La sclérose en plaques, perspectives thérapeutiques : étude des signaux calciques intracellulaires de la lignée oligodendrogliale au cours de la remyélinisation chez la souris

Mathilde Richard

▶ **To cite this version:**

Mathilde Richard. La sclérose en plaques, perspectives thérapeutiques : étude des signaux calciques intracellulaires de la lignée oligodendrogliale au cours de la remyélinisation chez la souris. Sciences pharmaceutiques. 2017. dumas-01601362

HAL Id: dumas-01601362
https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01601362

Submitted on 4 Oct 2017

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UFR de Pharmacie
UNIVERSITÉ Grenoble Alpes
BIBLIOTHÈQUES UNIVERSITAIRES Grenoble Alpes
UNIVERSITÉ Grenoble Alpes
Grenoble INP

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il n'a pas été réévalué depuis la date de soutenance.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact au SID de Grenoble :
bump-theses@univ-grenoble-alpes.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/juridique/droit-auteur
http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm

UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES

UFR DE PHARMACIE DE GRENOBLE

Année : 2017

LA SCLEROSE EN PLAQUES, PERSPECTIVES THERAPEUTIQUES : ETUDE DES SIGNAUX CALCIQUES INTRACELLULAIRES DE LA LIGNÉE OLIGODENDROGLIALE AU COURS DE LA REMYELINISATION CHEZ LA SOURIS

THÈSE

PRÉSENTÉE POUR L'OBTENTION DU TITRE DE DOCTEUR EN PHARMACIE

DIPLÔME D'ÉTAT

Mathilde RICHARD [Données à caractère personnel]

THÈSE SOUTENUE PUBLIQUEMENT À LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE GRENOBLE

Le 21/09/2017

DEVANT LE JURY COMPOSÉ DE

Président du jury :

M. **RIBUOT Christophe**, Pharmacien, Professeur et Chercheur en pharmacologie cardiovasculaire

Membres :

Mme. **BRIANÇON-MARJOLLET Anne**, Maitre de Conférences Universitaire à la faculté de Pharmacie de Grenoble, Directrice de thèse

M. **CASEZ Olivier**, Médecin Neurologue, Praticien Hospitalier au CHU de Grenoble

M. **KOTZKI Sylvain**, Pharmacien Attaché au CHU Grenoble

L'UFR de Pharmacie de Grenoble n'entend donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans les thèses ; ces opinions sont considérées comme propres à leurs auteurs.

UFR de Pharmacie

UNIVERSITÉ Grenoble Alpes

Doyen de la Faculté : **M. le Pr. Michel SEVE**

Vice-doyen et Directrice des Etudes : **Mme Christine DEMEILLIERS**

Année 2016-2017

ENSEIGNANTS A L'UFR DE PHARMACIE

STATUT	NOM	PRENOM	LABORATOIRE
MCU	ALDEBERT	Delphine	LAPM - UMR CNRS 5163
PU-PH	ALLENET	Benoit	THEMAS TIMC-IMAG UMR CNRS 5525
PU	BAKRI	Aziz	TIMC-IMAG CNRS UMR 5525
ATER	BARDET	Jean-Didier	
MCU	BATANDIER	Cécile	LBFA - INSERM U1055
MCU-PH	BEDOUCH	Pierrick	THEMAS TIMC-IMAG UMR CNRS 5525
MCU	BELAIDI-CORSAT	Elise	HP2 - INSERM U1042
MAST	BELLET	Béatrice	-
ATER	BOUCHERLE	Benjamin	DPM
DCE	BOULADE	Marine	SyMMES
PU	BOUMENDJEL	Ahcène	DPM –UMR 5063 UJF CNRS
DCE	BOURDIER	Guillaume	HP2
MCU	BOURGOIN	Sandrine	IAB - CRI INSERM UJF U823
DCE	BOUVET	Raphaël	HP2
MCU	BRETON	Jean	L.C.I.B. - UMR E3 CEA UJF
MCU	BRIANCON-MARJOLLET	Anne	HP2 - INSERM U1042
DCE	BROCCO	Benjamin	ILL
MCU	BUDAYOVA SPANO	Monika	IBS - UMR 5075 CEA CNRS UJF
PU	BURMEISTER	Wim	UVHCI - UMI 3265 UJF EMBL CNRS
MCU-PH	BUSSER	Benoit	IAB - CRI INSERM UJF U823
Professeur émérite	CALOP	Jean	-
MCU	CAVAILLES	Pierre	LAPM – UMR 5163 CNRS UJF
AHU	CHANOINE	Sébastien	THEMAS TIMC-IMAG UMR CNRS 5525
MCU	CHOISNARD	Luc	DPM –UMR 5063 UJF CNRS
AHU	CHOVELON	Benoit	DPM –UMR 5063 UJF CNRS
PU-PH	CORNET	Murielle	THEREX – TIMC IMAG UMR 5525 CNRS UJF
DCE	COUCHET	Morgane	LBFA
PU-PH	DANEL	Vincent	SMUR SAMU
PU	DECOUT	Jean-Luc	DPM –UMR 5063 UJF CNRS
MCU	DELETRAZ- DELPORTE	Martine	Equipe SIS -EAM 4128 UCB
MCU	DEMEILLIERS	Christine	LBFA - INSERM U1055
PU	DROUET	Christian	AGIM - CNRS 3405

Mise à jour le 03 nov.2016

STATUT	NOM	PRENOM	LABORATOIRE
PU	DROUET	Emmanuel	UVHCI - UMI 3265 UJF-EMBL- CNRS
MCU	DURMORT - MEUNIER	Claire	I.B.S – UMR 5075 CEA UJF CNRS
PU-PH	FAURE	Patrice	HP2- INSERM U1042
PRCE	FITE	Andrée	-
AHU	GARNAUD	Cécile	THEREX – TIMC IMAG UMR 5525 NCRS UJF
PRAG	GAUCHARD	Pierre-Alexis	-
MCU-PH	GERMI	Raphaëlle	UVHCI, UMI 3265 UJF-EMBL- CNRS
MCU	GEZE	Annabelle	DPM –UMR 5063 UJF CNRS
MCU	GILLY	Catherine	DPM –UMR 5063 UJF CNRS
PU	GODIN-RIBUOT	Diane	HP2- INSERM U1042
PRCE	GOUBIER MATHYS	Laurence	-
Professeure émérite	GRILLOT	Renée	-
MCU	GROSSET	Catherine	DPM –UMR 5063 UJF CNRS
MCU	GUIEU	Valérie	DPM –UMR 5063 UJF CNRS
AHU	HENNEBIQUE	Aurélie	sous réserve de création de poste
MCU	HININGER-FAVIER	Isabelle	LBFA - Inserm U1055
MCU	JOYEUX-FAURE	Marie	HP2- INSERM U1042
MCU	KHALEF	Nawel	TIMC-IMAG CNRS UMR 5525
MCU	KRIVOBOK	Serge	LCBM, IRTSV CEA
DCE	LE	Cong Anh Khanh	CERMAV
PU	LENORMAND	Jean Luc	THEREX, TIMC-IMAG
DCE	MARILLIER	Mathieu	HP2
PU	MARTIN	Donald	TIMC-IMAG, UMR 5525 UJF CNRS
AHU	MAZET	Roseline	DPM –UMR 5063 UJF CNRS
MCU	MELO DE LIMA	Christelle	L.E.C.A – UMR CNRS 5553
PU	MOINARD	Christophe	LBFA - Inserm U1055
DCE	MONTEMAGNO	Christopher	LRB
ATER	MORAND	Jessica	HP2
PU-PH	MOSSUZ	Pascal	THEREX - TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS
MCU	MOUHAMADOU	Bello	L.E.C.A – UMR CNRS 5553
DCE	MOULIN	Sophie	HP2
DCE	NADER	Serge	LCBM
DCE	NGUYEN	Kim-Anh	DPM
MCU	NICOLLE	Edwige	DPM –UMR 5063 UJF CNRS
MCU	OUKACINE	Farid	DPM –UMR 5063 UJF CNRS
MCU	PERES	Basile	DPM- UJF/CNRS UMR 5063
DCE	PERONNE	Lauralie	IAB
MCU	PEUCHMAUR	Marine	DPM –UMR 5063 UJF CNRS
PU	PEYRIN	Éric	DPM –UMR 5063 UJF CNRS
MCU	RACHIDI	Walid	L.C.I.B - UMR E3 CEA/UJF
MCU	RAVELET	Corinne	DPM –UMR 5063 UJF CNRS
PU	RIBUOT	Christophe	HP2- INSERM U1042

Mise à jour le 03 nov.2016

STATUT	NOM	PRENOM	LABORATOIRE
PAST	RIEU	Isabelle	-
Professeure émérite	ROUSSEL	Anne -Marie	-
PU-PH	SEVE	Michel	CR INSERM / UJF U823 Institut Albert Bonniot
MCU	SOUARD	Florence	DPM –UMR 5063 UJF CNRS
DCE	TAHER	Raleb	IBS
ATER	TAHMASEBI	Faezeh	TIMC-IM2AG
MCU	TARBOURIECH	Nicolas	UVHCI, UMR 3265 UJF-EMBL- CNRS
DCE	TODOROV	Zlatomir	BCI
PAST	TROUILLER	Patrice	-
DCE	VACHEZ	Yvan	CRI-GIN
MCU	VANHAVERBEKE	Cécile	DPM –UMR 5063 UJF CNRS
DCE	VERNET	Céline	CRI-IAB
DCE	VRAGNIAU	Charles	UVHCI
PU	WOUESSIDJEWE	Denis	DPM –UMR 5063 UJF CNRS

ATER : Attachés Temporaires d'Enseignement et de Recherches
BCI : Biologie du Cancer et de l'Infection
CHU : Centre Hospitalier Universitaire
CIB : Centre d'Innovation en Biologie
CRI : Centre de Recherche INSERM
CNRS : Centre National de Recherche Scientifique
DCE : Doctorants Contractuels Enseignement
DPM : Département de Pharmacochimie Moléculaire et de Cognition et Ontogenèse »
HP2 : Hypoxie Physiopathologie Respiratoire et Cardiovasculaire
IAB : Institut Albert Bonniot,
IBS : Institut de Biologie Structurale
JR : Jean Roget
LAPM : Laboratoire Adaptation et Pathogenèse des Microorganismes
LBFA : Laboratoire Bioénergétique Fondamentale et Appliquée
LCBM : Laboratoire Chimie et Biologie des Métaux
LCIB : Laboratoire de Chimie Inorganique et Biologie
LECA : Laboratoire d'Ecologie Alpine
LR : Laboratoire des Radio pharmaceutiques

MCU : Maitre de Conférences des Universités
MCU-PH : Maître de Conférences des Universités et Praticiens Hospitaliers
PAST : Professeur Associé à Temps Partiel
PRAG : Professeur Agrégé
PRCE : Professeur certifié affecté dans l'enseignement
PU : Professeur des Universités
PU-PH : Professeur des Universités et Praticiens Hospitaliers
TIMC-IMAG : Laboratoire Technique de l'Imagerie, de la Modélisation
UMR: Unité Mixte de Recherche
UVHCI: Unit of Virus Host Cell Interactions

Mise à jour le 03 nov.2016

REMERCIEMENTS

Mes sincères remerciements s'adressent :

A mon Président de jury,

Monsieur RIBUOT Christophe, ex Doyen de la Faculté de Pharmacie de Grenoble, Professeur et Chercheur en pharmacologie cardiovasculaire expérimentale rattaché au laboratoire HP2 (Hypoxie et Physiopathologie)

Je tiens à vous exprimer mes sincères remerciements et mon profond respect pour m'avoir fait l'immense honneur d'accepter de présider le jury de cette thèse.

A ma Directrice de Thèse,

Madame BRIANCON MARJOLLET Anne, Maître de Conférences Universitaire à la Faculté de Pharmacie de Grenoble et Chercheur au Laboratoire HP2

Soyez assurée de ma profonde reconnaissance et de toute ma gratitude pour m'avoir accompagnée tout au long de la thèse. Vos conseils avisés, vos critiques constructives ont été pour moi d'un précieux soutien. Je vous adresse mes plus sincères remerciements pour le temps que vous m'avez consacré, le partage de vos connaissances, pour l'aide académique apportée tant au niveau des articles scientifiques que des choix méthodologiques.

Aux membres du jury,

Monsieur CASEZ Olivier, Neurologue, Médecin Praticien Hospitalier au CHU Grenoble Alpes, Membre du Comité Médical CIRMA de la Fondation ARSEP (Agence pour la Recherche sur la Sclérose en Plaques)

Merci pour votre participation au jury de cette thèse et pour l'intérêt porté à ce travail de recherche sur la sclérose en plaques.

Monsieur KOTZKI Sylvain, Docteur en Pharmacie, Pharmacien Attaché au CHU Grenoble Alpes

Merci pour votre regard avisé sur les traitements médicamenteux liés à la SEP, et pour le temps consacré à la lecture de ce travail.

A l'équipe de Recherche du Laboratoire de Neurophysiologie et Nouvelles Microscopies de l'Université Paris Descartes (INSERM UMR_S1128) dirigée par Serge CHARPAK, en particulier à Maria Cecilia Angulo, Responsable de l'Unité de Recherche Physiologie des Cellules NG2

Les 6 mois de stage effectués dans le cadre de la préparation de mon Master 2 (Biologie et Santé, « Signalisation cellulaire, Neurosciences ») au sein de ce laboratoire ont été une expérience unique et très enrichissante. Le contenu de la thèse est le fruit des nombreux travaux échanges avec l'équipe de l'Unité mixte de recherche. Je suis particulièrement reconnaissante à Maria Cécilia ANGULO et Chloé HABERMACHER (post-doctorante) qui ont accepté de me former aux différents protocoles expérimentaux, de partager leur expérience et expertise en recherche fondamentale sur les cellules NG2. C'est un grand privilège que d'avoir pu partager ce travail avec vous et d'avoir appris avec et grâce à vous. Mes profonds remerciements.

Mes remerciements vont aussi à :

Mes parents,

Merci pour votre soutien, votre présence, et votre encouragement tout au long de ces années d'études et dans la réalisation de mes projets autant sportifs qu'académiques.
Pour avoir toujours cru en nous 3.

A mes deux frères Romain Pharmacien, Vincent et Claire,

Merci pour votre bienveillance, votre aide et votre amour infaillible en toutes circonstances ! Notre solidarité est une force.

A Christian,

Sans qui je n'aurai pas apprécié autant Paris. Un grand merci pour ton soutien sans faille, la patience dont tu as fait preuve vis-à-vis des longues heures de manipulations.
D'autres challenges nous attendent !

A mes cousins(es) et plus particulièrement à **Armand, Gleicy, Serge et Jean-Yves** *pour m'avoir encouragée, conseillée et aidée dans mes choix en Pharmacie, et pour votre pédagogie.*

A mon parrain **Benoit** et ma tante **Martine**, *pour votre gentillesse et pour tous les échanges scientifiques qui m'ont aidé à la réflexion de ce travail.*

A mes **grands-parents, et à Denise** *pour votre présence, et pour tous les bons moments passés à Mens.*

A tous les autres membres de la famille dont l'écriture des prénoms aurait fait autant de pages que la partie I de cette thèse ☺ .

A tous les amis du lycée Hélène, Nicolas, Alexandre, Marie, ceux de la faculté de pharmacie Laura, Estelle, et ceux du club de Meylan escrime *pour tous les moments de bonheur partagés ensemble et tous ceux à venir.*

Mes plus profonds remerciements à vous tous pour m'avoir accompagné tout au long de mon cursus et avoir répondu présent aujourd'hui pour clôturer ce chapitre.

