specific CD8(+) T cells in a model for multiple sclerosis." J Exp Med **194**(5): 669-676.
- Ifergan, I., H. Kebir, M. Bernard, K. Wosik, A. Dodelet-Devillers, R. Cayrol, N. Arbour and A. Prat (2008). "The blood-brain barrier induces differentiation of migrating monocytes into Th17-polarizing dendritic cells." Brain **131**(Pt 3): 785-799.
- Ireland, S. J., A. A. Guzman, E. M. Frohman and N. L. Monson (2016). "B cells from relapsing remitting multiple sclerosis patients support neuro-antigen-specific Th17 responses." J Neuroimmunol **291**: 46-53.
- Ireland, S. J., A. A. Guzman, D. E. O'Brien, S. Hughes, B. Greenberg, A. Flores, D. Graves, G. Remington, E. M. Frohman, L. S. Davis and N. L. Monson (2014). "The effect of glatiramer acetate therapy on functional properties of B cells from patients with relapsing-remitting multiple sclerosis." JAMA Neurol **71**(11): 1421-1428.
- Iwata, Y., T. Matsushita, M. Horikawa, D. J. Dilillo, K. Yanaba, G. M. Venturi, P. M. Szabolcs, S. H. Bernstein, C. M. Magro, A. D. Williams, R. P. Hall, E. W. St Clair and T. F. Tedder (2011). "Characterization of a rare IL-10-competent B-cell subset in humans that parallels mouse regulatory B10 cells." Blood **117**(2): 530-541.
- Jacobsen, M., S. Cepok, E. Quak, M. Happel, R. Gaber, A. Ziegler, S. Schock, W. H. Oertel, N. Sommer and B. Hemmer (2002). "Oligoclonal expansion of memory CD8+ T cells in cerebrospinal fluid from multiple sclerosis patients." Brain **125**(3): 538-550.

- Jager, A., V. Dardalhon, R. A. Sobel, E. Bettelli and V. K. Kuchroo (2009). "Th1, Th17, and Th9 effector cells induce experimental autoimmune encephalomyelitis with different pathological phenotypes." *J Immunol* **183**(11): 7169-7177.
- Jeng, K. C., L. G. Frigeri and F. T. Liu (1994). "An endogenous lectin, galectin-3 (epsilon BP/Mac-2), potentiates IL-1 production by human monocytes." *Immunol Lett* **42**(3): 113-116.
- Jeon, S. B., H. J. Yoon, C. Y. Chang, H. S. Koh, S. H. Jeon and E. J. Park (2010). "Galectin-3 exerts cytokine-like regulatory actions through the JAK-STAT pathway." *J Immunol* **185**(11): 7037-7046.
- Jiang, H. R., Z. Al Rasebi, E. Mensah-Brown, A. Shahin, D. Xu, C. S. Goodyear, S. Y. Fukada, F. T. Liu, F. Y. Liew and M. L. Lukic (2009). "Galectin-3 deficiency reduces the severity of experimental autoimmune encephalomyelitis." *J Immunol* **182**(2): 1167-1173.
- Joseph, F. G., C. L. Hirst, T. P. Pickersgill, Y. Ben-Shlomo, N. P. Robertson and N. J. Scolding (2009). "CSF oligoclonal band status informs prognosis in multiple sclerosis: a case control study of 100 patients." *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **80**(3): 292-296.
- Junker, A., J. Ivanidze, J. Malotka, I. Eiglmeier, H. Lassmann, H. Wekerle, E. Meinl, R. Hohlfeld and K. Dornmair (2007). "Multiple sclerosis: T-cell receptor expression in distinct brain regions." *Brain* **130**(Pt 11): 2789-2799.
- Kakalacheva, K. and J. D. Lunemann (2011). "Environmental triggers of multiple sclerosis." *FEBS Lett* **585**(23): 3724-3729.
- Kalinowska-Lyszczarz, A., A. Szczucinski, M. A. Pawlak and J. Losy (2011). "Clinical study on CXCL13, CCL17, CCL20 and IL-17 as immune cell migration navigators in relapsing-remitting multiple sclerosis patients." *J Neurol Sci* **300**(1-2): 81-85.
- Kearney, H., D. R. Altmann, R. S. Samson, M. C. Yiannakas, C. A. Wheeler-Kingshott, O. Ciccarelli and D. H. Miller (2015). "Cervical cord lesion load is associated with disability independently from atrophy in MS." *Neurology* **84**(4): 367-373.
- Kebir, H., I. Ifergan, J. I. Alvarez, M. Bernard, J. Poirier, N. Arbour, P. Duquette and A. Prat (2009). "Preferential recruitment of interferon-gamma-expressing TH17 cells in multiple sclerosis." *Ann Neurol* **66**(3): 390-402.
- Kebir, H., K. Kreymborg, I. Ifergan, A. Dodelet-Devillers, R. Cayrol, M. Bernard, F. Giuliani, N. Arbour, B. Becher and A. Prat (2007). "Human TH17 lymphocytes promote blood-brain barrier disruption and central nervous system inflammation." *Nat Med* **13**(10): 1173-1175.
- Khademi, M., I. Kockum, M. L. Andersson, E. Iacobaeus, L. Brundin, F. Sellebjerg, J. Hillert, F. Piehl and T. Olsson (2011). "Cerebrospinal fluid CXCL13 in multiple sclerosis: a suggestive prognostic marker for the disease course." *Mult Scler* **17**(3): 335-343.
- Kirk, J., J. Plumb, M. Mirakhur and S. McQuaid (2003). "Tight junctional abnormality in multiple sclerosis white matter affects all calibres of vessel and is associated with blood-brain barrier leakage and active demyelination." *J Pathol* **201**(2): 319-327.