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS 4

TABLE DES MATIERES 7

LISTE DES TABLEAUX 9

LISTE DES FIGURES 9

LISTE DES ANNEXES 10

ABREVIATIONS 11

PARTIE 1 - LA SCLEROSE EN PLAQUES, UNE MALADIE DEMYELINISANTE 14

1. HISTORIQUE DE LA MALADIE 14

2. QU'EST-CE QUE LA SCLEROSE EN PLAQUES ? 18

2.1 Généralités sur le SNC et la gaine de myéline 18
2.2 Définition et épidémiologie de la maladie 19
2.3 Physiopathologie 22
2.4 Symptômes 25
2.5 Les formes évolutives de la SEP 27

3. LES CAUSES DE LA SCLEROSE EN PLAQUES 29

3.1 Facteurs génétiques 29
3.2 Facteurs environnementaux 31
3.3 Causes controversées 35

4. DIAGNOSTIC CLINIQUE ET PARACLINIQUE DE LA SEP 36

5. PRISE EN CHARGE THERAPEUTIQUE 38

5.1 Traitements de la poussée 38
5.2 Traitements de fond 39
5.3 Traitements symptomatiques 47

PARTIE 2 – PERSPECTIVES THERAPEUTIQUES 50

1. STRATEGIE IMMUNOMODULATRICE OU IMMUNOSUPPRESSIVE 51

1.1 Anticorps anti-CD20 51
1.2 Les agonistes des récepteurs de la sphingosine phosphate (SP) 53
1.3 Autre immunomodulateur 54

2. STRATEGIE REMYELINISANTE 55

2.1 La biotine 55
2.2 Opicinumab 57
2.3 Clémastine 57
2.4 GSK 239512 58
2.5 rHIgM22 58
2.6 Anticorps anti-Sémaphorine 4D 59
2.7 GNbAC1 60
2.8 Thérapies par cellules souches 60

PARTIE 3 - ETUDE D'UNE CIBLE POTENTIELLE POUR AMELIORER LA REMYELINISATION : LA SIGNALISATION CALCIQUE DES CELLULES OLIGODENDROGLIALES 63

INTRODUCTION 63
1. La myélinisation 63
2. La remyélinisation 70

OBJECTIFS ET HYPOTHESES 72

MATERIELS ET METHODES 73
1. Animaux 73
2. Modèle de remyélinisation spontanée 74
3. Préparation des tranches aiguës du corps calleux 76
4. Imagerie calcique 76
5. Immunomarquage 80
6. Chronologie du protocole 81

RESULTATS 82
1. Caractérisation de la lésion démyélinisante induite par le LPC sur tranches aigües de cerveau au niveau du corps calleux 82
2. Procédure d'acquisition des données obtenues après imagerie calcique 85
3. Comparaison de l'activité calcique dans la lignée oligodendrogliale entre la période de prolifération (3-5 jpi) et de différenciation des OPCs (13-14 jpi) lorsque l'activité neuronale est inhibée ou pas par la TTX. 89
4. Etudes des mécanismes de signalisation possibles à l'origine de l'activité calcique dans les cellules de la lignée oligodendrogliale à 3-5 jpi (période de prolifération des OPCs) par différents outils pharmacologiques (Cadmium, Nickel, iGluRm) 91
5. Compréhension de l'activité calcique au sein de la lignée oligodendrogliale à 13-14 jpi (période de différenciation des OPCs) par le Cadmium 94

DISCUSSION 95

CONCLUSION ET PERSPECTIVES DE L'ETUDE 99

CONCLUSION 101

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 105

ANNEXES 110

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I – Le prix des traitements de fond communiqué par le VIDAL et calculé pour 1 patient. 47

Tableau II - Marquage immunologique : Anticorps primaires et secondaires. 81

Tableau III - Evolution de l'activité calcique entre le 1er, 2ème voir 3ème enregistrement réalisés à sur une même position de la tranche en présence de TTX aussi bien à 3-5 jpi ou 13-14 jpi. 91

Tableau IV - Evolution de l'activité calcique entre le 1er, 2ème, 3ème enregistrement réalisés sur une même position de la tranche en présence de Cadmium, Nickel à 3-5 jpi. 93

LISTE DES FIGURES

Figure 1 - Illustration des premières lésions mises en évidence au niveau de la moelle épinière par Cruveilhier et Carswell 15

Figure 2 - Structure et fonction de la gaine de myéline 18

Figure 3 - Phénomène de démyélinisation au niveau du système nerveux central à l'origine de la diminution de l'influx nerveux dans la SEP 20

Figure 4 - Corrélation entre la moyenne annuelle en radiation aux UVB (Wh/m2) en France et le taux de prévalence de la SEP (pour 100 000 personnes) 21

Figure 5 - Prévalence de la sclérose en plaques pour 100 000 habitants à l'échelle mondiale en 2008. 21

Figure 6 - Trois réponses immunitaires hypothétiques responsables de la destruction de la myéline produite par les oligodendrocytes dans la sclérose en plaques 23

Figure 7 - Différentes formes évolutives de la sclérose en plaques 27

Figure 8 - Risque de développer la SEP en fonction du degré de parenté 29

Figure 9 - Résultats exprimés en odds-ratio de la méta-analyse des 6 études rétrospectives et prospectives 34

Figure 10 - Cibles du système immunitaire des molécules en cours de développement et celles ayant déjà obtenu une AMM pour le traitement de fond 51

Figure 11 - Mécanismes d'action de la Biotine 56

Figure 12 - Les étapes de prolifération, différentiation des OPCs et de maturation des pré-oligodendrocytes 64

Figure 13 - Les différentes voies capables d'augmenter le calcium au niveau des cellules de la lignée oligodendrogliale influencées par l'activité neuronale 67

Figure 14 – Les étapes de la remyélinisation au cours du temps 71

Figure 15 – Chirurgie stéréotaxique pour l'injection du LPC in vivo au niveau du corps calleux 75

Figure 16 - Corps calleux de souris visualisé sur tranches aigues de cerveau coupées selon le plan coronal 77

Figure 17 – Schéma du protocole expérimental 81

Figure 18 - Mise en évidence de la lésion sur tranche par épifluorescence au moment de la prolifération (3-5 jpi) ainsi qu'au moment de la différenciation des OPCs (13-15 jpi). 84

Figure 19 - Mise en évidence de la lésion sur une tranche à 4 jpi par immunohistochimie *a posteriori* de l'enregistrement calcique. 85

Figure 20 - Quadrillage d'un enregistrement en 100 ROIs et grossissement sur un ROI présentant une activité calcique au cours du temps. 86

Figure 21 - Analyse du signal calcique à travers l'exemple du ROI 9 d'un enregistrement 88

Figure 22 - Activité calcique mesurée à 3-5 jpi et à 13-14 jpi avec ou sans l'inhibition de l'activité neuronale par la TTX (0.5µM) 89

Figure 23 - Activité calcique mesurée à 3-5 jpi dans différentes conditions avec ou sans inhibiteur (Cadmium, Nickel, iGluR) 92

Figure 24 - Activité calcique mesurée à 13-14 jpi pendant la différenciation dans différentes conditions avec ou sans Cadmium 94

LISTE DES ANNEXES

Annexe 1 – L'échelle de l'EDSS est graduée de 0 à 10 et sert d'outil pour l'évaluation de l'invalidité 110

Annexe 2 - Critères de McDonald révisés en 2010 diagnostic de la SEP. Ils permettent un diagnostic plus précoce de la SEP selon le tableau clinique du patient . 111

Annexe 3 - Tableau non exhaustif des molécules en cours d'études précliniques et cliniques et celles qui ont échoué 116

Annexe 4 - Mécanisme hypothétique en faveur d'une étiologie rétrovirale de la SEP 117

Annexe 5 - Coupe *postmortem* de cerveau humain sur laquelle la myéline est marquée au luxol. 117

Annexe 6 - Structure schématique du marqueur calcique protéique GCaMP 117

ABREVIATIONS

Ac	Anticorps	**CPPK**	(*RS*)-α-Cyclopropyl-4-phosphonophenylglycine
ACC	Acétyl-CoA Carboxylase	**CNAM**	Caisse Nationale d'Assurance Maladie
ADN	Acide DésoxyriboNucleique	**CSH**	Cellule Souche Hématopoïétique
AMM	Autorisation de Mise sur le Marché	**Cx**	Cortex
AMPA	α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid	**DIC**	Digital Interference Contrast
ANOVA	Analyse de la variance	**EAE**	Encéphalomyélite Allergique Expérimentale
ANSM	Agence Nationale de Sécurité du Médicament	**EBV**	Epstein-Barr virus
ARNm	Acid Ribonucleic Messenger	**EBNA**	Epstein-Barr Nuclear Antigens
ARSEP	Association pour la Recherche sur la Sclérose En Plaques	**ECG**	Electrocardiographie
ATP	Adenosine TriPhosphate	**EDSS**	Expanded Disability Status Scale
ATU	Autorisation Temporaire d'Utilisation	**EGFP**	Enhanced fluorescent green protein
AUC	Area Under the Curve	**ELISA**	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
Ax	Axone	**EMA**	European Medicines Agency
BHE	Barrière HématoEncéphalique	**ERK**	Extracellular signal-Regulated Kinases
BAV	Bloc Auriculo-Ventriculaires	**GABA**	Gamma-AminoButuric Acid
CaM	CalModuline	**GECI**	Genetically Encoded Calcium Indicator
CaMKIIβ	Calcium calModulin-dependent Kinase type Iiβ)	**GFAP**	Glial Fibrillary Acidic Protein
CC	Corps Calleux	**GFP**	Green fluorescent protein
CD	Cluster de Différenciation	**GHS**	Groupe Homogène de Séjours
Cd^{2+}	Cadmium	**HAS**	Haute Autorité de Santé
CDD	Charge-Coupled Device	**HEPES**	HydroxyEthyl PiperazineEthaneSulfonic

HERV	Human Endogenous RetroViruses
HHV-6	Human HerpesVirus
Hip	Hippocampe
HLA	Human Leukocyte Antigen
IC	Intervalle de Confiance
IFN	Interféron
IgG	Immunoglobine G
IL	Interleukines
IM	Intramusculaire
IMSGC	International Multiple Sclerosis Genetics Consortium
IP3	Inositol 3-phosphate
IRM	Imagerie par Résonnance magnétique
IV	IntraVeineux
IRSN	Inhibiteurs de la Recapture de la Sérotonine et de la Noradrénaline
JC	John Cunningham
JPI	Jours *post* injection
LB	Lymphocytes B
LCR	Liquide CéphaloRachidien
LEMP	LeucoEncéphalopathie Multifocale Progressive
LIF	Leukemia Inhibitory Factor
LINGO-1	Leucine rich repeat and Immunoglobin-like domain containing protein 1
LPC	LysoPhosphatidylCholine (Lysolécithine)
LT	Lymphocytes T
MBP	Myelin Binding Protein
mGluRs	Récepteurs métabotropiques du glutamate
MPEP	2-Methyl-6-(phenylethynyl)pyridine hydrochloride
MO	Moelle Osseuse
MOG	Myelin oligodendrocyte glycoproteine
MRSV	Multiple Sclerosis-Associated Retrovirus
MSA	Mutualité Sociale Agricole
My	Myéline
NBQX	2,3-dihydroxy-6-Nitro-7-sulfamoylBenzo(f)QuinoXaline
NCAM	Neural Cell Adhesion Molecule
NFS	Numération Formule Sanguine
NMDA	N-methyl-D-aspartate
NG2	Nerve Glial antigen 2
NGS	Normal Goat Serum
OLs	OLigodendrocytes
OPC	Oligodendrocyte Precursor Cells (précurseurs d'oligodendrocytes)
PA	Paquet année
PBS	Phosphate Salin Buffer
PDGFR-α	Platelet Derived Growth Factor-α
PEA	Potentiels Evoqués Auditifs
PES	Potentiels Evoqués Sensoriels
PEV	Potentiels Evoqués Visuels
PFA	Paraformaldéhyde

PI3L	Phosphoinositide 3-kinase	**SOCC**	Store-Operated Calcium Channel
PLP	ProtéoLiPides	**SP**	Sphingosine Phosphate
OB	Olfactif Bulb	**St**	Striatum
OLs	OLigodendrocytes	**T**	Temps
RE	Reticulum Endoplasmic	**Th**	T Helper
SC	Sous-Cutané	**TNF**	Tumor Necrosis Factor
SEM	Standard Error Meaning	**TSH**	Thyroid-Stimulation Hormone
SEP	Sclérose En Plaques	**TTX**	TéTrodotoXine
SEP-PP	SEP-primaire progressive	**UVB**	Ultraviolets B
SEP-RP	SEP-Récurrente progressive	**VGCCs**	Canaux calciques voltage-dépendants
SEP-SP	SEP-secondaire progressive	**VO**	Voie Orale
SERCA	Sarco/Endoplasmic Reticulum Calcium ATPase	**VZV**	Vazicella Zoster Virus
SN	Système Nerveux	**Wh/m^2**	Watt hour per square metter
SNC	Système Nerveux Central	**VGCCs**	Canaux calciques voltage-dépendants
SNP	Système Nerveux Périphérique		

PARTIE 1 - LA SCLEROSE EN PLAQUES, UNE MALADIE DEMYELINISANTE

1. HISTORIQUE DE LA MALADIE

« On ne connait bien une science que si l'on en connait l'histoire », Auguste Comte

A l'époque antique des grecs, romains ou égyptiens aucune description de la sclérose en plaques n'a été retrouvée, même si Galien parlait déjà de tremblement d'action paralytique « Tremor », et de tremblement de repos clonique, convulsif « Palpitation ». La plus ancienne description évocatrice de la maladie « sclérose en plaques » (SEP) proviendrait de Scandinavie, d'une femme du peuple Viking (1293-1323) présentant des troubles de la parole, de la marche avec des périodes de récupération.

Lidwine de Schiedam (XIVe siècle, Hollande) fait également partie des cas connus les plus anciens de la maladie. Cette jeune fille vécut une enfance normale puis présenta après ses 16 ans une maladie progressant lentement avec des périodes d'amélioration dont les symptômes étaient : des troubles de la marche, une paralysie au bras droit, une perte de la vue unilatérale, des douleurs lancinantes à la figure et des difficultés de déglutition.

Un troisième exemple ancien fut celui d'Auguste d'Este (1794-1848, Angleterre), petit-fils du roi George III. Il retrace dans des passages de son journal l'historique de ses symptômes suggérant qu'il avait été touché par la sclérose en plaques (1). Le début de sa maladie s'exprimait par une névrite optique bilatérale, une fatigue permanente, et des troubles de la sensibilité. Au fil du temps, la maladie progressa lentement avec l'apparition de paralysie des deux membres supérieurs, des raideurs dans les jambes qui s'accompagnaient de contractions très douloureuses des muscles des jambes et des pieds, l'empêchant parfois même de dormir (2). Une période de récupération de la marche a été décrite et aurait eu lieu en quelques semaines d'après ses écrits (3).

Pendant qu'Auguste d'Este décrivait sa maladie en Angleterre, le professeur et anatomiste Jean Cruveilhier met en évidence en 1835, les premières représentations des lésions médullaires antéropostérieures, dénommées **sclérose en taches ou en îles**, complétées trois années plus tard par les illustrations du docteur Robert Carswell (1838) (**Figure 1**).

Figure 1 - Illustration des premières lésions mises en évidence au niveau de la moelle épinière par Cruveilhier et Carswell (4).

Les lésions sont à la fois présentes dans les matières blanche et grise, apparaissant sur l'image comme de petites taches brunes.

En 1863, Eduard Rindfleisch met en évidence une inflammation de la substance blanche et évoque la possibilité qu'elle soit responsable de la démyélinisation. Il note en effet la présence d'infiltrats inflammatoires périvasculaires au sein des plaques de sclérose, l'amenant à postuler que la maladie était de nature inflammatoire (5).

« Sclérose en taches ou en îles » fut la première dénomination de la maladie remplacée par le terme sclérose en plaques et utilisé pour la première fois par un médecin français A.Vulpian en 1866 dans une présentation de trois malades devant la Société Médicale des Hôpitaux de Paris. L'étiologie du terme sclérose en plaques est à l'origine du grec « sklêros » qui signifie dur et « plaken » qui vient du néerlandais, se réfère à l'étendue de ce « durcissement des tissus » dans plusieurs régions atteintes du cerveau et de la moelle épinière.

Jean-Martin Charcot neurologue à l'hôpital de la Salpétrière à Paris contribua non pas à la première description mais à la première synthèse de la pathogénicité de la maladie dans ses célèbres « leçons sur les maladies du système nerveux », encore valable de nos jours. Sa description des symptômes cliniques s'inspire notamment de l'une de ses servantes qui présentait trois symptômes : une élocution mal articulée (dysarthrie), des mouvements saccadés des yeux (nystagmus), et un tremblement des bras lorsqu'elle voulait prendre un objet (tremblement intentionnel). A l'autopsie de son cerveau Charcot montra la première corrélation anatomo-clinique, puisqu'il découvrit de « petites taches » typiques de la SEP au niveau du cerveau et de la moelle épinière. Il proposa de poser le diagnostic de SEP chez des malades qui présentaient l'association de ces trois symptômes, appelée triade de Charcot. Il constata rapidement que la SEP pouvait se manifester par d'autres signes, notamment sur des formes bénignes, qu'il appelait formes frustes.

D'autres pathologies ont été décrites par Charcot dont la sclérose latérale amyotrophique (maladie de Charcot) qui porte son nom, et les lésions articulaires non douloureuses observées dans la syphilis. Il est le premier à distinguer le tremblement lié à la paralysie agitante décrit par James Parkinson au tremblement d'action de la SEP. Pierre Marie, élève de Charcot et neurologue proposa en 1884 une origine infectieuse (virale et bactérienne) de la SEP liée à une réaction non spécifique aux infections à tropisme vasculaire comme la typhoïde, la variole, l'érésipèle, la pneumonie, la rougeole, la scarlatine, la coqueluche, la dysenterie ou le choléra (6).