- Kivisakk, P., D. J. Mahad, M. K. Callahan, C. Trebst, B. Tucky, T. Wei, L. Wu, E. S. Baekkevold, H. Lassmann, S. M. Staugaitis, J. J. Campbell and R. M. Ransohoff (2003). "Human cerebrospinal fluid central memory CD4+ T cells: evidence for trafficking through choroid plexus and meninges via P-selectin." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(14): 8389-8394.

- Klein, L., M. Hinterberger, G. Wirnsberger and B. Kyewski (2009). "Antigen presentation in the thymus for positive selection and central tolerance induction." Nat Rev Immunol **9**(12): 833-844.
- Kleine, T. O. and L. Benes (2006). "Immune surveillance of the human central nervous system (CNS): different migration pathways of immune cells through the blood-brain barrier and blood-cerebrospinal fluid barrier in healthy persons." Cytometry A **69**(3): 147-151.
- Knippenberg, S., E. Peelen, J. Smolders, M. Thewissen, P. Menheere, J. W. Cohen Tervaert, R. Hupperts and J. Damoiseaux (2011). "Reduction in IL-10 producing B cells (Breg) in multiple sclerosis is accompanied by a reduced naive/memory Breg ratio during a relapse but not in remission." J Neuroimmunol **239**(1-2): 80-86.
- Komiyama, Y., S. Nakae, T. Matsuki, A. Nambu, H. Ishigame, S. Kakuta, K. Sudo and Y. Iwakura (2006). "IL-17 plays an important role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis." J Immunol **177**(1): 566-573.
- Koudriavtseva, T., E. Sbardella, E. Trento, V. Bordignon, G. D'Agosto and P. Cordiali-Fei (2014). "Long-term follow-up of peripheral lymphocyte subsets in a cohort of multiple sclerosis patients treated with natalizumab." Clin Exp Immunol **176**(3): 320-326.
- Krumbholz, M., H. Faber, F. Steinmeyer, L. A. Hoffmann, T. Kumpfel, H. Pellkofer, T. Derfuss, C. Ionescu, M. Starck, C. Hafner, R. Hohlfeld and E. Meinl (2008). "Interferon-beta increases BAFF levels in multiple sclerosis: implications for B cell autoimmunity." Brain **131**(Pt 6): 1455-1463.
- Krumbholz, M., I. Meinl, T. Kumpfel, R. Hohlfeld and E. Meinl (2008). "Natalizumab disproportionately increases circulating pre-B and B cells in multiple sclerosis." Neurology **71**(17): 1350-1354.
- Kuenz, B., A. Lutterotti, R. Ehling, C. Gneiss, M. Haemmerle, C. Rainer, F. Deisenhammer, M. Schocke, T. Berger and M. Reindl (2008). "Cerebrospinal fluid B cells correlate with early brain inflammation in multiple sclerosis." PLoS One **3**(7): e2559.
- Kuhlmann, T., S. Ludwin, A. Prat, J. Antel, W. Bruck and H. Lassmann (2017). "An updated histological classification system for multiple sclerosis lesions." Acta Neuropathol **133**(1): 13-24.
- Kutzelnigg, A., C. F. Lucchinetti, C. Stadelmann, W. Bruck, H. Rauschka, M. Bergmann, M. Schmidbauer, J. E. Parisi and H. Lassmann (2005). "Cortical demyelination and diffuse white matter injury in multiple sclerosis." Brain **128**(Pt 11): 2705-2712.
- Kuwabara, I. and F. T. Liu (1996). "Galectin-3 promotes adhesion of human neutrophils to laminin." J Immunol **156**(10): 3939-3944.
- Lagana, A., J. G. Goetz, P. Cheung, A. Raz, J. W. Dennis and I. R. Nabi (2006). "Galectin binding to Mgat5-modified N-glycans regulates fibronectin matrix remodeling in tumor cells." Mol Cell Biol **26**(8): 3181-3193.
- Lalancette-Hebert, M., V. Swarup, J. M. Beaulieu, I. Bohacek, E. Abdelhamid, Y. C. Weng, S. Sato and J. Kriz (2012). "Galectin-3 is required for resident microglia activation and proliferation in response to ischemic injury." J Neurosci **32**(30): 10383-10395.
- Langrish, C. L., Y. Chen, W. M. Blumenschein, J. Mattson, B. Basham, J. D. Sedgwick, T. McClanahan, R. A. Kastelein and D. J. Cua (2005). "IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation." J Exp Med **201**(2): 233-240.

- Lanzavecchia, A. (1985). "Antigen-specific interaction between T and B cells." Nature **314**(6011): 537-539.
- Larochelle, C., J. I. Alvarez and A. Prat (2011). "How do immune cells overcome the blood-brain barrier in multiple sclerosis?" FEBS Lett **585**(23): 3770-3780.
- LaRosa, D. F. and J. S. Orange (2008). "1. Lymphocytes." Journal of Allergy and Clinical Immunology **121**(2, Supplement 2): S364-S369.
- Lassmann, H., W. Bruck and C. F. Lucchinetti (2007). "The immunopathology of multiple sclerosis: an overview." Brain Pathol **17**(2): 210-218.
- LeBien, T. W. and T. F. Tedder (2008). "B lymphocytes: how they develop and function." Blood **112**(5): 1570-1580.
- Legroux, L. and N. Arbour (2015). "Multiple Sclerosis and T Lymphocytes: An Entangled Story." J Neuroimmune Pharmacol **10**(4): 528-546.
- Li, R., A. Rezk, L. M. Healy, G. Muirhead, A. Prat, J. L. Gommerman, A. Bar-Or and M. C. B. c. i. M. Team (2015). "Cytokine-Defined B Cell Responses as Therapeutic Targets in Multiple Sclerosis." Front Immunol **6**: 626.
- Li, R., A. Rezk, Y. Miyazaki, E. Hilgenberg, H. Touil, P. Shen, C. S. Moore, L. Michel, F. Althekair, S. Rajasekharan, J. L. Gommerman, A. Prat, S. Fillatreau and A. Bar-Or (2015). "Proinflammatory GM-CSF-producing B cells in multiple sclerosis and B cell depletion therapy." Sci Transl Med **7**(310): 310ra166.
- Liu, F. T., D. K. Hsu, R. I. Zuberi, I. Kuwabara, E. Y. Chi and W. R. Henderson, Jr. (1995). "Expression and function of galectin-3, a beta-galactoside-binding lectin, in human monocytes and macrophages." Am J Pathol **147**(4): 1016-1028.
- Liu, Z., C. M. Pelfrey, A. Cotleur, J. C. Lee and R. A. Rudick (2001). "Immunomodulatory effects of interferon beta-1a in multiple sclerosis." J Neuroimmunol **112**(1-2): 153-162.
- Longbrake, E. E. and A. H. Cross (2016). "Effect of Multiple Sclerosis Disease-Modifying Therapies on B Cells and Humoral Immunity." JAMA Neurol **73**(2): 219-225.
- Louveau, A., I. Smirnov, T. J. Keyes, J. D. Eccles, S. J. Rouhani, J. D. Peske, N. C. Derecki, D. Castle, J. W. Mandell, K. S. Lee, T. H. Harris and J. Kipnis (2015). "Structural and functional features of central nervous system lymphatic vessels." Nature **523**(7560): 337-341.
- Lovato, L., S. N. Willis, S. J. Rodig, T. Caron, S. E. Almendinger, O. W. Howell, R. Reynolds, K. C. O'Connor and D. A. Hafler (2011). "Related B cell clones populate the meninges and parenchyma of patients with multiple sclerosis." Brain **134**(Pt 2): 534-541.
- Lu, F. and B. Kalman (1999). "Autoreactive IgG to intracellular proteins in sera of MS patients." J Neuroimmunol **99**(1): 72-81.
- Lucchinetti, C., W. Bruck, J. Parisi, B. Scheithauer, M. Rodriguez and H. Lassmann (2000). "Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination." Ann Neurol **47**(6): 707-717.
- Lucchinetti, C. F., B. F. Popescu, R. F. Bunyan, N. M. Moll, S. F. Roemer, H. Lassmann, W. Bruck, J. E. Parisi, B. W. Scheithauer, C. Giannini, S. D. Weigand, J. Mandrekar and R. M. Ransohoff (2011). "Inflammatory cortical demyelination in early multiple sclerosis." N Engl J Med **365**(23): 2188-2197.

- Mackinnon, A. C., S. L. Farnworth, P. S. Hodgkinson, N. C. Henderson, K. M. Atkinson, H. Leffler, U. J. Nilsson, C. Haslett, S. J. Forbes and T. Sethi (2008). "Regulation of alternative macrophage activation by galectin-3." *J Immunol* **180**(4): 2650-2658.
- Magliozzi, R., O. Howell, A. Vora, B. Serafini, R. Nicholas, M. Puopolo, R. Reynolds and F. Aloisi (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.
- Magliozzi, R., O. W. Howell, C. Reeves, F. Roncaroli, R. Nicholas, B. Serafini, F. Aloisi and R. Reynolds (2010). "A Gradient of neuronal loss and meningeal inflammation in multiple sclerosis." *Ann Neurol* **68**(4): 477-493.
- Maloney, D. G., T. M. Liles, D. K. Czerwinski, C. Waldichuk, J. Rosenberg, A. Grillo-Lopez and R. Levy (1994). "Phase I clinical trial using escalating single-dose infusion of chimeric anti-CD20 monoclonal antibody (IDEC-C2B8) in patients with recurrent B-cell lymphoma." *Blood* **84**(8): 2457-2466.
- Mancuso, R., D. Franciotta, M. Rovaris, D. Caputo, A. Sala, A. Hernis, S. Agostini, M. Calvo and M. Clerici (2014). "Effects of natalizumab on oligoclonal bands in the cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients: a longitudinal study." *Mult Scler* **20**(14): 1900-1903.
- Matsumoto, M., A. Baba, T. Yokota, H. Nishikawa, Y. Ohkawa, H. Kayama, A. Kallies, S. L. Nutt, S. Sakaguchi, K. Takeda, T. Kurosaki and Y. Baba (2014). "Interleukin-10-producing plasmablasts exert regulatory function in autoimmune inflammation." *Immunity* **41**(6): 1040-1051.
- Mauri, C., D. Gray, N. Mushtaq and M. Londei (2003). "Prevention of arthritis by interleukin 10-producing B cells." *J Exp Med* **197**(4): 489-501.
- Mazurek, N., J. Conklin, J. C. Byrd, A. Raz and R. S. Bresalier (2000). "Phosphorylation of the beta-galactoside-binding protein galectin-3 modulates binding to its ligands." *J Biol Chem* **275**(46): 36311-36315.
- McHeyzer-Williams, M., S. Okitsu, N. Wang and L. McHeyzer-Williams (2011). "Molecular programming of B cell memory." *Nat Rev Immunol* **12**(1): 24-34.