Au 20ème siècle la présence de plaques dans la matière blanche du cerveau était déjà connue et fut observée également dans la matière grise par JM Charcot. JD Dowson développe la notion de préservation des axones des neurones présents aux niveaux des plaques anciennes démyélinisées et confirme aussi la notion d'inflammation péri-vasculaire. En 1921, Hortega et Penfield mettent en évidence un type de cellule gliale chargé de produire la gaine de myéline entourant les axones, ce sont les oligodendrocytes. Des capacités de remyélinisation ont été découvertes au niveau du système nerveux après une démyélinisation induite expérimentalement au niveau de la moelle épinière chez le chat en 1961 par Richard et Mary Bunge.

Pendant la première moitié du 20ème siècle ont été réalisées de nombreuses expériences d'inoculation non conclusives. L'injection de LCR de patients SEP à des animaux sains était censée déclencher les symptômes de la SEP. La recherche d'un agent infectieux (bactérien, viral, fongique) causal reste toujours inconnue à ce jour (3). Cette piste infectieuse avait donné lieu à des essais thérapeutiques antibiotiques, antiviraux et antifongiques en 1940 et par la suite en 2004 avec un essai pour la minocycline (6).

En parallèle de la conception d'une origine infectieuse de la maladie, la deuxième moitié du 20ème siècle fut marquée par le concept d'auto-immunité en tant que mécanisme physiopathologique. A cette période, il a été révélé par E.A Kabat (1942) l'existence d'une augmentation du taux des gammaglobulines dans le LCR, et de bandes oligoclonales par Laterre (1964). L'hyperactivité du système immunitaire a conduit au développement d'immunosuppresseurs et d'immunomodulateurs notamment les interférons β; prescrits pour la première fois en 1993 et l'acétate de glatiramère mis sur le marché en 1996.

La fin du 20ème siècle est marquée par l'essor de nouveaux outils diagnostiques tels que les potentiels évoqués visuels, auditifs, sensitifs, l'examen du liquide céphalo-rachidien par la recherche qualitative de bandes oligoclonales et quantitatives d'immunoglobine G (IgG), et l'imagerie par résonance magnétique (IRM).

A ce jour, même si la pathogénie reste encore mal connue, la prise en charge se fonde sur une approche pluridisciplinaire.

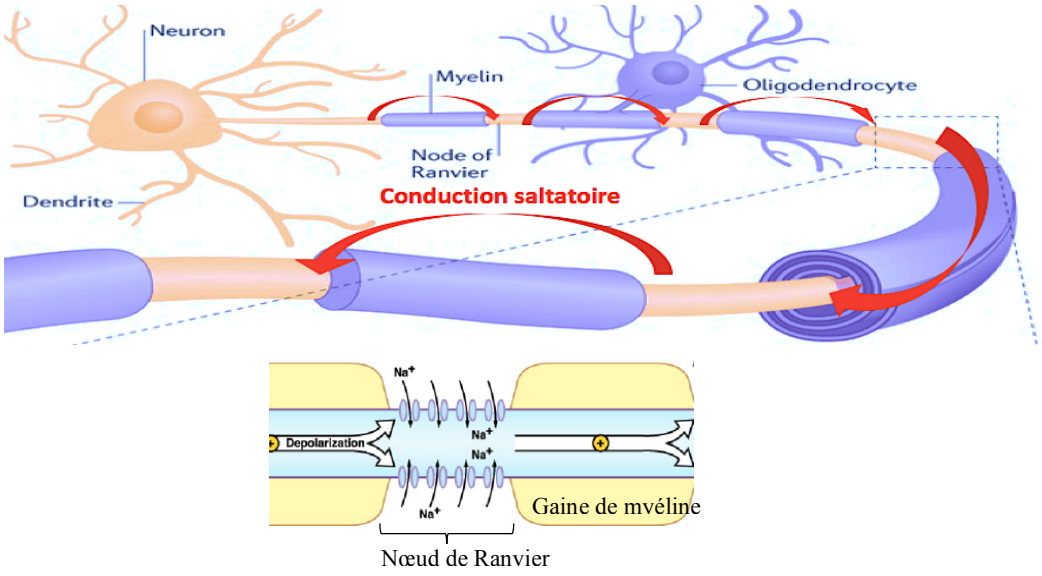
2. QU'EST-CE QUE LA SCLEROSE EN PLAQUES ?

2.1 Généralités sur le SNC et la gaine de myéline

Le système nerveux se sépare en deux structures : le système nerveux central (SNC) et le système nerveux périphérique (SNP). Le SNC de l'homme adulte se compose d'environ 100 milliards de cellules neuronales et de cellules gliales estimées 10 fois plus nombreuses que les neurones.

Au niveau du SNC, les cellules gliales responsables de la myélinisation sont les oligodendrocytes (OLs) à la différence du SNP où il s'agit des cellules de Schwann. La gaine de myéline du SNC correspond à une extension de la membrane plasmique des OLs capable de s'enrouler plusieurs fois autour de l'axone des neurones pour former une gaine isolante (**Figure 2).**

A-



B-

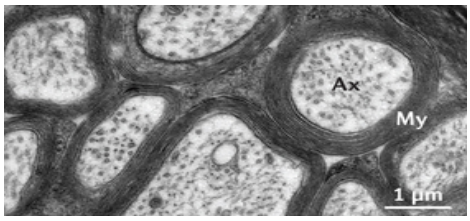


Figure 2 - Structure et fonction de la gaine de myéline d'après (7)

A- Neurone du SNC myélinisé (violet) et représentation de la conduction saltation (flèches rouges) le long de son axone se propageant d'un nœud de Ranvier à l'autre. Zoom d'un nœud de Ranvier riche en canaux sodiques dépendants du potentiel membranaire.

B- Image prise en microscopie électronique d'une coupe transversale de plusieurs axones (Ax) entourés de plusieurs couches de gaine de myéline (My)

Le rôle principal de la gaine de myéline est de favoriser la transmission rapide et saltatoire de l'influx nerveux, important pour l'intégration des fonctions cognitives, motrices et sensitives de l'organisme. L'influx nerveux se propage d'un nœud de Ranvier à l'autre. Les nœuds de Ranvier sont des parties d'interruption de la myéline riches en canaux sodiques voltages-dépendants. D'après plusieurs études, la gaine de myéline jouerait également un rôle métabolique. Elle participerait au support énergétique des axones notamment en participant au transfert de l'ATP et favoriserait la conduction de l'influx nerveux (2,3).

La myéline est composée d'une forte proportion de lipides (70-85%) et de protéines (15-30%) (10). Le ratio protéines/lipides serait environ de 1 pour 186 dans la myéline, plus faible que celui d'autres membranes biologiques. Ce ratio est une preuve de la propriété isolante de la myéline. Les trois principaux lipides sont : le cholestérol, l'éthanolamine plasminogène, et le galactosylcéramide/sulfatide. Leur fonction principale est de stabiliser la myéline, et de réguler la perméabilité de la membrane (11).

Les protéines de la myéline retrouvées chez l'homme et la souris à 90% sont : les PLP (protéolipides), MBP (myelin binding protein), MAG (myelin associated glycoprotein), MOG (myelin oligodendrocyte glycoproteine) (12). Leurs fonctions ne sont pas totalement établies. Cependant, il est connu que la MBP située sur la partie cytoplasmique de la myéline jouerait un rôle dans la compaction des différents feuillets de la gaine de myéline (**Figure 2-B**). La composition de la myéline serait modifiée dans la sclérose en plaques (11).

2.2 Définition et épidémiologie de la maladie

La sclérose en plaques (SEP) est une maladie démyélinisante inflammatoire chronique du SNC incluant le cerveau, la moelle épinière et les nerfs optiques. La maladie se caractérise par une perte progressive de la gaine de myéline entourant les axones des cellules neuronales à l'origine de l'apparition de plaques ou lésions démyélinisantes disséminées dans le SNC (**Figure 3**) (13). L'endommagement de la myéline a pour conséquence la diminution de la conduction nerveuse.

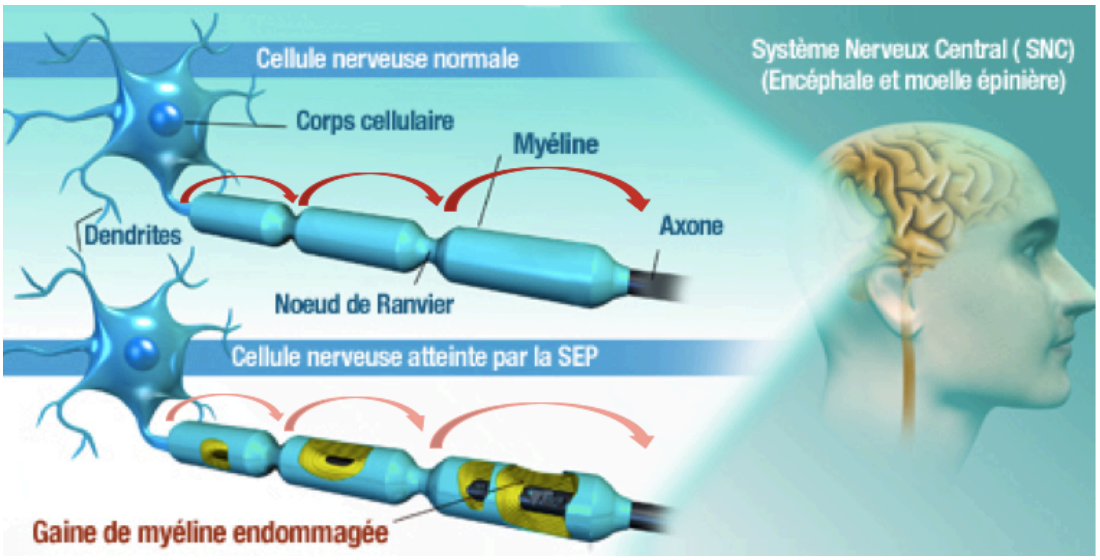


Figure 3 - Phénomène de démyélinisation au niveau du système nerveux central à l'origine de la diminution de l'influx nerveux (représenté par les flèches plus ou moins rouges) dans la SEP (16).

L'axone de la cellule nerveuse ou neurone sain (en haut) est entouré d'une gaine de myéline (cylindres bleus) qui est détruite dans la maladie de la SEP comme illustrée sur le neurone en bas de l'image.

Un syndrome inflammatoire participerait à la perte de cette gaine de myéline aboutissant à des troubles de la conduction de l'influx nerveux des fonctions motrices et sensorielles. Les symptômes varient en fonction de la localisation anatomique de ces lésions, et son évolution est imprévisible.

La SEP affecte environ 2,5 millions de personnes dans le monde, 400 000 aux Etats-Unis, et entre 70 000 et 90 000 patients en France, avec une incidence annuelle de 4 à 6 pour 100 000 habitants d'après la Haute Autorité de Santé (HAS) (14). Il s'agit d'une maladie du jeune adulte qui représente la première cause de handicap sévère non traumatique chez les trentenaires. Elle se déclare en moyenne entre 20 et 40 ans pour 80% des cas, et touche principalement les femmes, avec un « sex-ratio femme/homme » de 1,7/1 en France (14).

Une étude épidémiologique réalisée en France, basée sur les données de la Caisse Nationale d'Assurance Maladie (CNAM) a montré l'existence d'un gradient nord-sud, avec une prévalence plus élevée dans le nord, mais aussi un gradient est-ouest avec une prévalence plus élevée à l'est. Une autre étude menée en 2011 basée sur les données de la Mutualité Sociale Agricole (MSA) a montré l'existence d'une corrélation entre l'exposition solaire (UVB), la latitude, et la prévalence de la SEP (**Figure 4**) (15).

La distribution de la prévalence de la SEP selon un gradient nord-sud a également été constatée à l'échelle mondiale. Les régions les plus proches des pôles nord et sud ont une prévalence plus importante que celle des régions équatoriales (**Figure 5**).

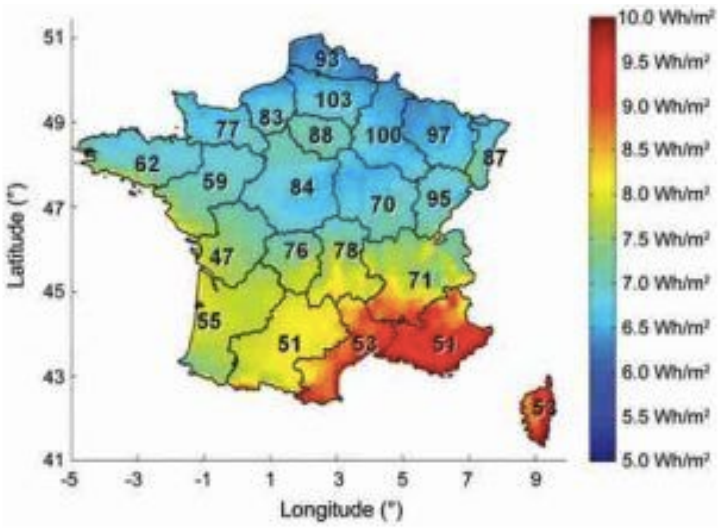


Figure 4 - Corrélation entre la moyenne annuelle en radiation aux UVB (Wh/m2) en France et le taux de prévalence de la SEP (pour 100 000 personnes) pour chaque région incluant des hommes et des femmes assurés par la MSA en 2011 (15)

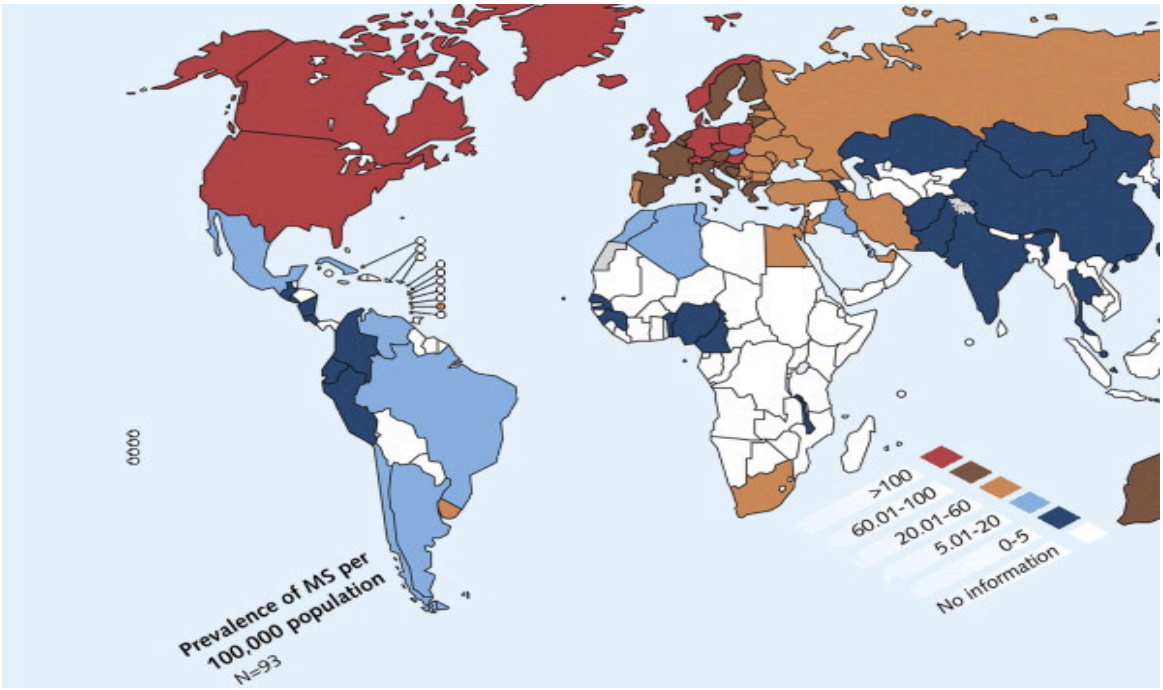


Figure 5 - Prévalence de la sclérose en plaques pour 100 000 habitants à l'échelle mondiale en 2008. La prévalence est plus élevée au niveau des pays les plus proches du pôle nord (Amérique du nord, Europe du nord) et du pôle sud (Australie) (16)

La distribution géographique de la SEP coïnciderait avec les régions envahies par les Vikings du VII-XI^{ème} siècle. En effet, dans les années 90, un neurologue américain (Charles M.Poser) propose la théorie « Viking » selon laquelle la maladie serait apparue avant le XI^{ème} siècle en Scandinavie et se serait disséminée dans le monde au fur et à mesure de leurs conquêtes (17). Des études génétiques, moléculaires à l'échelle mondiale seraient nécessaires pour confirmer cette hypothèse.

Des cas d'enfants atteints de SEP existent. Contrairement à l'adulte, c'est une maladie rare, seulement 3 à 10% des patients touchés par la SEP ont moins de 18 ans et 0,2 à 0,4% ont moins de 10 ans (18). Généralement, l'espérance de vie est peu diminuée chez les personnes atteintes de la SEP, même s'il existe des formes sévères qui altèrent l'espérance de vie.

2.3 Physiopathologie

La physiopathologie se caractérise par un processus de démyélinisation au cours duquel la gaine de myéline est progressivement détruite ayant pour conséquence l'altération de la rapidité de l'influx nerveux. La démyélinisation aboutit au fil du temps à l'apparition de plaques ou lésions focales disséminées dans la substance blanche ; principale zone myélinisée du SNC (nerf optique, zones périventriculaires, corps calleux, cervelet, moelle épinière). Cette démyélinisation s'accompagnerait d'un processus inflammatoire, d'une perte myélinique axonale variable d'une plaque à l'autre et d'une gliose astrocytaire (19).

L'hypothèse la plus couramment admise est que la gaine de myéline est attaquée par le système immunitaire causant une atteinte axonale secondaire (20). A l'inverse, une autre hypothèse considère d'abord l'existence d'un processus neurodégénératif induisant une réponse du système immunitaire responsable dans un second temps de la perte de la gaine de myéline (21).

Au niveau des plaques démyélinisantes, des infiltrats lymphocytaires (LB, LT activés), des macrophages, des molécules du complément, et des cytokines pro-inflammatoires sont retrouvés de façon plus ou moins abondante (22). Une rupture de la barrière hématoencéphalique expliquerait sa perméabilité accrue aux cellules du système immunitaire.

La question que l'on peut se poser est de savoir comment le système immunitaire peut aboutir à la destruction de la gaine de myéline ?

Plusieurs mécanismes peuvent expliquer la démyélinisation médiée par le système immunitaire comme le montre la **Figure 6**.

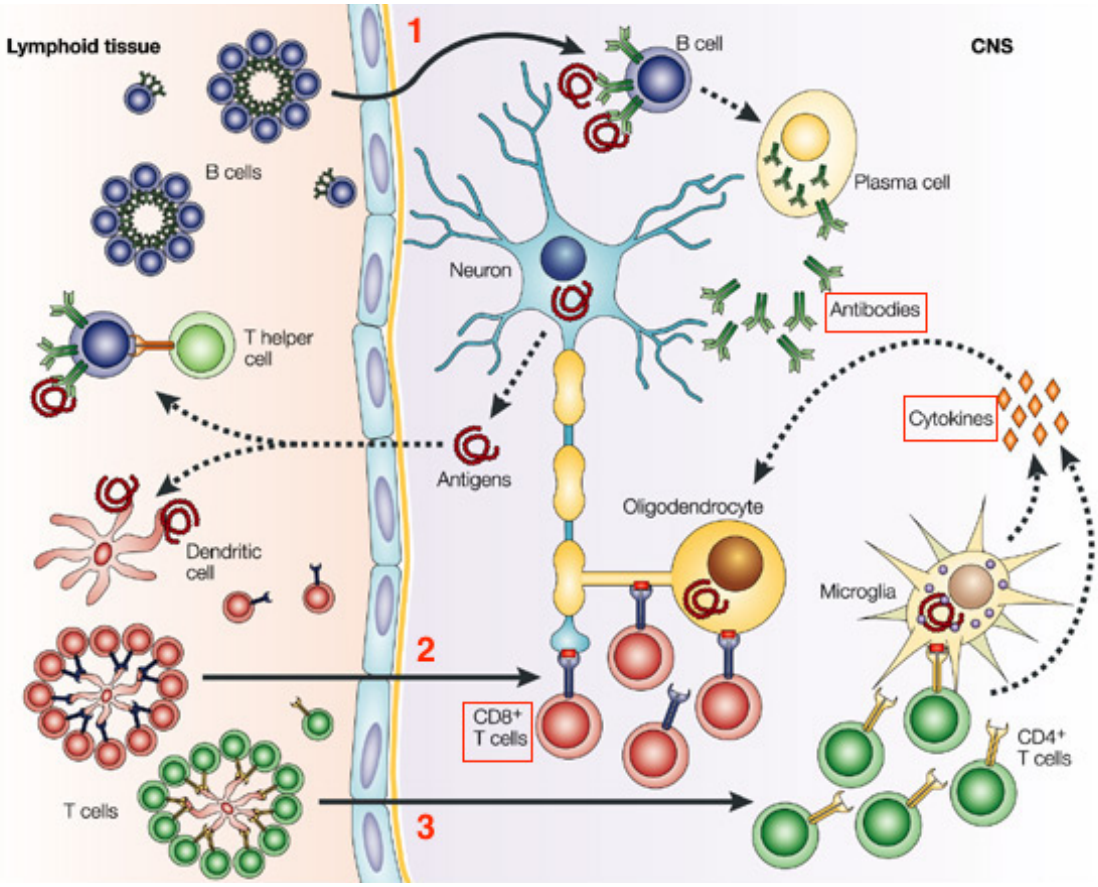


Figure 6 - Trois réponses immunitaires hypothétiques seraient responsables de la destruction de la myéline produite par les oligodendrocytes dans la sclérose en plaques (23)

- Voie 1 : Les LB traversent la BHE et génèrent après leur différenciation des plasmocytes capables de produire des immunoglobines et des molécules du complément participant à la destruction de la myéline.
- Voie 2 : Les lymphocytes cytotoxiques ($CD8^+$) attaqueraient les oligodendrocytes reconnus comme un antigène du CMH de classe I.
- Voie 3 : Les lymphocytes T CD4+ autoréactifs pourraient être activés après la reconnaissance d'un peptide viral, ou un épitope bactérien dans le système périphérique, puis traverser la BHE pour rejoindre le SNC. Dans le parenchyme cérébral les LT CD4+ activeraient les cellules microgliales provoquant la libération de cytokines inflammatoires (Tumor Necrosis Factor : TNF, Interféron gamma) qui à leur tour activent la phagocytose de la myéline par les macrophages.

Il coexiste des lésions d'âge, de taille et d'évolution différentes dans le SNC, expliquant la diversité des signes cliniques (21). Les plaques définies de jeunes ou actives correspondent à celles nouvellement formées et/ou celles qui s'étendent au fil du temps. Elles évoluent vers des lésions scléreuses (non actives ou chroniques).

Des biopsies cérébrales *postmortem* ont révélé 4 principaux patterns immunopathologiques des plaques actives précoces (19)(24) :

- Les lésions de type I ont été retrouvées chez 15% des patients SEP après leur biopsie. La destruction de la gaine de myéline dans ces lésions serait causée par des facteurs toxiques produits par les macrophages. Ces lésions se caractérisent par la prédominance d'infiltrats de LT, de macrophages, associés à une activation microgliale et par l'absence d'immunoglobine et de molécule du complément.
- Les lésions de type II ont été trouvées chez 58% des biopsies, et se démarquent par rapport aux lésions de type I par la présence d'immunoglobines et de molécules du complément. La cible de ces immunoglobulines n'est pas établie, une protéine de la myéline (la MOG) serait un candidat potentiel.
- Les lésions de type III sont retrouvées chez 26% des patients. Elles se caractérisent par une absence d'immunoglobine et par l'apoptose des oligodendrocytes majoritairement sur les bords de la lésion et même en dehors de la plaque. Les macrophages et les cellules microgliales seraient moins activés qu'au niveau des lésions de type I et II.
- Les lésions de type IV sont retrouvées chez seulement 1% des patients. L'inflammation est similaire à celle du type I pour laquelle il s'ajoute une raréfaction des oligodendrocytes et une démyélinisation extensive.

Les lésions de type I et II seraient d'origine auto-immune alors que celles de type III et IV seraient causées par une altération primitive des oligodendrocytes. Une étude menée par IRM de lésions corticales évoque l'idée que le score de l'EDSS (Expanded Disability Status Scale) serait plus mauvais chez les patients présentant le plus de plaques de type III et IV (25). L'EDSS est compris entre 0 et 10, il s'agit d'un outil d'évaluation du handicap (**Annexe 1**).

Ces différents types de plaques peuvent être présentes au sein d'un même patient, et constituent un argument de la complexité des mécanismes mis en jeu dans la destruction de la gaine de myéline par le système immunitaire.

Egalement, il a été montré qu'au niveau de certaines plaques, le nombre d'oligodendrocytes chargés de produire la myéline serait variable. Cela pourrait expliquer les différences de remyélinisation d'une plaque à l'autre chez un patient donné. En effet, une remyélinisation est possible par les oligodendrocytes matures ce qui favorise la récupération des poussées. Cette capacité de remyélinisation reste incomplète dans la maladie, lorsqu'elle a lieu, elle est à l'origine de « shadow plaques ». La gaine de myéline issue de la remyélinisation a pour caractéristique d'être plus fine qu'initialement.

Probablement qu'au niveau de certaines plaques, il existerait un problème soit de la prolifération et/ou soit de la différenciation des cellules précurseurs des oligodendrocytes appelées OPCs. En effet, les OPCs sont capables de se différencier en oligodendrocytes matures chargés de produire la gaine de myéline. Ainsi, il importe de comprendre que s'il y a un problème de la prolifération, différenciation des OPCs et/ou de la maturation des oligodendrocytes cela engendrera une remyélinisation incomplète voire inexistante.

2.4 Symptômes

Les symptômes cliniques sont influencés par la localisation des plaques au niveau du SNC (26). Néanmoins, le nombre de plaques ne corrèle pas avec la multiplicité des symptômes.

Les premières manifestations de la sclérose en plaques peuvent concerner les fonctions sensitives se manifestant par une dysesthésie incluant des fourmillements, picotements, des sensations de brûlures. Egalement, peuvent aussi être altérées, les fonctions motrices (paralysie transitoire d'un membre, trouble de l'équilibre, contrôle des mictions), visuelles (vision floue, baisse brutale de l'acuité visuelle). Certaines formes plus rares débutent par des troubles cognitifs (mémoire, attention) (13).

Les symptômes retrouvés dans la SEP sont :

- Les **déficits moteurs** avec des troubles de la marche, de l'équilibre, et des faiblesses musculaires. L'atteinte des voies motrices des membres peut provoquer de la fatigue, un déclin de la dextérité, une baisse de la force pouvant aller jusqu'à une paralysie. L'interruption des voies contrôlant la réactivité des muscles à l'étirement peut déclencher des crampes et des spasmes. Ces spasmes douloureux interfèrent avec l'autonomie et le travail des patients.
- Les patients atteints de la SEP peuvent avoir des **troubles de la sensibilité** et ressentir des fourmillements, des picotements, des engourdissements, des sensations d'anesthésie, de brûlures, de décharges, de chaud ou de froid.
- Chez 25% des patients, le plus fréquemment chez le patient jeune se déclare une **névrite optique rétrobulbaire**. L'atteinte du nerf optique est le plus souvent monoculaire et entraine une baisse de l'acuité visuelle.
- Des **troubles urinaires, digestifs, sexuels** peuvent se déclarer pendant la maladie. En effet, les intestins, la vessie sont sous le contrôle du système nerveux comme la plupart des organes du corps. 90% des patients souffrent de troubles urinaires, 30% de constipation et 15 % sont sujets à des incontinences fécales. Une diminution de la libido peut se manifester chez les hommes et les femmes atteints par la SEP.
- Des **troubles cognitifs et émotionnels** dont les troubles de l'attention, de la concentration et de mémoire sont constatés chez les malades atteints de la SEP. La dépression concernerait près de 60% des patients. Le taux de suicide est 7,5 fois plus élevé chez les patients atteints de la SEP par rapport à la population générale.

2.5 Les formes évolutives de la SEP

Le pronostic de la maladie est variable et peu prévisible, ce qui représente une source d'anxiété pour le patient.

Trois profils évolutifs de la maladie sont à distinguer selon l'aggravation des symptômes, par poussée ou en progression continue : la forme rémittente récurrente (**SEP-RR**), rémittente progressive ou secondaire progressive (**SEP-RP ou SEP-SP**), et primaire progressive (**SEP-PP**) (**Figure 7**).

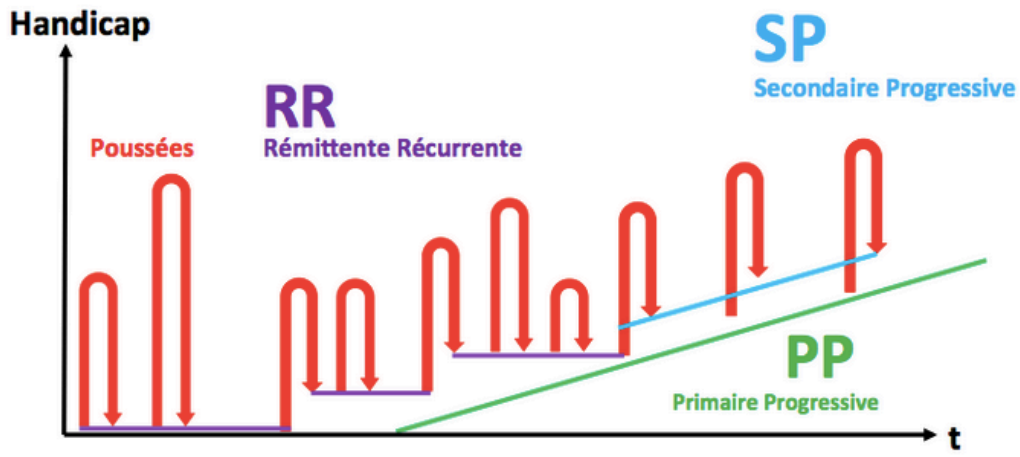


Figure 7 - Différentes formes évolutives selon la gravité du handicap de la sclérose en plaques en fonction du temps (27)

La SEP-RR (violet) commence par des poussées (rouge), puis peut évoluer vers une forme dite secondaire progressive (bleue).

2.5.1 Forme rémittente récurrente

La majorité (environ 85%) des formes de SEP sont dites récurrentes rémittentes (SEP-RR). La SEP-RR évolue par poussées (épisodes aigus) avec des périodes de rémission à des intervalles de temps plus ou moins longs. Pendant la phase de rémission, la récupération peut être plus ou moins rapide et totale, ce qui est plutôt le cas au début de la maladie, ou bien partielle avec quelques séquelles.

Une poussée se définit par l'apparition, la réapparition ou l'aggravation d'un évènement clinique (symptôme neurologique ou douleurs) généralement rencontré lors d'une SEP qui persiste pendant plus de 24 heures. Deux poussées sont distinctes si elles sont séparées d'au moins un mois. Une poussée s'installe au bout de quelques heures ou quelques jours, en l'absence de fièvre chez le

patient. Une poussée correspond à un épisode inflammatoire qui attaque la gaine de myéline au niveau du SNC. Les poussées peuvent être plus ou moins intenses, et engendrer plus ou moins de conséquences. Le handicap a tendance à s'aggraver à chaque apparition de nouvelles plaques ou lésions démyélinisantes. L'apparition des poussées est imprévisible. Les caractéristiques des poussées cliniques varient selon leur sévérité et leur type, allant des troubles sensoriels à une perte totale des fonctions motrices.

2.5.2 Forme rémittente progressive ou secondairement progressive (SEP-SP)

Plus de la moitié des patients atteints par la forme de SEP-RR évolue au bout de 10 ans vers une phase secondairement progressive. La maladie commence par une forme rémittente qui après quelques poussées se stabilise. Par la suite, la symptomatologie préexistante peut réapparaitre subitement et s'accentuer dans le temps au cours duquel d'autres manifestations peuvent s'associer.

2.5.3 Forme progressive primaire (SEP-PP)

La SEP-PP concerne environ 15% des patients SEP. Elle se caractérise par une aggravation lente et progressive des symptômes cliniques. L'apparition des symptômes est d'emblée progressive évoluant selon une vitesse variable. Elle se manifeste très souvent chez les patients dont la maladie débute après 40 ans.

Une atteinte médullaire est très fréquemment retrouvée provoquant comme symptôme une faiblesse progressive des membres inférieurs associée à de la spasticité (paraparésies spastiques) chez 80% des personnes atteintes de la SEP-PP (28). Chez ces patients sont rencontrées souvent des difficultés de la marche.

3. LES CAUSES DE LA SCLEROSE EN PLAQUES

A ce jour, les causes ne sont pas connues avec certitude, mais l'intervention conjointe de plusieurs facteurs est probable. L'origine du déclenchement et de la pérennisation des lésions démyélinisantes proviendraient de la combinaison de facteurs génétiques et environnementaux (13). C'est une maladie très probablement multifactorielle.

3.1 Facteurs génétiques

La sclérose en plaque n'est pas une maladie héréditaire, c'est-à-dire qu'elle n'est pas transmissible directement des parents à l'enfant. Cependant, il existerait une susceptibilité génétique de la sclérose en plaques à 2 niveaux : familiale et ethnique.

Les formes familiales sont peu fréquentes puisque 10 à 15% des patients ont un membre de leur famille atteint. Le risque de développer la maladie est fonction du degré de parenté (**Figure 8**). Une étude menée chez 100 paires de jumeaux monozygotes a montré que si l'un des jumeaux était atteint de SEP, le second l'était également dans 30% des cas. A la différence des jumeaux dizygotes pour lesquels l'autre jumeau était atteint dans environ 6% des cas (29).