- McQualter, J. L., R. Darwiche, C. Ewing, M. Onuki, T. W. Kay, J. A. Hamilton, H. H. Reid and C. C. Bernard (2001). "Granulocyte macrophage colony-stimulating factor: a new putative therapeutic target in multiple sclerosis." *J Exp Med* **194**(7): 873-882.
- Mehul, B. and R. C. Hughes (1997). "Plasma membrane targeting, vesicular budding and release of galectin 3 from the cytoplasm of mammalian cells during secretion." *J Cell Sci* **110** (Pt 10): 1169-1178.
- Mellergard, J., M. Edstrom, M. C. Jenmalm, C. Dahle, M. Vrethem and J. Ernerudh (2013). "Increased B cell and cytotoxic NK cell proportions and increased T cell responsiveness in blood of natalizumab-treated multiple sclerosis patients." *PLoS One* **8**(12): e81685.
- Menon, R. P. and R. C. Hughes (1999). "Determinants in the N-terminal domains of galectin-3 for secretion by a novel pathway circumventing the endoplasmic reticulum-Golgi complex." *Eur J Biochem* **264**(2): 569-576.
- Michel, L., C. Laroche and A. Prat (2015). "Update on treatments in multiple sclerosis." *Presse Med* **44**(4 Pt 2): e137-151.

- Michel, L., H. Touil, N. B. Pikor, J. L. Gommerman, A. Prat and A. Bar-Or (2015). "B Cells in the Multiple Sclerosis Central Nervous System: Trafficking and Contribution to CNS-Compartmentalized Inflammation." *Frontiers in Immunology* **6**(636).
- Miyazaki, Y., M. Niino, T. Fukazawa, E. Takahashi, T. Nonaka, I. Amino, J. Tashiro, N. Minami, N. Fujiki, S. Doi and S. Kikuchi (2014). "Suppressed pro-inflammatory properties of circulating B cells in patients with multiple sclerosis treated with fingolimod, based on altered proportions of B-cell subpopulations." *Clin Immunol* **151**(2): 127-135.
- Mizoguchi, A., E. Mizoguchi, H. Takedatsu, R. S. Blumberg and A. K. Bhan (2002). "Chronic intestinal inflammatory condition generates IL-10-producing regulatory B cell subset characterized by CD1d upregulation." *Immunity* **16**(2): 219-230.
- Molnarfi, N., U. Schulze-Topphoff, M. S. Weber, J. C. Patarroyo, T. Prod'homme, M. Varrin-Doyer, A. Shetty, C. Linington, A. J. Slavin, J. Hidalgo, D. E. Jenne, H. Wekerle, R. A. Sobel, C. C. Bernard, M. J. Shlomchik and S. S. Zamvil (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.
- Montalban, X., 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 and J. S. Wolinsky (2017). "Ocrelizumab versus Placebo in Primary Progressive Multiple Sclerosis." *N Engl J Med* **376**(3): 209-220.
- Mues, M., I. Bartholomäus, T. Thestrup, O. Griesbeck, H. Wekerle, N. Kawakami and G. Krishnamoorthy (2013). "Real-time in vivo analysis of T cell activation in the central nervous system using a genetically encoded calcium indicator." *Nat Med* **19**(6): 778-783.
- Nemazee, D. A. and K. Burki (1989). "Clonal deletion of B lymphocytes in a transgenic mouse bearing anti-MHC class I antibody genes." *Nature* **337**(6207): 562-566.
- Newlaczyl, A. U. and L.-G. Yu (2011). "Galectin-3 – A jack-of-all-trades in cancer." *Cancer Letters* **313**(2): 123-128.
- Niino, M., C. Bodner, M. L. Simard, S. Alatab, D. Gano, H. J. Kim, M. Trigueiro, D. Racicot, C. Guerette, J. P. Antel, A. Fournier, F. Grand'Maison and A. Bar-Or (2006). "Natalizumab effects on immune cell responses in multiple sclerosis." *Ann Neurol* **59**(5): 748-754.
- Nishihara, H., F. Shimizu, T. Kitagawa, N. Yamanaka, J. Akada, Y. Kuramitsu, Y. Sano, Y. Takeshita, T. Maeda, M. Abe, M. Koga, K. Nakamura and T. Kanda (2017). "Identification of galectin-3 as a possible antibody target for secondary progressive multiple sclerosis." *Mult Scler* **23**(3): 382-394.
- Noseworthy, J. H., C. Lucchinetti, M. Rodriguez and B. G. Weinshenker (2000). "Multiple sclerosis." *N Engl J Med* **343**(13): 938-952.
- Obermeier, B., L. Lovato, R. Mentele, W. Bruck, I. Forne, A. Imhof, F. Lottspeich, K. W. Turk, S. N. Willis, H. Wekerle, R. Hohlfeld, D. A. Hafler, K. C. O'Connor and K. Dornmair (2011). "Related B cell clones that populate the CSF and CNS of patients with multiple sclerosis produce CSF immunoglobulin." *J Neuroimmunol* **233**(1-2): 245-248.
- Obermeier, B., A. Verma and R. M. Ransohoff (2016). "The blood-brain barrier." *Handb Clin Neurol* **133**: 39-59.

- Ochieng, J., V. Furtak and P. Lukyanov (2002). "Extracellular functions of galectin-3." Glycoconj J **19**(7-9): 527-535.
- Olalekan, S. A., Y. Cao, K. M. Hamel and A. Finnegan (2015). "B cells expressing IFN-gamma suppress Treg-cell differentiation and promote autoimmune experimental arthritis." Eur J Immunol **45**(4): 988-998.
- Ollila, J. and M. Vihinen (2005). "B cells." The International Journal of Biochemistry & Cell Biology **37**(3): 518-523.