Risque	
1:3	SEP chez un jumeau/une jumelle monozygote.
1:15	SEP chez un jumeau/une jumelle hétérozygote.
1:25	SEP chez une sœur ou un frère.
1:50	SEP chez un parent ou une demi-sœur/un demi-frère.
1:100	SEP chez un(e) cousin(e) du premier degré.
1:1.000	SEP chez le conjoint/la conjointe.
1:1.000	Aucun cas de SEP dans la famille.

Figure 8 - Risque de développer la SEP en fonction du degré de parenté (30)

Selon les origines ethniques, il existe également une susceptibilité génétique variable. Par exemple, il a été constaté au sein d'une même région géographique aux Etats-Unis que la prévalence était deux fois plus élevée chez les sujets d'origine caucasienne par rapport à ceux d'origine africaine. Un autre argument en faveur de l'implication de l'origine ethnique serait que pour une latitude donnée, la prévalence de la maladie est plus faible chez les asiatiques que les européens (33).

La question posée actuellement par les données épidémiologiques, est de savoir quels gènes seraient impliqués dans le développement de la maladie et quelles sont leurs fonctions dans la physiopathologie de la maladie ?

En 2011, l'International Multiple Sclerosis Genetics Consortium (IMSGC) a publié une étude génomique incluant 9772 patients atteints de SEP en comparaison avec 17 376 personnes indemnes issues de 15 pays européens. Les résultats ont confirmé 23 variants déjà connus et identifié 29 autres variants de prédisposition génétique à la maladie (31). Il n'existerait pas un gène responsable de la maladie mais plutôt des facteurs génétiques prédisposant la maladie. La plupart de ces gènes identifiés ont un rôle dans le fonctionnement du système immunitaire. La majorité d'entre eux sont concentrés dans la région HLA-DR portée par le bras court du chromosome 6. Ils codent pour des antigènes impliqués dans la présentation antigénique aux lymphocytes T. Cette présentation participe à la reconnaissance du soi. Elle est responsable de la défense contre des pathogènes et serait impliquée dans les mécanismes d'auto-immunité dont ceux de la sclérose en plaques. D'autres gènes candidats incriminés dans la maladie auraient un rôle dans l'activation des interleukines (médiateurs des cellules immunitaires), dans le métabolisme de la vitamine D, dans la production des facteurs de croissance des oligodendrocytes, les interférons, les protéines de la myéline (MBP, MOG, PLP) (32)(33)(34). Un tiers des gènes sont retrouvés dans d'autres maladies auto-immunes telles que la maladie de Crohn, et le diabète de type 1.

Il est difficile de savoir si ces gènes « prédisposants » sont directement impliqués ou s'ils sont liés à un déséquilibre avec d'autres gènes réellement prédisposants.

Actuellement, l'hypothèse évoquée est que l'augmentation du risque de développer la SEP serait liée à l'interaction de plusieurs gènes variables selon l'origine ethnique et le fond génétique familial. En effet, le risque d'être atteint de la SEP est augmenté chez les personnes ayant un membre de la famille atteint d'une autre maladie auto-immune.

3.2 Facteurs environnementaux

3.2.1 Facteurs de risque infectieux

Depuis longtemps, de nombreux agents infectieux notamment neurotropes ont été suspectés dans la physiopathologie de la sclérose en plaques dont les virus d'Epstein-Barr (EBV), herpès 6 (HHV-6), de la varicelle et du zona (VZV) et de rétrovirus endogènes (HERVs). L'analyse d'échantillons de LCR et du sang de patients atteints de SEP a permis de retrouver de manière plus importante que chez les non malades de l'ADN, de l'ARN et des anticorps dirigés contre des antigènes d'agents infectieux tels que le virus de l'Epstein Barr, l'herpès virus (HHV6), le rétrovirus humain endogène (HERVs), et la bactérie *Chlamydia pneumoniae*. Ces virus pourraient être à la fois impliqués dans le déclenchement et l'évolution de la sclérose en plaques (35).

L'EBV responsable de la mononucléose infectieuse est un des agents présentant le plus d'arguments en faveur d'un lien de causalité avec la sclérose en plaques et être considéré comme un co-facteur. En effet, il existe une corrélation entre séropositivité EBC et SEP: 99,5% des patients atteints de SEP sont EBV+, contre 94% chez les individus non atteints (36). Par ailleurs, une étude prospective a montré que les titres d'anticorps anti-EBNA (complexe anti-EBNA, et anti-EBNA-1) dans le sérum étaient de robustes marqueurs du risque d'être atteint de SEP. Les données montrent qu'il y aurait un risque 7 à 36 fois plus élevé chez les individus présentant un titre IgG anti-EBNA ou anti-EBNA-1 supérieur à 320 par rapport à ceux dont le titre est inférieur à 20 (37). Le mécanisme d'action passerait par une modulation de l'activité des lymphocytes B (LB), ou agirait en tant que cofacteur des rétrovirus endogènes. Mais toutes les personnes porteuses de l'EBV ne développent pas une

sclérose en plaques. Ceci pourrait s'expliquer par la nécessité d'un terrain génétique prédisposant, et /ou de la souche d'EBV.

Trois hypothèses ont été émises quant à la manière dont l'agent infectieux participerait au processus de démyélinisation :

- Soit l'infection provoque un dérèglement du système immunitaire qui attaquerait les gaines de myéline plutôt que les agents pathogènes.
- Soit la persistance du virus dans le système nerveux provoquerait une encéphalite. Les LT CD4 seraient stimulés par la présentation d'un exo-antigène (par exemple de l'EBV) de structure proche de la myéline et provoquerait la production d'anticorps par les LB dirigés contre la myéline et l'antigène viral. C'est le principe du mimétisme moléculaire.
- Soit un rétrovirus provoquerait la sécrétion d'un facteur gliotoxique perturbant la fonction des cellules macrogliales du SNC (astrocytes et oligodendrocytes) nécessaire à la myélinisation (34).

Une étude menée chez des populations migrantes vers un pays dont la prévalence pour de la SEP est différente de leur pays d'origine a mis en évidence que la prévalence était changée par rapport au pays d'origine si la personne migrait avant l'âge de 15 ans. En revanche, si la personne migrait à l'âge adulte, elle conservait la prévalence de son pays d'origine. Ces résultats ont conduit à suggérer l'existence d'un âge seuil à environ 15 ans, à partir duquel il existe un risque de « contracter » la SEP. Pour anecdotes, des migrants d'Angleterre et d'Irlande vers l'Australie à l'âge de 0-14 ans après la seconde guerre mondiale (après 1947) présentaient une prévalence comparable à la celle de l'Australie alors que les migrants de plus de 14 ans ont conservé la prévalence d'origine. Par ailleurs, les résultats de l'étude ont montré que l'incidence avait augmenté pour les personnes nées en Australie à la suite de cette période migratoire (après 1947) de populations anglaise et d'Irlande. En comparant les migrants précoces (arrivés avant 1947) et tardifs (après 1947), il a été constaté que les migrants précoces étaient plus jeunes et que le début de la maladie commençait plus tard (38).

Les observations de l'étude pourraient soulever la possibilité d'une transmission infectieuse de la SEP essentiellement pendant l'enfance (avant l'âge de 15ans).

3.2.2 Facteurs de risque non infectieux

- **Vitamine D**

La principale source de vitamine D de l'organisme est l'exposition de la peau aux UVB du soleil, l'apport secondaire provient de l'alimentation (orange, lait, céréales, fromages, saumon…) (39). Le gradient nord-sud de la prévalence de la SEP à l'échelle mondiale et de la France est corrélé avec le niveau d'ensoleillement et la quantité de vitamine D de l'organisme (40).

De plus une étude comparative a révélé des taux inférieurs de vitamine D chez les patients présentant une SEP-RR par rapport aux personnes contrôles. Cette différence de taux en vitamine D était encore plus marquée chez les patients en période de poussée.

L'effet protecteur de la vitamine D sur le développement de la SEP s'expliquerait par son effet inhibiteur sur la production de cytokines pro-inflammatoires et faciliterait le développement de lymphocytes T régulateurs impliqués dans le maintien de la tolérance du soi (33). L'effet immunomodulateur de la vitamine D s'effectuerait par l'activation des récepteurs de la vitamine D situés au niveau des cellules du système immunitaire (LB et LT), qui a pour conséquence la commutation d'une réponse Th1 pro-inflammatoire vers une réponse Th2 anti-inflammatoire.

Les taux sanguins normaux de vitamine D sont entre 75-100 nmol/L. Une hypovitaminose est définie entre 25-75 nmol/L et une carence en dessous de 25 nmol/L de sang.

L'analyse génétique des patients présentant une SEP a révélé 5 mutations rares du gène codant pour une protéine du métabolisme de la vitamine D (CYP27B1), qui permet de transformer la 25(OH)D en vitamine D. Ces mutations provoqueraient des hypovitaminoses chez les patients avant le déclenchement de la SEP et appuie l'argument que la vitamine D jouerait un rôle dans la physiopathologie de la maladie (41).

- **Tabac :**

Une méta-analyse de six études prospectives et rétrospectives regroupées a conclu à un risque de développer une SEP accru chez les fumeurs par rapport aux non-fumeurs. D'après la **Figure 9** extraite des résultats de cette méta-analyse, tous les odds ratio des 6 études sont supérieures à 1 avec un odds moyen de 1,34. Une association existerait entre le tabac et le développement de la SEP.

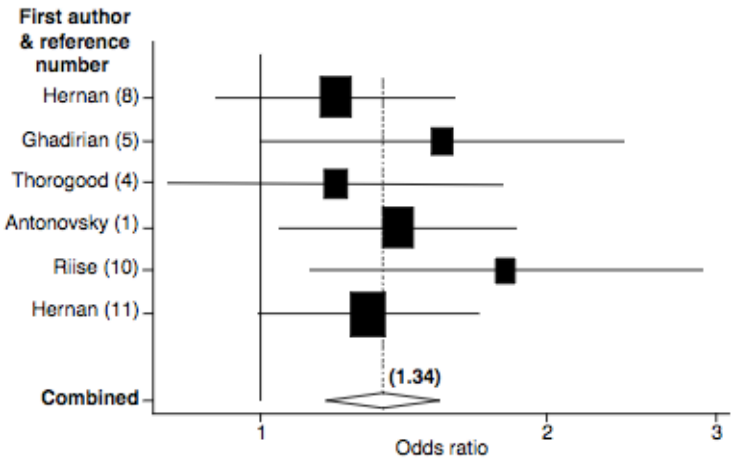


Figure 9 - Résultats exprimés en odds-ratio de la méta-analyse des 6 études rétrospectives et prospectives (42).

Ces résultats se sont confirmés avec une autre méta-analyse de 14 articles qui a conduit à un OR de 1.48 [1,35-1,63](43).

Ce risque existerait à partir de 5 PA (paquet année) et persisterait jusqu'à 5 ans après l'arrêt du tabagisme. De plus, le tabagisme passif chez des enfants dont les parents sont fumeurs augmenterait de 2,12 fois le risque de premier évènement démyélinisant par rapport à ceux ayant des parents non-fumeurs (44).

La nicotine agirait sur la perméabilité de la BHE en augmentant la concentration plasmatique de monoxyde d'azote (NO), et aurait pour conséquence l'influx de lymphocytes auto-réactifs au niveau du SNC. Les composés cyanidiques contenus dans la cigarette, dont l'oxyde nitrique serait toxique pour la myéline. La fumée de cigarette contient des oxydants, des éléments carcinogènes et mutagènes. Cette fumée provoqueraient au niveau pulmonaire des réactions de stress oxydatif et pro-inflammatoire, qui réactiveraient les cellules à mémoire auto-immunes (45).

- **Stress**

Il est difficile d'évaluer de façon objective une relation entre le stress et la SEP. En effet, la mesure du stress est complexe et variable d'une étude à l'autre puisqu'elle peut prendre en considération plus ou moins de paramètres comme son caractère chronique ou aigu, sa sévérité, sa provenance avant le déclenchement de la maladie et son impact sur la maladie. Une méta-analyse a reporté une relation entre le stress et SEP dans 15 études sur 17 entre 1980 et 2010 (46).

Les mécanismes biologiques de la relation stress et SEP sont très hypothétiques et se basent très souvent sur un modèle de démyélinisation, la EAE (Encéphalomyélite Allergique Expérimentale), et non sur un modèle de SEP. Le stress aigu favoriserait les réponses immunitaires Th1 et Th2 alors que le stress chronique diminuerait la réponse Th1 immunitaire vers une réponse augmentée Th2 anti-inflammatoire.

Actuellement, prévenir la survenue de la maladie chez une personne qui serait prédisposée génétiquement est difficilement envisageable du fait de la complexité factorielle.

3.3 Causes controversées

- **Vaccins**

Le vaccin contre l'hépatite B a été largement utilisé en France ces dernières années, plus de 20 millions de personnes ont été vaccinées.

Plusieurs cas signalés de SEP ont laissé penser que le vaccin contre l'hépatite B pouvait être associé à des cas nouveaux ou à des rechutes de scléroses en plaques. Néanmoins seule une étude épidémiologique, très critiquée, sur plus d'une dizaine d'étude a identifié une association statistiquement significative entre sclérose en plaques et vaccin hépatite B (47). L'analyse des données disponibles a conduit l'Organisation Mondiale de la Santé à réfuter l'hypothèse d'un lien de causalité entre le vaccin administré aux adultes et la survenue ou rechute de la SEP (48).

Des cas de lésions démyélinisantes ont été rapportés après la prise de Gardasil (vaccin contre le papillomavirus) néanmoins les études statistiques menées sur les années 2006 à 2015 ne montrent aucune corrélation (49).

4. DIAGNOSTIC CLINIQUE ET PARACLINIQUE DE LA SEP

Le diagnostic de la SEP repose surtout sur des arguments cliniques, c'est-à-dire sur des symptômes évocateurs de la maladie chez un adulte jeune et évolutifs dans le temps et l'espace de la substance blanche du SNC. Il n'existe pas de marqueur diagnostique spécifique de la maladie (50). Les critères diagnostiques suivent ceux décrits par McDonald en 2001 et révisés en 2010 par Swanton (**Annexe 2**). Ces critères sont basés sur 3 principes :

- La **dissémination des lésions spatiales** (DLS) avec au moins deux lésions du SNC sur plusieurs zones du SNC. Elle peut être mise en évidence par des examens paracliniques (IRM) confirmés par des données cliniques (55).
- La **dissémination des lésions temporelles** (DLT) se traduit par au moins deux épisodes neurologiques distincts, soit de deux poussées espacées d'au moins un mois. Sa mise en évidence est permise par l'examen clinique à la suite d'un entretien avec le patient et par le suivi des lésions démyélinisantes même asymptomatiques dans le temps par IRM. Pour les formes de SEP progressive d'emblée, le critère de dissémination dans le temps est établi dès lors que la maladie évolue depuis plus d'un an.
- L'**inflammation du SNC** révélée par la présence d'éléments inflammatoire du LCR.

Les critères les plus récents (critères de McDonald révisés en 2010) autorisent le diagnostic de SEP dès la première poussée à condition qu'il y ait une dissémination spatiale (deux localisations différentes) (50). Cette dissémination doit avoir lieu dans deux des quatre zones stratégiques (périventriculaire, sous-tentorielle, juxta-corticale ou médullaire) et ne doit pas prendre en compte la lésion responsable de la clinique. Dans le cas contraire, il faudra attendre une nouvelle poussée (clinique ou IRM) pour définir cette dissémination temporelle et/ou spatiale. En pratique pour mettre

en évidence précocement une nouvelle poussée, un examen par IRM est réalisé souvent environ 3 à 6 mois après l'IRM initiale.

L'extraction du LCR par ponction lombaire constitue un examen complémentaire à la clinique et l'IRM. Il sert à mettre en évidence une inflammation du SNC retrouvée chez une majorité de patients (environ 90-95%). Deux indicateurs de l'inflammation du SNC sont couramment utilisés : les bandes oligoclonales, et l'index IgG.

La mesure qualitative de l'inflammation est effectuée par la mise en évidence d'au moins 2 **bandes oligoclonales** spécifiques du LCR (non retrouvées dans le sérum) identifiées par la technique d'isoélectrofocalisation. Ces bandes oligoclonales spécifiques du LCR correspondent à des IgG issues de la synthèse intrathécale, c'est à dire la production locale d'IgG, à l'intérieur des méninges.

La mesure quantitative de l'inflammation se base sur **l'index IgG** calculé à partir du dosage des IgG et de l'albumine (51). Les IgG du LCR peuvent augmenter par une synthèse accrue au niveau périphérique, par l'altération de la barrière hématoencéphalique, et/ou par une synthèse intrathécale. La quantification de l'albumine permet de connaitre l'intégrité de la BHE.