- Oracki, S. A., J. A. Walker, M. L. Hibbs, L. M. Corcoran and D. M. Tarlinton (2010). "Plasma cell development and survival." Immunol Rev **237**(1): 140-159.
- Orton, S. M., B. M. Herrera, I. M. Yee, W. Valdar, S. V. Ramagopalan, A. D. Sadovnick and G. C. Ebers (2006). "Sex ratio of multiple sclerosis in Canada: a longitudinal study." Lancet Neurol **5**(11): 932-936.
- Owens, G. P., J. L. Bennett, H. Lassmann, K. C. O'Connor, A. M. Ritchie, A. Shearer, C. Lam, X. Yu, M. Birlea, C. DuPree, R. A. Williamson, D. A. Hafler, M. P. Burgoon and D. Gilten (2009). "Antibodies produced by clonally expanded plasma cells in multiple sclerosis cerebrospinal fluid." Ann Neurol **65**(6): 639-649.
- Owens, G. P., A. M. Ritchie, M. P. Burgoon, R. A. Williamson, J. R. Corboy and D. H. Gilten (2003). "Single-cell repertoire analysis demonstrates that clonal expansion is a prominent feature of the B cell response in multiple sclerosis cerebrospinal fluid." J Immunol **171**(5): 2725-2733.
- Padden, M., S. Leech, B. Craig, J. Kirk, B. Brankin and S. McQuaid (2007). "Differences in expression of junctional adhesion molecule-A and beta-catenin in multiple sclerosis brain tissue: increasing evidence for the role of tight junction pathology." Acta Neuropathol **113**(2): 177-186.
- Pape, K. A., D. M. Catron, A. A. Itano and M. K. Jenkins (2007). "The humoral immune response is initiated in lymph nodes by B cells that acquire soluble antigen directly in the follicles." Immunity **26**(4): 491-502.
- Parekh, V. V., D. V. Prasad, P. P. Banerjee, B. N. Joshi, A. Kumar and G. C. Mishra (2003). "B cells activated by lipopolysaccharide, but not by anti-Ig and anti-CD40 antibody, induce anergy in CD8+ T cells: role of TGF-beta 1." J Immunol **170**(12): 5897-5911.
- Parker, D. C. (1993). "T cell-dependent B cell activation." Annu Rev Immunol **11**: 331-360.
- Parker Harp, C. R., A. S. Archambault, J. Sim, S. T. Ferris, R. J. Mikesell, P. A. Koni, M. Shimoda, C. Lington, J. H. Russell and G. F. Wu (2015). "B cell antigen presentation is sufficient to drive neuroinflammation in an animal model of multiple sclerosis." J Immunol **194**(11): 5077-5084.
- Pasquini, L. A., V. Millet, H. C. Hoyos, J. P. Giannoni, D. O. Croci, M. Marder, F. T. Liu, G. A. Rabinovich and J. M. Pasquini (2011). "Galectin-3 drives oligodendrocyte differentiation to control myelin integrity and function." Cell Death Differ **18**(11): 1746-1756.
- Perez-Andres, M., B. Paiva, W. G. Nieto, A. Caraux, A. Schmitz, J. Almeida, R. F. Vogt, Jr., G. E. Marti, A. C. Rawstron, M. C. Van Zelm, J. J. Van Dongen, H. E. Johnsen, B. Klein and A. Orfao (2010). "Human peripheral blood B-cell compartments: a crossroad in B-cell traffic." Cytometry B Clin Cytom **78 Suppl 1**: S47-60.

- Piccio, L., R. T. Naismith, K. Trinkaus, R. S. Klein, B. J. Parks, J. A. Lyons and A. H. Cross (2010). "Changes in B- and T-lymphocyte and chemokine levels with rituximab treatment in multiple sclerosis." *Arch Neurol* **67**(6): 707-714.
- Pikor, N. B., A. Prat, A. Bar-Or and J. L. Gommerman (2015). "Meningeal Tertiary Lymphoid Tissues and Multiple Sclerosis: A Gathering Place for Diverse Types of Immune Cells during CNS Autoimmunity." *Front Immunol* **6**: 657.
- Planas, R., I. Jelcic, S. Schippling, R. Martin and M. Sospedra (2012). "Natalizumab treatment perturbs memory- and marginal zone-like B-cell homing in secondary lymphoid organs in multiple sclerosis." *Eur J Immunol* **42**(3): 790-798.
- Plumb, J., S. McQuaid, M. Mirakhur and J. Kirk (2002). "Abnormal endothelial tight junctions in active lesions and normal-appearing white matter in multiple sclerosis." *Brain Pathol* **12**(2): 154-169.
- Polman, C. H., 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 and A. W. Sandrock (2006). "A randomized, placebo-controlled trial of natalizumab for relapsing multiple sclerosis." *N Engl J Med* **354**(9): 899-910.
- Polman, C. H., 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. Weinschenker and J. S. Wolinsky (2011). "Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria." *Ann Neurol* **69**(2): 292-302.
- Qi, H., J. G. Egen, A. Y. Huang and R. N. Germain (2006). "Extracellular activation of lymph node B cells by antigen-bearing dendritic cells." *Science* **312**(5780): 1672-1676.
- Rabinovich, G. A., L. G. Baum, N. Tinari, R. Paganelli, C. Natoli, F. T. Liu and S. Iacobelli (2002). "Galectins and their ligands: amplifiers, silencers or tuners of the inflammatory response?" *Trends Immunol* **23**(6): 313-320.