L'index IgG se calcule par le rapport entre le quotient IgG (IgG LCR/ IgG sérum) et le quotient albumine (albumine LCR/ albumine sérum) :

$$\text{Index IgG} = \frac{\text{IgG LCR} * \text{albumine sérum}}{\text{IgG sérum} * \text{albumine LCR}} \quad (1)$$

Un index IgG augmenté (supérieur à 0,7) correspond à une sécrétion intrathécale d'IgG et cela peut favoriser l'élévation de la protéinorachie (N= 0.15-0.30 g/l) comme observée chez 25% des patients sans dépasser 1g/l (52).

La gammaglobuline est augmentée dans le LCR dans 70 % des cas et reste normale dans le sang. L'examen du LCR n'est pas systématique si les critères diagnostiques sont déjà remplis, mais il aide aussi à éliminer des diagnostics différentiels.

Chez deux tiers des cas de SEP, la cytorachie (N : < 5 éléments/mm3) composée d'éléments mononucléés (majoritairement des lymphocytes et plasmocytes) est augmentée mais reste inférieure à 50 éléments/mm^3.

Les potentiels évoqués auditifs (PEA), visuels (PEV), sensoriels (PES) peuvent être réalisés dans un contexte clinique où l'IRM et l'analyse du LCR sont non concluantes. Ces examens consistent à calculer le temps écoulé entre la stimulation (auditive, visuelle ou sensorielle) et l'arrivée de l'information au niveau de la région corticale concernée. Un ralentissement de l'influx nerveux peut être mis en évidence, résultat de la démyélinisation des voies auditive, visuelle ou sensorielle. Les PEV restent le plus pratiqués compte tenu de la fréquence de la névrite optique dans la SEP.

5. PRISE EN CHARGE THERAPEUTIQUE

A ce jour, il n'existe pas de traitement capable de guérir la sclérose en plaques. Cependant, la prise en charge médicamenteuse est capable de réduire la durée et l'intensité des poussées, de ralentir l'évolution de la maladie, et de traiter les symptômes liés à la maladie. La prise en charge définie par la HAS inclut aussi l'instauration si besoin d'une rééducation pour éviter les complications liées à l'immobilité (58).

5.1 Traitements de la poussée

Les *corticoïdes* (Méthylprednisolone, *Solumedrol ®)* ont pour intérêt d'accélérer la récupération des poussées en diminuant leur durée et leur intensité. Ils sont administrés par une perfusion intraveineuse d'une durée de 3 heures à la dose de 1 g par jour pendant 3 à 5 jours ou en bolus d'emblée à 3 g. Ils n'ont pas d'effet démontré sur la prévention de nouvelles poussées, ni d'influence sur le pronostic à moyen et long terme. Leur utilisation n'est pas systématique si les symptômes ne sont pas gênants. La première perfusion doit être effectuée en milieu hospitalier. Toutes les autres peuvent être effectuées à domicile sauf précaution particulière (58)(50).

Il est possible d'effectuer un relais dégressif par des corticoïdes par voie orale (VO) : Prednisolone (*Solupred®)*.

Les effets indésirables les plus fréquents sont la rétention hydrosodée, l'hypokaliémie, les ulcères gastro-intestinaux, les troubles du rythme cardiaque. Un électrocardiogramme est réalisé avant chaque administration. La glycémie est à surveiller puisqu'il existe un risque d'hyperglycémie. Une supplémentation en potassium (*Diffu-K ®)* par VO peut être adjointe aux corticoïdes pour éviter les hypokaliémies pouvant aboutir à des troubles du rythme cardiaque (53).

5.2 Traitements de fond

Tous les traitements de fond agissent sur la réponse immunitaire, soit de façon immunomodulatrice (en modifiant l'équilibre de certains systèmes immunologiques comme le réseau des cytokines), soit de façon immunosuppressive (en interférant avec le cycle cellulaire des cellules immunocompétentes ou en modifiant la distribution de ces cellules dans l'organisme). Leur intérêt est de diminuer la fréquence des poussées, le nombre de lésions au niveau du SNC mises en évidence à l'IRM et de retarder la survenue des symptômes de la maladie.

5.2.1 Les immunomodulateurs

Les traitements de fond par immunomodulateurs concernent les formes de SEP-RR et le début des phases progressives de SEP-SP. Les interférons béta (IFN-β : beta 1-a et beta 1-b) et l'acétate de glatiramère bénéficient d'une AMM de traitement de 1ère intention dans les SEP-RR et doivent être prescrits et renouvelés par un médecin neurologue.

INTERFERONS B-1

Les interférons β-1 sont des molécules appartenant à la famille des cytokines qui ont pour rôle de moduler la réponse inflammatoire du système nerveux central notamment en diminuant le nombre et l'activité des lymphocytes. Ce traitement diminue l'expression de molécules d'adhésion, ce qui freine la pénétration des LT et des macrophages à travers la BHE. Egalement, les IFN β diminueraient

l'expression de cytokines proinflammatoires par les LTh1 (IFN gamma et TNF) et stimuleraient la production de cytokines anti-inflammatoires (IL10 et IL4). Les interférons sont capables de diminuer la fréquence des poussées d'environ 30%, et de réduire de 50 à 70% le nombre de lésions à l'IRM (54). Les IFN β-1 a (*Avonex®, Rebif®*) et β-1 b (*Betaferon®, Extavia®*) sont indiqués dans les formes SEP-RR et SEP-SP lorsque les poussées persistent (55). Leur administration s'effectue en sous-cutané (SC) ou en intramusculaire (IM) selon la spécialité.

Les interférons existent depuis les années 1993 dans l'arsenal thérapeutique de la SEP, et récemment une nouvelle forme pégylée de l'interféron : Peginterféron β-1 a (*Plegridy®*) est apparue sur le marché en 2015 dans le traitement des formes rémittentes récurrentes. La pégylation d'une molécule consiste à lui ajouter une chaine polyéthylène et augmente sa stabilité, sa biodistribution et son t1 /2. L'avantage pour le patient est la réduction de la fréquence des injections et une meilleure adhérence. L'administration se fait toutes les 2 semaines par injection sous-cutanée de 125 µg au lieu de 1 à 7 injections par semaine pour les interférons non pégylés. La non adhérence des patients sous interférons non pégylés a été estimée entre 15 à 60%, a un impact sur le risque de rechute, la progression de la maladie et a des conséquences économiques pour la société (56). L'amélioration de la formulation des interférons constitue une possibilité pour diminuer la fréquence d'administration et améliorer l'adhérence et l'efficacité thérapeutique des interférons. Il n'existe pas d'étude comparative pour le moment entre les formes pégylées et non pégylées des interférons.

Les interférons sont des médicaments d'exception initiés et surveillés par le neurologue dont les prix s'élèvent d'après le VidalReco (2016) à 779,50 € pour le *Plegridy®*, 832,16 € pour le *Betaferon®,* 759,48 € pour *Extavia®,* 779,30 € pour *Avonex®,* 795,82 € pour le *Rebif®* et tous sont remboursables à 65%.

Leur tolérance est globalement bonne même s'il existe les premières semaines de traitement chez la moitié des malades une apparition d'un syndrome pseudo-grippal. D'autres effets indésirables peuvent être retrouvés tels qu'un effet au point d'injection, un syndrome dépressif, des effets hépatiques (élévations des transaminases), hématologiques (lymphopénie, anémie, neutropénie,

thrombopénie). La surveillance de l'hémogramme et des transaminases est nécessaire tous les mois pendant les 3 premiers mois puis tous les 6 mois. Les interférons sont contre-indiqués lors de la grossesse et chez les cas de dépression sévère.

ACETATE DE GLATIRAMERE (*COPAXONE®)*

L'acétate de glatiramère (*Copaxone®)* est un analogue de la protéine basique de la myéline (PMB ou MBP en anglais). Il est indiqué, comme pour les interférons, chez les patients atteints de SEP-RR pouvant marcher caractérisés par 2 poussées récurrentes au cours des 2 dernières années ou après un 1er évènement démyélinisant. Il représente un traitement de choix pour les patients présentant une intolérance majeure aux interférons.

Son action immunomodulatrice agit sur la différenciation des lymphocytes en restaurant les LT régulateurs et en diminuant les IL2 et IFN-γ pro-inflammatoires (57)(53). Son efficacité pour réduire la fréquence et la sévérité des poussées est comparable à celle des IFN β. Sa tolérance est meilleure que les IFN β, il ne déclenche pas de syndrome pseudo grippal à la différence des IFN β. Ses effets indésirables sont rares et peu sévères même si une réaction locale au point d'injection ou systémique (flush, dyspnée, oppression thoracique…) et des adénopathies sont possibles. Aucun suivi biologique n'est particulièrement nécessaire avec ce traitement.

L'administration s'effectue en sous-cutané quotidiennement à une posologie de 20mg. Le coût est similaire à celui des interférons. Leur efficacité serait identique à celle des interférons β avec des effets indésirables différents. Le coût de la spécialité *Copaxone*® est proche de celui des interférons béta soit 781,46 € remboursé à 65% par la sécurité sociale. Ce médicament est déconseillé pendant la grossesse et l'allaitement.

TERIFLUNOMIDE (AUBAGIO®)

Le tériflunomide (*Aubagio*®) a été mis sur le marché en France récemment en 2014, il s'agit d'une alternative de 1ère intention aux traitements de fond classique (l'interféron β et l'acétate de glatiramère). Son indication est précisée pour les formes de SEP RR avec poussées et s'administre à une posologie de 14mg une fois par jour par VO. L'administration de ce médicament peut être appréhendée par le patient comme moins contraignante puisqu'il s'agit d'une forme orale à prendre une fois par jour à la différence des traitements de fond classiques pris en injectable. Le Tériflunomide inhibe la prolifération des LT, LB et induit la production de cytokines anti-inflammatoires par les lymphocytes Th2. Avant l'instauration du Tériflunomide, un dosage des enzymes hépatiques doit être réalisé et renouvelé au cours du traitement. Une étude de phase III contrôlée en double aveugle (TEMSO) a montré que le Tériflunomide administré à une dose de 14 mg par rapport au placebo diminuait la fréquence des poussées de 31,5%, abaissait le nombre de lésions visualisées à l'IRM et diminuait de 30% le risque de progression du handicap. Les effets indésirables les plus fréquents relevées dans les essais cliniques sont les troubles digestifs, la grippe, des infections respiratoires, urinaires, et une augmentation des ALAT (61). Il est contre-indiqué en cas de grossesse. Le prix est de 829,84 € et remboursable à 65%.

DIMETHYL-FUMARATE (*TECFIDERA*®)

Le diméthyl-fumarate (*Tecfidera*®) a obtenu l'AMM en 2014 dans le traitement de fond de la SEP de forme rémittente récurrente en tant qu'alternative de forme orale aux interférons β et à l'acétate de glatiramère. A l'instauration du traitement, la posologie est de 120 mg deux fois par jour, puis est augmentée après 7 jours à 240 mg deux fois. Le mécanisme d'action de cette molécule n'est pas complètement élucidé, il pourrait activer la voie Nrf2 pour déclencher un effet anti-inflammatoire et pour moduler des voies anti-oxydantes combattant la neuro-inflammation, la neurodégénération, et le stress oxydatif. C'est un traitement indiqué dans la prise en charge par VO du traitement de fond des patients adultes atteints de la forme rémittente de la SEP. Dans une étude de phase 3 (DEFINE) menée chez des patients atteints de la SEP-RR, le nombre de patients ayant rechuté au cours des 2

années de l'étude était moindre dans le groupe traité au *Tecfidera*® (27% administré à 240mg 2x/j) par rapport au placebo (46%). Les lésions au bout de 2 ans ont significativement diminué de même que le risque de progression du handicap dans le groupe traité par rapport au placebo. Un suivi des lymphocytes doit se faire tout au long du traitement puisqu'il y a été montré dans les essais cliniques une baisse de 30% du taux de lymphocytes par rapport aux valeurs initiales. Les effets indésirables retrouvés sont des troubles gastro-intestinaux surtout au début, des bouffées de chaleur. Il existe un risque de développer une LEMP. La prise du médicament au moment des repas permet d'améliorer la tolérance (62). Ce médicament est contre-indiqué pendant la grossesse. Le coût est de 249,34 € pour 14 gélules de 120mg et de 948,75 € pour 56 gélules de 240mg (remboursement à 65%).

5.2.2 Les immunosuppresseurs

Les immunosuppresseurs sont réservés aux formes agressives primaires progressives et en 2ème intention en cas d'échec aux interférons ou à l'acétate de glatiramère. Leur indication est restreinte à des formes sévères de la maladie, en cas de persistance ou de réapparition de poussées et de nouvelles lésions visibles à l'IRM.

MITOXANTRONE (*ELSEP®)*

La mitoxantrone (*Elsep®)* est une molécule apparentée aux anthracyclines, il s'agit d'un intercalant de l'ADN d'action immunosuppressive. La mitoxantrone inhibe la synthèse et la réparation de l'ADN par blocage de la topoisomérase II (58). Son administration se fait par perfusion IV pendant au moins 30 minutes une fois par mois à une dose de 12 mg/m^2 de surface corporelle pendant 6 mois, sans dépasser une dose totale cumulée de 120mg en raison de sa cardiotoxicité dose-dépendante. La mitoxantrone diminue la fraction d'éjection du ventricule gauche et provoquerait une insuffisance cardiaque congestive dans respectivement 12% et 0.4% des cas (59). Avant de débuter le traitement, il faut éliminer un foyer infectieux en raison de son effet immunosuppresseur.

Une surveillance hématologique (suivi NFS) doit être réalisée tous les mois pendant le traitement puis tous les 3 mois pendant 5 ans, du fait d'un risque de leucémie myéloïde aiguë chez moins de 1 % des patients. C'est un médicament réservé à l'usage hospitalier et à prescription restreinte réservée aux neurologues, que ce soit pour la prescription initiale ou pour un renouvellement. Une surveillance cardiaque (ECG, échographie) doit être également effectuée tous les ans pendant 5 ans. Pendant ce traitement, une contraception doit être prescrite chez les hommes et les femmes en âge de procréer si nécessaire puisqu'il s'agit d'un médicament génotoxique à potentiel risque tératogène.

NATALIZUMAB ***(TYSABRI ®)***

Le natalizumab *(Tysabri ®)* est un anticorps monoclonal humanisé dirigé contre des molécules d'adhésion et plus précisément contre la sous-unité $\alpha 4$ de l'intégrine $\alpha 4\beta 1$ présente à la surface des lymphocytes activés. Le natalizumab bloque la fixation de l'intégrine $\alpha 4\beta 1$ avec les molécules d'adhésion exprimées à l'endothélium vasculaire. Ce blocage d'interaction moléculaire provoque une inhibition de la liaison des LT activés aux cellules endothéliales vasculaires et empêche la migration des LT à travers la barrière hémato-encéphalique vers le SNC. Une étude a montré que le natalizumab par rapport au placebo pouvait diminuer de 68% le taux de poussées et de 42% le risque de progression à 3 mois chez des patients atteints de la SEP-RR (60).

Son indication AMM est limitée en monothérapie aux patients présentant une forme très active et non répondeurs aux interférons, ou ceux ayant une forme rémittente-récurrente sévère d'évolution rapide définie par 2 poussées invalidantes au cours d'une année.

Avant l'instauration de ce traitement, il convient de s'assurer de l'absence d'immunodépression et de tuberculose. Son administration se fait en perfusion IV d'une heure toutes les 4 semaines à une posologie de 300mg. Pendant la perfusion, il doit être surveillé chez le patient l'apparition de frissons, de vomissements, d'allergie, et de troubles de la respiration.

L'utilisation de ce médicament peut être limitée par la survenue de la leucoencéphalopathie multifocale progressive (LEMP) accrue chez les patients ayant une sérologie démontrée positive au virus JC par test ELISA, un traitement par immunosuppresseur antérieur et dont la durée de traitement par natalizumab dépasse 2 ans. Cet évènement indésirable surviendrait chez 1 patient sur 1000 traité au-delà de deux ans. Son coût est d'environ 1636,85 € par perfusion, plus élevé que celui des traitements immunomodulateurs. Il s'agit d'un médicament en sus-GHS.

FINGOLIMOD (*GILENYA*®)

Le fingolimod (*Gilenya*®) disponible depuis 2012, est le premier traitement par VO de la SEP. C'est un modulateur des récepteurs à la sphingosine-1-phosphate (S1P), qui bloque certains lymphocytes hors de la circulation, dans les ganglions lymphatiques. Il dispose d'une AMM en monothérapie pour les formes très actives de SEP-RR malgré un traitement par interféron β ou d'évolution rapide avec plus de 2 poussées au cours d'une année. La posologie recommandée correspond à une gélule de 0.5 mg par jour par VO.

Après réévaluation de la balance bénéfice/risque ce médicament dispose de la mention « utilisation déconseillée » pour les patients ayant des blocs auriculo-ventriculaires (BAV), un allongement du QT, et pour ceux atteints de certaines pathologies cardiovasculaires. Des cas de LEMP, de lymphomes et d'infections opportunistes, et de carcinome ont été détectés après la prise du fingolimod. Le prix du *Gylenya*® est de 1727,85 € (28 gélules) et la spécialité est remboursable à 65% par la sécurité sociale.

DACLIZUMAB (*ZINBRYTA*®)

Le daclizumab (*Zinbryta*®) est un anticorps monoclonal recombinant humanisé ciblant la sous-unité CD25 du récepteur à l'interleukine-2 anormalement exprimée à la surface des LT dans la SEP. Il

inhibe l'activation des LT et empêche la production d'anticorps réactifs contre la myéline. C'est un traitement immunosuppresseur dont l'efficacité sur la diminution des poussées est supérieure par rapport au traitement interféron β1a (*Avonex*®), en revanche sa tolérance est moins bonne. L'indication concerne les patients adultes atteints de la SEP avec poussée incluant les formes SEP-RR, SEP-SP. La posologie recommandée est de 150mg une fois par mois en injection sous-cutanée. Un risque de toxicité hépatique a été relevé, un suivi de la fonction hépatique des patients traités est obligatoire. Une contre-indication à la prescription de ce médicament existe pour les patients avec des lésions hépatiques. Le prix par seringue préremplie ou stylo prérempli est de 1767€.

ALEMTUZUMAB (*CAMPATH®, LEMTRADA®*)

L'alemtuzumab est un anticorps monoclonal humanisé dirigé contre la glycoprotéine CD52 exprimée notamment à la surface des lymphocytes périphériques T et B. L'alemtuzumab est déjà utilisé dans le domaine de la cancérologie pour l'indication de la leucémie lymphoïde chronique à cellules B (LLC). Ces patients atteints de LLC présentent une surproduction de lymphocytes et l'alemtuzumab induit la mort cellulaire des LB. Alemtuzumab est un anticorps immunosuppresseur sélectif puisqu'il entraine une déplétion prolongée des lymphocytes T et B. L'AMM pour cette molécule a été obtenue récemment en France (2015) uniquement pour les formes sévères de SEP-RR en 2ème ou 3ème intention qui s'applique en cas de survenue de deux poussées invalidantes ou plus au cours d'une année, associée à au moins une lésion rehaussée par le Gadolinium en IRM ; malgré un traitement de 1ère ou 2ème ligne. Ce médicament peut exposer le patient à des réactions liées à la perfusion, à des risques d'affections auto-immunes (dysthyroïdie, purpuras thrombopéniques) et à des risques de cytopénies, de tumeurs malignes. La posologie du *Lemtrada*® recommandée est de 12 mg/j administrée en perfusion intraveineuse au cours de 2 cycles. Pendant le premier cycle, le *Lemtrada*® est administré pendant 5 jours à 12mg/j puis 12 mois plus tard débute le second cycle au cours duquel l'administration s'effectue pendant 3 jours consécutifs à 12mg/j. Du fait de ses effets indésirables,

ce médicament est réservé à l'usage hospitalier (63). Le prix monte à 10 653,5 € pour une ampoule injectable de 12mg.

Tableau I – Le prix des traitements de fond communiqué par le VIDAL et calculé pour 1 patient

Nom	Nombre d'unités par boîte	Prix d'une boîte	Posologie	Prix
Copaxone®	12	707 €	3 fois / semaine	9 218 €/an
Extavia®	15	759 €	1 fois tous les 2 jours	9 240 €/an
Betaferon®	15	832 €	1 fois tous les 2 jours	10 125 €/an
Avonex®	4	779 €	1 fois / semaine	10 159 €/an
Rebif®	12	796 €	3 fois /semaine	10 374 €/an
Aubagio®	28	830 €	1 fois / jour	10 818 €/an
GILENYA®	28	1 728 €	1 fois / jour	22524 €/an
Tecdifera®	56	949 €	2 fois / jour	12 368 €/an
Plegridy®	1	780 €	1 fois / 2 semaines	18 968 €/an
Tysabri®	1	1 637 €	1 fois / 4 semaines	19 915 €/an
Lemtrada®	1	10 654 €	1 fois / jour avec 1 cycle de 5 jours suivi d'un cycle de 3 jours	85 228 € pour les deux cycles

5.3 Traitements symptomatiques

L'objectif principal des traitements symptomatiques vise à améliorer la qualité de vie des malades en traitant les complications provoquées par la SEP en complément des traitements précédents.

- L'asthénie est un symptôme très fréquemment retrouvé à la suite d'une poussée, généralement diminué à la suite du traitement par corticoïdes de la poussée. Une adaptation du rythme de vie et le fractionnement des efforts peuvent permettre d'atténuer les fatigues chroniques. L'amantadine et la L-carnitine sont parfois prescrits hors AMM.
- Les troubles anxio-dépressifs sont pris en charge par psychothérapie et/ou relaxation en association avec un traitement antidépresseur (Inhibiteurs de la recapture de la sérotonine).

- La spasticité musculaire (raideur des membres) peut provoquer une incapacité motrice importante et causer des douleurs avec une perte d'autonomie du patient. Les traitements antispastiques par VO pour les spasticités diffuses sont le baclofène (*Lioresal*®), le dandrolène (*Dantrium*®), et le tizanidine (*Sirdalud*®) (ATU nominative). Pour les cas où la spasticité devient permanente rendant difficile la rééducation, le baclofène peut être administré en intrathécal par une pompe placée en sous cutané. Des injections de toxine botulique en IM peuvent être réalisées pour les spasticités focales avec un retentissement fonctionnel. L'instauration d'une kinésithérapie en parallèle de ces traitements médicamenteux permet également de lutter contre l'hypertonie. Cette spasticité peut déclencher des douleurs chez le patient mais n'est pas la seule cause des douleurs.

- En effet, deux autres types de douleurs existent dans la SEP. Tout d'abord, il y a les douleurs neurogènes liées à l'atteinte du SNC souvent associées aux poussées. La corticothérapie des poussées aide aussi à la prise en charge de ces douleurs.

  Ces douleurs peuvent s'exprimer par des sensations de décharges électriques (névralgies faciales) lors d'un simple frottement, de brûlures et de fourmillements. Les antidépresseurs tricycliques, les IRSN et les antiépileptiques peuvent être prescrits pour ces douleurs dites neuropathiques.

  Une autre catégorie de douleurs sont celles générées par le traitement de fond de la sclérose en plaques, qui ne doivent pas pour autant interrompre le traitement. Des maux de tête et une gêne musculaire liés au traitement de fond peuvent être soulagés par des antalgiques. L'injection de traitement de fond peut provoquer des douleurs qui peuvent être soulagées par des anesthésiques locaux, par le changement du site d'injection et par un massage au niveau du site d'injection (64).

- Les troubles de l'érection peuvent être améliorés par une prise en charge médicamenteuse : le sildénafil (*Viagra*®) et par un suivi sexologique.

- Des traitements anticholinergiques oraux sont prescrits en 1ère intention pour les hyperactivités vésicales tels que le chlorure de trospium, flavoxate, oxybutynine. Des alpha-

bloquants (Alfuzosine, Xatral®) peuvent être prescrits (hors AMM mais avec un avis positif de la HAS) pour les troubles sphinctériens en cas de résidus mictionnels.

- Pour des troubles de la marche sévères (EDSS>4), la fampridine *(Fampyra®)* est prescrite pour améliorer la récupération de la marche notamment après une poussée.

PARTIE 2 – PERSPECTIVES THERAPEUTIQUES

L'arsenal thérapeutique actuel de la SEP comporte essentiellement des traitements dont l'effet est de réduire l'activité du système immunitaire ou de bloquer l'entrée des cellules immunitaires dans le SNC. Plus de 30 molécules sont en cours d'essai clinique dans la SEP actuellement et sont axées sur une des deux catégories de stratégie thérapeutique :

Une stratégie vise comme les traitements actuels à influencer sur la réponse du système immunitaire par un effet immunosuppresseur ou immunomodulateur. L'enjeu de ces molécules est d'agir notamment plus spécifiquement pour améliorer la balance bénéfice/risque car même si les traitements actuels sont efficaces ils engendrent des effets indésirables plus moins sévères de la diarrhée à la LEMP.

La seconde stratégie, plus novatrice, pour laquelle aucune molécule n'existe actuellement sur le marché consiste à améliorer la remyélinisation.

Il existe une capacité de l'organisme à remyéliniser au niveau de certaines lésions mais qui s'épuise au cours de la maladie et cette stratégie nouvelle permettrait d'amplifier cette remyélinisation intrinsèque.

Nous aborderons dans cette deuxième partie de manière non exhaustive uniquement les molécules dont le développement en essai clinique est le plus avancé (phase II), et celles qui ont été médiatisées au cours des congrès 2016 et 2017 organisées par l'ARSEP. Ces molécules enrichiront peut-être l'arsenal thérapeutique futur chez les patients atteints soit des formes récurrentes-rémittentes ou progressives de la SEP. La majorité de ces molécules ont été regroupées dans le tableau en **Annexe 3**.

1. STRATEGIE IMMUNOMODULATRICE OU IMMUNOSUPPRESSIVE

L'intérêt de développer d'autres molécules immunomodulatrices ou immunosuppressives est multiple. Les traitements de fond sont déjà basés sur cette stratégie mais leur administration pourrait être rendue moins contraignante par le développement de formes orales avec une efficacité supérieure et une tolérance meilleure. La **Figure 10** met en évidence les cibles du système immunitaire utilisées par les molécules approuvées ainsi que celles visées par les molécules encore à l'étude.

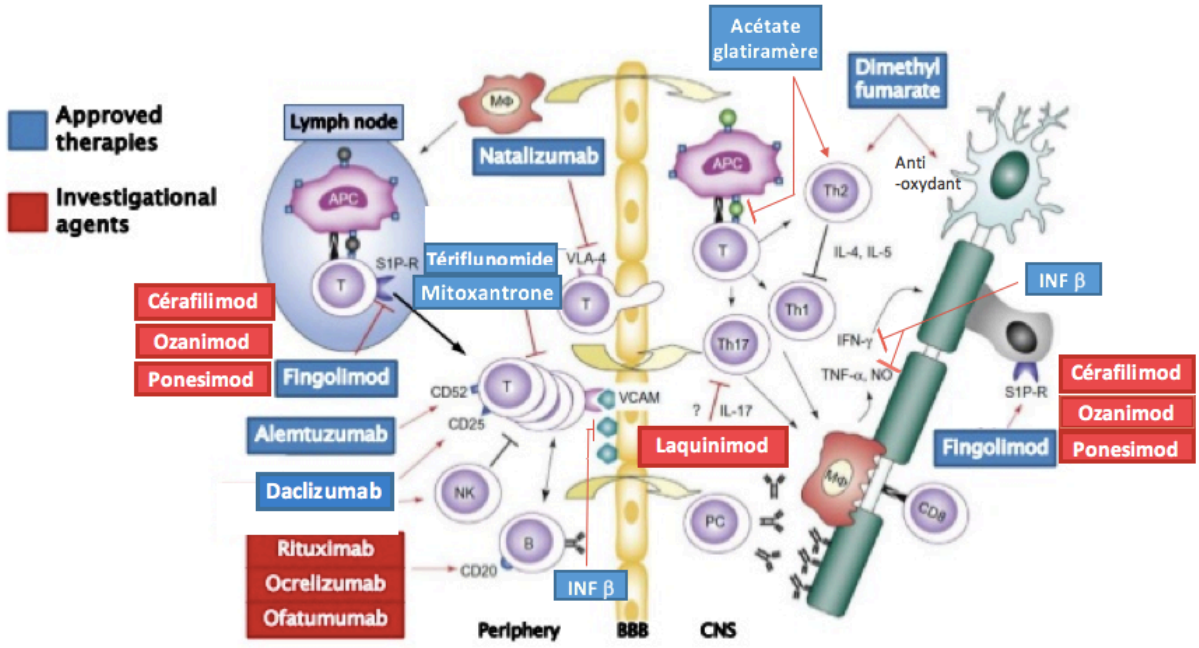


Figure 10 - Cibles du système immunitaire des molécules en cours de développement (en rouge) et celles ayant déjà obtenu une AMM pour le traitement de fond (en bleu) modifié d'après (65)

1.1 Anticorps anti-CD20

La déplétion des LB comme stratégie immunosuppressive est à l'étude avec le développement d'anticorps anti-CD20. Les LB présentent à la surface de leur membrane plasmique une protéine transmembranaire : CD20. Les anticorps anti-CD20 administrés s'attachent à cette protéine puis provoquent la phagocytose des LB et donc leur mort. Cette stratégie de déplétion permettrait d'empêcher le phénomène d'auto-immunité qui participerait à la destruction de la gaine de myéline dans la maladie. La mort des LB a aussi pour conséquence la réduction de cytokines proinflammatoires (TNFα et IL-6).

Plusieurs anticorps-anti CD20 ont été développés dont le Rituximab (*Rituxan®),* l'Ocrelizumab, et l'Ofatumumab.

Le **rituximab** est déjà utilisé dans les traitements de l'arthrite rhumatoïde, le lymphome non-Hodgkinien et chez des patients atteints de la SEP en Suède. Une étude rétrospective multicentrique menée en Suède incluant des patients (N= 822) SEP-RR et SEP-SP traités avec 500 ou 1000 mg de Rituximab (IV) tous les 6-12 mois a montré une diminution des lésions, un score pour l'EDSS inchangé pour les cas de SEP-RR et légèrement augmenté pour les patients SEP-SP et PP (66).

Une version d'anticorps humanisé du rituximab anti-CD20 a été développée, il s'agit de l'Ocrelizumab. Deux essais cliniques identiques OPERA 1 et OPERA 2 ont comparé **l'ocrelizumab** administré par perfusion en IV (600mg tous les 6 mois) à l'interferon β1a (*Rebif*®) injecté 3 fois par semaine en sous-cutané à 44μg. Ce médicament dispose en France d'une ATU. Les résultats des études ont montré que l'Ocrelizumab administré pendant 2 ans comparé à l'interféron β1a diminuait le taux de rechute annuel de 46-47%, réduisait la formation de nouvelles plaques démyélinisantes de 90%, et le risque de progression du handicap pendant 24 semaines consécutives de 43 et 37% dans OPERA 1 et 2 respectivement. Cette molécule aurait à la fois un effet dans la SEP-RR et dans la SEP-PP comme montré dans une 3ème étude ORATORIO. Les résultats de l'étude ORATORIO chez les patients SEP-PP ont révélé une diminution du volume de lésion de 3.4% chez les patients traités avec ocrelizumab contre une augmentation de 7.4% avec l'administration du placebo. La progression du handicap était ralentie chez les patients traités par l'ocrelizumab comparé au placebo chez 20 à 24% des cas. Les effets indésirables retrouvés le plus fréquemment avec l'ocrelizumab comparé au placebo étaient des réactions liées à la perfusion, des infections d'herpes buccales, et des infections de la trachée respiratoire supérieure (67).

De même que le Rituximab et l'Ocrelizumab, la cible de l'**ofatumumab** est le récepteur CD20, mais ce dernier anticorps se lie à un épitope différent. ofatumumab (*Arzerra*®) est déjà utilisé pour le traitement des leucémies lymphoïdes chroniques et ses effets indésirables sont déjà bien connus. Il peut survenir des réactions liées à la perfusion, des infections, une neutropénie et des problèmes respiratoires. Une étude de phase II a comparé l'effet d'Ofatumumab administré en sous-cutané par

rapport au placebo et a démontré une réduction significative du nombre de lésions dans le cerveau chez des patients atteints de la SEP-RR. Une étude clinique de phase III (ASCLEPIOS) est en cours, elle compare l'efficacité de l'ofatumumab administré en sous-cutané toutes les 4 semaines par rapport au tériflunomide administré quotidiennement par VO dans la forme rémittente de la SEP.

1.2 Les agonistes des récepteurs de la sphingosine phosphate (SP)

De nouveaux agonistes des récepteurs SP, plus sélectifs que le Fingolimod, sont actuellement à l'étude. Les effets indésirables du Fingolimod notamment sur le rythme cardiaque sont liés à sa non spécificité d'action puisqu'il module 4 des 5 récepteurs S1P (S1P1, 3, 4 et 5) (68). Les agents les plus sélectifs des récepteurs S1P en cours d'étude de phase I ou II sont les suivants : **ponesimod** (ACT128800), **siponimod** (BAF312), **ozanimod** (RPC1063), **cerafilimod** (ONO-4641), **GSK2018682** et **MT-1303**.

Pour exemple, le siponimod représenterait une thérapie potentielle pour les formes secondaires progressives de la sclérose en plaques. C'est une molécule agoniste de S1P1 et S1P5.

Les récepteurs SP1 se trouvent à la surface de certaines cellules immunitaires dont les LT CD4, CD8 et les LB impliquées dans la formation de lésions. La liaison du siponimod au récepteur SP1 empêcherait l'activation de ces cellules immunitaires et leur migration en dehors des tissus lymphatiques.