- Radic, M. Z., J. Erikson, S. Litwin and M. Weigert (1993). "B lymphocytes may escape tolerance by revising their antigen receptors." *J Exp Med* **177**(4): 1165-1173.
- Ramagopalan, S. V. and G. C. Ebers (2009). "Multiple sclerosis: major histocompatibility complexity and antigen presentation." *Genome Med* **1**(11): 105.
- Ramgolam, V. S., Y. Sha, K. L. Marcus, N. Choudhary, L. Troiani, M. Chopra and S. Markovic-Plese (2011). "B cells as a therapeutic target for IFN-beta in relapsing-remitting multiple sclerosis." *J Immunol* **186**(7): 4518-4526.
- Rao, S. P., Z. Wang, R. I. Zuberi, L. Sikora, N. S. Bahaie, B. L. Zuraw, F. T. Liu and P. Sriramarao (2007). "Galectin-3 functions as an adhesion molecule to support eosinophil rolling and adhesion under conditions of flow." *J Immunol* **179**(11): 7800-7807.
- Rasouli, J., B. Ciric, J. Imitola, P. Gonnella, D. Hwang, K. Mahajan, E. R. Mari, F. Safavi, T. P. Leist, G. X. Zhang and A. Rostami (2015). "Expression of GM-CSF in T Cells Is Increased in Multiple Sclerosis and Suppressed by IFN-beta Therapy." *J Immunol* **194**(11): 5085-5093.
- Reboldi, A., C. Coisne, D. Baumjohann, F. Benvenuto, D. Bottinelli, S. Lira, A. Uccelli, A. Lanzavecchia, B. Engelhardt and F. Sallusto (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.
- Reff, M. E., K. Carner, K. S. Chambers, P. C. Chinn, J. E. Leonard, R. Raab, R. A. Newman, N. Hanna and D. R. Anderson (1994). "Depletion of B cells in vivo by a chimeric mouse human monoclonal antibody to CD20." *Blood* **83**(2): 435-445.
- Reichert, F. and S. Rotshenker (1999). "Galectin-3/MAC-2 in experimental allergic encephalomyelitis." *Exp Neurol* **160**(2): 508-514.
- Reth, M., E. Petrac, P. Wiese, L. Lobel and F. W. Alt (1987). "Activation of V kappa gene rearrangement in pre-B cells follows the expression of membrane-bound immunoglobulin heavy chains." *Embo j* **6**(11): 3299-3305.
- Rosser, E. C. and C. Mauri (2015). "Regulatory B cells: origin, phenotype, and function." *Immunity* **42**(4): 607-612.
- Rosser, E. C., K. Oleinika, S. Tonon, R. Doyle, A. Bosma, N. A. Carter, K. A. Harris, S. A. Jones, N. Klein and C. Mauri (2014). "Regulatory B cells are induced by gut microbiota-driven interleukin-1beta and interleukin-6 production." *Nat Med* **20**(11): 1334-1339.
- Rudick, R. A., S. V. Medendorp, M. Namey, S. Boyle and J. Fischer (1995). "Multiple sclerosis progression in a natural history study: predictive value of cerebrospinal fluid free kappa light chains." *Mult Scler* **1**(3): 150-155.
- Saada, A., F. Reichert and S. Rotshenker (1996). "Granulocyte macrophage colony stimulating factor produced in lesioned peripheral nerves induces the up-regulation of cell surface expression of MAC-2 by macrophages and Schwann cells." *J Cell Biol* **133**(1): 159-167.
- Sadovnick, A. D., D. A. Dyment, G. C. Ebers, N. J. Risch and G. the Canadian Collaborative Study (1996). "Evidence for genetic basis of multiple sclerosis." *The Lancet* **347**(9017): 1728-1730.
- Sakaki, M., N. Oka, R. Nakanishi, K. Yamaguchi, T. Fukumori and H. O. Kanayama (2008). "Serum level of galectin-3 in human bladder cancer." *J Med Invest* **55**(1-2): 127-132.
- Sano, H., D. K. Hsu, L. Yu, J. R. Apgar, I. Kuwabara, T. Yamanaka, M. Hirashima and F. T. Liu (2000). "Human galectin-3 is a novel chemoattractant for monocytes and macrophages." *J Immunol* **165**(4): 2156-2164.
- Sato, S., N. Ouellet, I. Pelletier, M. Simard, A. Rancourt and M. G. Bergeron (2002). "Role of galectin-3 as an adhesion molecule for neutrophil extravasation during streptococcal pneumonia." *J Immunol* **168**(4): 1813-1822.
- Schatz, D. G., M. A. Oettinger and M. S. Schlissel (1992). "V(D)J recombination: molecular biology and regulation." *Annu Rev Immunol* **10**: 359-383.
- Schneider, A., S. A. Long, K. Cerosaletti, C. T. Ni, P. Samuels, M. Kita and J. H. Buckner (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.
- Schroeder, H. W. and L. Cavacini (2010). "Structure and function of immunoglobulins." *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **125**(2, Supplement 2): S41-S52.
- Schubert, R. D., Y. Hu, G. Kumar, S. Szeto, P. Abraham, J. Winderl, J. M. Guthridge, G. Pardo, J. Dunn, L. Steinman and R. C. Axtell (2015). "IFN-beta treatment requires B cells for efficacy in neuroautoimmunity." *J Immunol* **194**(5): 2110-2116.

- Segal, B. M., C. S. Constantinescu, A. Raychaudhuri, L. Kim, R. Fidelus-Gort, L. H. Kasper and M. S. I. Ustekinumab (2008). "Repeated subcutaneous injections of IL12/23 p40 neutralising antibody, ustekinumab, in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis: a phase II, double-blind, placebo-controlled, randomised, dose-ranging study." Lancet Neurol **7**(9): 796-804.
- Sellebjerg, F., L. Bornsen, M. Khademi, M. Krakauer, T. Olsson, J. L. Frederiksen and P. S. Sorensen (2009). "Increased cerebrospinal fluid concentrations of the chemokine CXCL13 in active MS." Neurology **73**(23): 2003-2010.
- Selter, R. C., V. Biberacher, V. Grummel, D. Buck, C. Eienbroker, W. H. Oertel, A. Berthele, B. Tackenberg and B. Hemmer (2013). "Natalizumab treatment decreases serum IgM and IgG levels in multiple sclerosis patients." Mult Scler **19**(11): 1454-1461.
- Serafini, B., B. Rosicarelli, R. Magliozzi, E. Stigliano and F. Aloisi (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.
- Seyerl, M., S. Kirchberger, O. Majdic, J. Seipelt, C. Jindra, C. Schrauf and J. Stockl (2010). "Human rhinoviruses induce IL-35-producing Treg via induction of B7-H1 (CD274) and sialoadhesin (CD169) on DC." Eur J Immunol **40**(2): 321-329.
- Shen, P., 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. Grutzkau, J. R. Grun, K. Horn, A. A. Kuhl, T. Dorner, A. Bar-Or, S. H. E. Kaufmann, S. M. Anderton and S. Fillatreau (2014). "IL-35-producing B cells are critical regulators of immunity during autoimmune and infectious diseases." Nature **507**(7492): 366-370.
- Shin, T. (2013). "The pleiotropic effects of galectin-3 in neuroinflammation: a review." Acta Histochem **115**(5): 407-411.
- Siffrin, V., H. Radbruch, R. Glumm, R. Niesner, M. Paterka, J. Herz, T. Leuenberger, S. M. Lehmann, S. Luenstedt, J. L. Rinnenthal, G. Laube, H. Luche, S. Lehnardt, H. J. Fehling, O. Griesbeck and F. Zipp (2010). "In vivo imaging of partially reversible th17 cell-induced neuronal dysfunction in the course of encephalomyelitis." Immunity **33**(3): 424-436.
- Sindic, C. J., P. Monteyne and E. C. Laterre (1994). "The intrathecal synthesis of virus-specific oligoclonal IgG in multiple sclerosis." J Neuroimmunol **54**(1-2): 75-80.
- Sorensen, P. S., S. Lisby, R. Grove, F. Derosier, S. Shackelford, E. Havrdova, J. Drulovic and M. Filippi (2014). "Safety and efficacy of ofatumumab in relapsing-remitting multiple sclerosis: a phase 2 study." Neurology **82**(7): 573-581.
- Stamatovic, S. M., R. F. Keep and A. V. Andjelkovic (2008). "Brain endothelial cell-cell junctions: how to "open" the blood brain barrier." Curr Neuropharmacol **6**(3): 179-192.
- Stancic, M., J. van Horssen, V. L. Thijssen, H. J. Gabius, P. van der Valk, D. Hoekstra and W. Baron (2011). "Increased expression of distinct galectins in multiple sclerosis lesions." Neuropathol Appl Neurobiol **37**(6): 654-671.
- Stashenko, P., L. M. Nadler, R. Hardy and S. F. Schlossman (1980). "Characterization of a human B lymphocyte-specific antigen." J Immunol **125**(4): 1678-1685.
- Stromnes, I. M. and J. M. Goverman (2006). "Active induction of experimental allergic encephalomyelitis." Nat Protoc **1**(4): 1810-1819.

- Sun, C. M., E. Deriaud, C. Leclerc and R. Lo-Man (2005). "Upon TLR9 signaling, CD5+ B cells control the IL-12-dependent Th1-priming capacity of neonatal DCs." Immunity **22**(4): 467-477.
- Swarte, V. V., R. E. Mebius, D. H. Joziase, D. H. Van den Eijnden and G. Kraal (1998). "Lymphocyte triggering via L-selectin leads to enhanced galectin-3-mediated binding to dendritic cells." Eur J Immunol **28**(9): 2864-2871.
- They, C., M. Boussac, P. Veron, P. Ricciardi-Castagnoli, G. Raposo, J. Garin and S. Amigorena (2001). "Proteomic analysis of dendritic cell-derived exosomes: a secreted subcellular compartment distinct from apoptotic vesicles." J Immunol **166**(12): 7309-7318.
- Thiemann, S. and L. G. Baum (2011). "The road less traveled: regulation of leukocyte migration across vascular and lymphatic endothelium by galectins." J Clin Immunol **31**(1): 2-9.
- Thiemann, S. and L. G. Baum (2016). "Galectins and Immune Responses-Just How Do They Do Those Things They Do?" Annu Rev Immunol **34**: 243-264.
- Thompson, S. A., J. L. Jones, A. L. Cox, D. A. Compston and A. J. Coles (2010). "B-cell reconstitution and BAFF after alemtuzumab (Campath-1H) treatment of multiple sclerosis." J Clin Immunol **30**(1): 99-105.
- Tian, J., D. Zekzer, L. Hanssen, Y. Lu, A. Olcott and D. L. Kaufman (2001). "Lipopolysaccharide-activated B cells down-regulate Th1 immunity and prevent autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice." J Immunol **167**(2): 1081-1089.
- Tiegs, S. L., D. M. Russell and D. Nemazee (2011). "Receptor editing in self-reactive bone marrow B cells. The Journal of Experimental Medicine. 1993. 177: 1009-1020." J Immunol **186**(3): 1313-1324.
- Traugott, U. and P. Lebon (1988). "Multiple sclerosis: involvement of interferons in lesion pathogenesis." Ann Neurol **24**(2): 243-251.
- Umamoto, K., H. Leffler, A. Venot, H. Valafar and J. H. Prestegard (2003). "Conformational differences in liganded and unliganded states of Galectin-3." Biochemistry **42**(13): 3688-3695.
- van de Veen, W., B. Stanic, G. Yaman, M. Wawrzyniak, S. Sollner, D. G. Akdis, B. Ruckert, C. A. Akdis and M. Akdis (2013). "IgG4 production is confined to human IL-10-producing regulatory B cells that suppress antigen-specific immune responses." J Allergy Clin Immunol **131**(4): 1204-1212.
- Van den Brule, F. A., P. L. Fernandez, C. Buicu, F. T. Liu, P. Jackers, R. Lambotte and V. Castronovo (1997). "Differential expression of galectin-1 and galectin-3 during first trimester human embryogenesis." Dev Dyn **209**(4): 399-405.
- van Oosten, B. W., M. Lai, S. Hodgkinson, F. Barkhof, D. H. Miller, I. F. Moseley, A. J. Thompson, P. Rudge, A. McDougall, J. G. McLeod, H. J. Ader and C. H. Polman (1997). "Treatment of multiple sclerosis with the monoclonal anti-CD4 antibody cM-T412: results of a randomized, double-blind, placebo-controlled, MR-monitored phase II trial." Neurology **49**(2): 351-357.
- van Stijn, C. M., M. van den Broek, R. van de Weerd, M. Visser, I. Tasdelen, B. Tefsen and I. van Die (2009). "Regulation of expression and secretion of galectin-3 in human monocyte-derived dendritic cells." Mol Immunol **46**(16): 3292-3299.

- Venkatesan, C., M. Chrzaszcz, N. Choi and M. S. Wainwright (2010). "Chronic upregulation of activated microglia immunoreactive for galectin-3/Mac-2 and nerve growth factor following diffuse axonal injury." J Neuroinflammation **7**: 32.
- Villar, L. M., J. Masjuan, P. Gonzalez-Porque, J. Plaza, M. C. Sadaba, E. Roldan, A. Bootello and J. C. Alvarez-Cermeno (2003). "Intrathecal IgM synthesis is a prognostic factor in multiple sclerosis." Ann Neurol **53**(2): 222-226.
- Vray, B., I. Camby, V. Vercruyse, T. Mijatovic, N. V. Bovin, P. Ricciardi-Castagnoli, H. Kaltner, I. Salmon, H. J. Gabius and R. Kiss (2004). "Up-regulation of galectin-3 and its ligands by *Trypanosoma cruzi* infection with modulation of adhesion and migration of murine dendritic cells." Glycobiology **14**(7): 647-657.
- Wang, R. X., C. R. Yu, I. M. Dambuza, R. M. Mahdi, M. B. Dolinska, Y. V. Sergeev, P. T. Wingfield, S. H. Kim and C. E. Egwuagu (2014). "Interleukin-35 induces regulatory B cells that suppress autoimmune disease." Nat Med **20**(6): 633-641.
- Wardemann, H., J. Hammersen and M. C. Nussenzweig (2004). "Human autoantibody silencing by immunoglobulin light chains." J Exp Med **200**(2): 191-199.
- Wardemann, H. and M. C. Nussenzweig (2007). "B-cell self-tolerance in humans." Adv Immunol **95**: 83-110.
- Warnke, C., M. Stettner, V. Lehmsiek, T. Dehmel, A. K. Mausberg, G. von Geldern, R. Gold, T. Kumpfel, R. Hohlfeld, M. Maurer, M. Stangel, V. Straeten, V. Limmroth, T. Weber, C. Kleinschnitz, M. P. Wattjes, A. Svenningsson, T. Olsson, H. P. Hartung, D. Hermsen, H. Tumani, O. Adams and B. C. Kieseier (2015). "Natalizumab exerts a suppressive effect on surrogates of B cell function in blood and CSF." Mult Scler **21**(8): 1036-1044.
- Willenborg, D. O. and S. J. Prowse (1983). "Immunoglobulin-deficient rats fail to develop experimental allergic encephalomyelitis." J Neuroimmunol **5**(2): 99-109.
- Yamaoka, A., I. Kuwabara, L. G. Frigeri and F. T. Liu (1995). "A human lectin, galectin-3 (epsilon bp/Mac-2), stimulates superoxide production by neutrophils." J Immunol **154**(7): 3479-3487.
- Yang, R. Y., P. N. Hill, D. K. Hsu and F. T. Liu (1998). "Role of the carboxyl-terminal lectin domain in self-association of galectin-3." Biochemistry **37**(12): 4086-4092.
- Yip, P. K., A. Carrillo-Jimenez, P. King, A. Vilalta, K. Nomura, C. C. Chau, A. M. Egerton, Z. H. Liu, A. J. Shetty, J. L. Tremoleda, M. Davies, T. Deierborg, J. V. Priestley, G. C. Brown, A. T. Michael-Titus, J. L. Venero and M. A. Burguillos (2017). "Galectin-3 released in response to traumatic brain injury acts as an alarmin orchestrating brain immune response and promoting neurodegeneration." Sci Rep **7**: 41689.
- Zeman, A. Z., D. Kidd, B. N. McLean, M. A. Kelly, D. A. Francis, D. H. Miller, B. E. Kendall, P. Rudge, E. J. Thompson and W. I. McDonald (1996). "A study of oligoclonal band negative multiple sclerosis." J Neurol Neurosurg Psychiatry **60**(1): 27-30.