Les effets indésirables relevés dans une étude de phase II réalisée chez 252 patients sont : des maux de tête, un ralentissement du rythme cardiaque, des étourdissements, des infections nasales et de la gorge.

Une étude de phase III (EXPAND) est en cours chez 1651 patients pour démontrer l'efficacité du Siponimod comparée au placebo dans la forme secondaire progressive de la SEP. La posologie journalière du siponimod dans l'étude se fait en une seule prise progressive pendant 6 jours pour atteindre 2mg. Des résultats préliminaires de l'étude ont montré que le Siponimod diminue après 3 mois de traitement la progression du handicap par rapport au placebo en utilisant pour mesure l'EDSS (69)(79).

1.3 Autre immunomodulateur

Le **laquinimod** est un immunomodulateur administré par VO, qui induirait la production de cytokines anti-inflammatoires dans le SNC. La molécule entre passivement dans le SNC. Son action anti-inflammatoire passerait par une diminution de la transcription de gènes codant pour les molécules du CMH de classe II, par la stimulation de facteurs neurotrophiques, et par l'apoptose des LT CD8 et des LB.

Dans l'étude de phase III (ALLEGRO) menée chez des patients atteints de la SEP-RR, il a été montré que le laquinimod administré par VO en une seule prise de 0.6mg/jour entraine une réduction de 23% des rechutes, de 36% du risque de progression du handicap, une baisse de 37% des lésions et de 33% de l'atrophie cérébrale par rapport au placebo (70).

Une seconde étude de phase III (BRAVO) a comparé le Laquinimod (VO) à l'interféron β-1a : *Avonex*® (IM) et au placebo chez des patients SEP-RR (N=1331 patients). Dans cette étude, l'administration journalière du laquinimod (0.6mg) n'a pas diminué de façon significative le taux annualisé des poussées, cependant une tendance à la diminution a été relevée. Après un ajustement du seuil de l'activité de la maladie à l'IRM entre le groupe placebo et le groupe traité, l'étude a reporté une diminution du taux annualisé de poussées avec le laquinimod par rapport au placebo, une diminution de la progression de la maladie, et de l'atrophie cérébrale de 27,5%. A 3 mois, la progression du handicap était diminuée de 33.5% avec le laquinimod versus placebo, et de 29% avec l'IFN β-1a versus placebo. Les résultats d'une analyse statistique post hoc n'ont montré aucune différence des scores de l'EDSS et du taux annualisé de poussées entre le groupe laquinimod et le groupe IFN β-1a. Cependant, l'étude relève comme une différence significative sur l'atrophie cérébrale, diminuée de façon plus importante avec le laquinimod par rapport à l'IFN β-1a (71).

La tolérance du laquinimod était bonne et équivalente dans ces 2 études de phase III (71) (70). Le seul effet indésirable relevé dans les deux études est l'augmentation des enzymes hépatiques.

Dans l'arsenal thérapeutique actuel, il n'existe aucune molécule approuvée par les autorités compétentes (ANSM, EMA) qui cible spécifiquement et directement la remyélinisation et la protection des neurones dans la sclérose en plaques. De plus en plus de molécules en cours d'essai clinique sont axées sur une stratégie visant la réparation de la myéline et pourraient à terme élargir l'arsenal thérapeutique.

2. STRATEGIE REMYELINISANTE

Une remyélinisation spontanée est possible au niveau des lésions mais reste incomplète. Elle est variable d'un patient à l'autre et d'une lésion à l'autre pour un même patient donné. La réparation de la gaine de myéline endommagée permettrait de rétablir la conduction de l'influx nerveux.

Des pistes multiples existent pour améliorer cette remyélinisation.

Deux approches sont à l'étude pour réparer la myéline et consistent à :

- Favoriser la **remyélinisation spontanée**, dite « **endogène** »
- Favoriser la **remyélinisation** « **exogène** » par la **transplantation de cellules**

La remyélinisation endogène dépend des OPCs : les précurseurs des oligodendrocytes. En effet, ces cellules doivent se déplacer vers la lésion, proliférer, et se différencier en oligodendrocytes chargés de produire la gaine de myéline. L'amplification de facteurs activateurs de ces différentes étapes (motilité, prolifération, maturation, myélinisation) ou l'inhibition de facteurs qui les empêchent sont des candidats pour favoriser la remyélinisation endogène.

Une seconde stratégie vise à transplanter des cellules souches pour réparer la myéline et déclencher en quelque sorte une remyélinisation dite exogène.

2.1 La biotine

La biotine (ou **MD1003**) est une vitamine H et agit comme une coenzyme intervenant dans la synthèse des acides gras de la myéline. La biotine est capable d'augmenter l'apport énergétique des

neurones en jouant sur le cycle de Krebs cellulaire, ce qui préviendrait ou retarderait la dégénérescence (**Figure 11**).

Une étude pilote menée chez 23 patients présentant une SEP progressive (SEP-SP et SEP-PP) a montré que de fortes doses de biotine (100-300 mg/jour) pendant en moyenne 9 mois freinaient la progression de la maladie (72) .

Les résultats d'un essai clinique de phase III multicentrique randomisé en double aveugle contrôlé par placebo chez des cas de SEP progressive a constaté une diminution du handicap chez 12,6 % des patients traités après 9 mois. Ce résultat a été confirmé à 12 mois. Parmi ces patients, 76,9% ont amélioré leur score de l'EDSS et 15,4% le temps de marche sur 25 foot (TW25) (73). La spécialité *Qizenday* (VO) est un médicament contenant la biotine en ATU pour les formes progressives d'emblée et secondaire, l'AMM n'a pas encore été obtenue. La dose est de 300mg/j soit 100mg 3 fois par jour. Aucun effet indésirable majeur n'a été relevé dans les essais. La biotine prise à forte dose peut fausser des tests d'analyse biologique basés sur une interaction entre la biotine et la streptavidine, il s'agit des tests de dosages des hormones thyroïdiennes (T4,T3,TSH) (74).

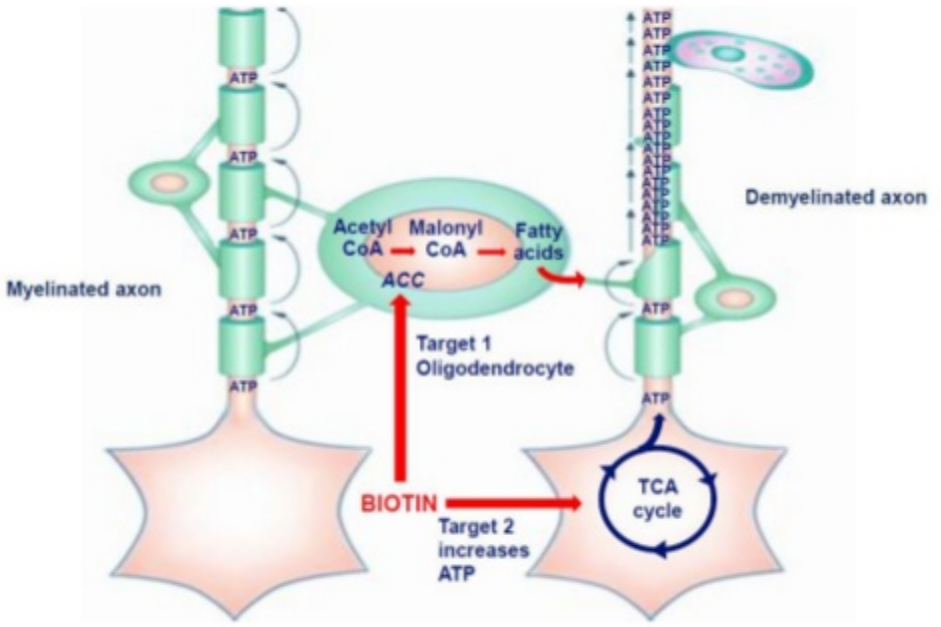


Figure 11 - Mécanismes d'action de la Biotine (75)

La biotine stimule une enzyme : l'Acétyl-coA-Carboxylase (ACC) (target 1) impliquée dans la synthèse des lipides de la myéline au niveau des oligodendrocytes (en vert). La deuxième cible de la biotine est le cycle de Krebs, en le stimulant la quantité d'ATP au niveau des neurones est augmentée ce qui préviendrait la neurodégénérescence.

2.2 Opicinumab

Le blocage d'une protéine inhibitrice de la remyélinisation appelé « LINGO » constituerait une des solutions possibles pour améliorer la remyélinisation. LINGO-1 est une protéine transmembranaire exprimée à la surface de la membrane plasmique des neurones, des oligodendrocytes, et absente des astrocytes. Lors d'évènements démyélinisants comme dans la SEP, cette protéine serait à nouveau synthétisée et surexprimée. Il a été montré qu'une surexpression de LINGO au niveau des oligodendrocytes et des axones inhiberait la différenciation des OPCs en oligodendrocytes (76) (77). L'**opicinumab** est un anticorps monoclonal humain dirigé contre la protéine LINGO. Les résultats d'une étude de phase II (SYNERGY) qui impliquaient 418 patients avec une SEP-RR ou SEP-SP n'ont pas réussi à démontrer d'amélioration clinique, ou cognitive de la maladie avec l'opicinumab par rapport au placebo. Les patients de cette étude recevaient soit l'interféron bêta 1a (Avonex), soit l'opicinumab ou soit le placebo. Une des raisons de l'échec de l'opicinumab serait liée à un passage difficile de l'anticorps à travers la barrière hématoencéphalique pour atteindre les zones de lésions du SNC.

2.3 Clémastine

La clémastine est un antihistaminique. En s'opposant aux effets de l'histamine, la clémastine supprime le système immunitaire, et pourrait réduire le dommage de la myéline dans la SEP.

Un essai clinique de phase II (ReBUILD) a été mené chez 50 patients ayant une névrite optique (démyélinisation du nerf optique) dans un contexte pathologique de SEP-RR. La moitié d'entre eux a reçu 4mg de Clémastine deux fois par jour pendant 3 mois puis le placebo leur a été administré à la place. L'autre moitié a reçu d'abord une administration du placebo pendant 3 mois et après le traitement Clémastine 4mg deux fois par jour. L'objectif de cette étude a été d'évaluer le potentiel de la clémastine à remyéliniser. Les résultats de l'étude ont démontré la réversibilité des lésions après traitement par la clémastine, ainsi qu'une amélioration de l'examen des potentiels évoqués visuels. La transmission de l'information visuelle a été plus rapide avec clémastine comparée au placebo. Aucune donnée IRM n'existe pour le moment (78).

2.4 GSK 239512

Les récepteurs de l'histamine H3, exprimés aux niveaux des neurones et des OPCs, seraient impliqués dans l'inhibition du processus de remyélinisation en bloquant la différenciation des OPCs. **GSK 239512** est un antagoniste sélectif du récepteur de l'histamine H3. *In vitro*, il a été montré grâce à un modèle de souris de remyélinisation induite par la cuprizone que le GSK 239512 pouvait promouvoir la différenciation des OPCs et améliorer la remyélinisation (79).

Une étude de phase II a été menée chez 153 patients atteints de la SEP-RR et recevant déjà l'IFN β ou l'acétate de glatiramère. Au cours de l'étude, les patients recevaient par VO soit le GSK 239512 entre 10µg et 80µg/jour ou le placebo. Les résultats ont révélé un effet positif sur les lésions détectées par le gadolinium mais ceci ne s'est pas traduit par des améliorations sur le plan clinique. L'augmentation de la durée de l'étude et un plus gros échantillonnage permettraient de mieux mettre en évidence un effet bénéfique sur l'évaluation clinique selon les conclusions de l'étude. Aucune différence majeure d'effet indésirable n'a été constatée entre GSK 239512 et le placebo. Seules des insomnies étaient plus fréquentes avec le traitement GSK 239512 (80).

2.5 rHIgM22

Il s'agit d'un anticorps monoclonal recombinant humain dirigé contre la myéline qui favoriserait la remyélinisation par un mécanisme encore inconnu (81). Des études de colocalisation ont montré que le rHIgM22 était capable de se lier aux lipides de la myéline, à une intégrine des OLs et de réduire de 10 fois les taux de caspases 3 et 9 impliquées dans l'apoptose cellulaire (82).

Dans un modèle de démyélinisation de la moelle épinière chez les souris, il a été montré que la remyélinisation se produit chez 59.7% des animaux traités par cet anticorps contre 15.8% chez le groupe contrôle non traité (82).

D'autres résultats d'une étude préclinique ont montré que le rHIgM22 accélérait la remyélinisation après la démyélinisation induite par la cuprizone au niveau d'une région précise du cerveau : le corps calleux. L'anticorps pourrait promouvoir la remyélinisation en stimulant la différenciation des OPCs en oligodendrocytes matures (83).

Une étude de phase 1 est en cours chez 30 patients atteints d'une SEP-RR juste après leurs poussées. Le passage de l'anticorps à travers la BHE pour atteindre le SNC ne semble pas un frein à l'étude en cours puisque la molécule a pu être détectée dans le LCR.

2.6 Anticorps anti-Sémaphorine 4D

Les sémaphorines sont une famille de protéines solubles et transmembranaires impliquées notamment dans l'activation et la migration des cellules immunitaires. La sémaphorine 4D est une protéine transmembranaire exprimée de façon prédominante au niveau des LT, des monocytes, des cellules présentatrices de l'antigène, des plaquettes et des oligodendrocytes. Après clivage de cette protéine, elle peut devenir soluble. Les deux formes solubles et transmembranaires sont biologiquement actives.

Les cascades de signalisation induites par la sémaphorine 4D provoquent une activation gliale, l'inhibition de la migration, différenciation des OPCs et une rupture des jonctions endothéliales de la BHE. Après une lésion, cette protéine serait surexprimée et provoquerait la mort des oligodendrocytes. Une piste potentielle thérapeutique serait donc d'inhiber la protéine sémaphorine 4D pour améliorer la remyélinisation. Des expériences menées *in vivo* chez un modèle EAE de démyélinisation a montré que l'inhibition par **VX15/2503** de la sémaphorine 4D provoquait la migration des OPCs au niveau des sites de lésions et préservait l'intégrité de la BHE ce qui est favorable à la remyélinisation (84).

Pour ce faire, un anticorps monoclonal humanisé (VX15/2503) de forte affinité pour la sémaphorine 4D a été évalué dans une étude clinique de phase I pour connaitre sa sécurité et sa tolérance. L'étude inclut 5 groupes de 10 patients pour lesquelles 5 doses différentes du traitement ont été étudiées (1,3, 6, 15, 20 mg/kg) (85). Le traitement VX15/2503 a été bien toléré dans l'étude aux différentes doses testées.

2.7 GNbAC1

Dans l'étiologie de la sclérose en plaques dans la 1ère partie de ce travail, il avait été mentionné une piste infectieuse impliquant un rétrovirus humain. En **Annexe 4**, il est rappelé le mécanisme hypothétique du déclenchement de la SEP par ce rétrovirus. La protéine de l'enveloppe de ce virus (MRSV-Env) représenterait une cible thérapeutique potentielle dans la SEP puisqu'elle aurait des propriétés pro-inflammatoires et qu'elle bloquerait la remyélinisation (86).

Un anticorps dirigé contre MRSV-Env (**GNbAC1**) a été développé dans le but de bloquer l'inflammation des plaques et d'améliorer la remyélinisation.

Des essais cliniques de phase II sont en cours (CHANGE-MS et ANGEL-MS) pour étudier à long terme l'effet de l'anticorps GNbAC1 sur le nombre de lésions démyélinisantes chez des patients atteints de la SEP-RR. Les résultats préliminaires de l'étude de phase II CHANGE devraient apparaitre au quatrième trimestre de l'année 2017.

2.8 Thérapies par cellules souches

Les cellules souches sont des cellules indifférenciées qui ont la capacité de se spécialiser en d'autres types cellulaires. L'intérêt de cette thérapie serait de remplacer les cellules neuronales détruites, d'augmenter le nombre d'oligodendrocytes matures responsables de la remyélinisation ou bien de rééduquer le système immunitaire.

Deux types de cellules souches sont actuellement à l'étude pour être utilisées dans la sclérose en plaques : les cellules souches hématopoïétiques et les cellules souches mésenchymateuses.

Les **cellules souches hématopoïétiques** sont des cellules souches adultes situées dans la moelle osseuse (MO) et le sang. L'objectif de cette thérapie est de « reprogrammer » le système immunitaire des patients, et donc de prévenir la destruction de la gaine de myéline. Cette stratégie est à l'étude pour des cas de SEP-RR très actives pour réduire l'inflammation du SNC. La procédure de cette thérapie par CSH nécessite dans un premier temps une ablation du système immunitaire (myéloablatif) par un traitement immunosuppresseur pour libérer les cellules souches dans le sang. Puis, une prise de sang permettra de prélever les cellules souches qui seront ensuite triées par rapport

aux autres cellules présentes dans l'échantillon sanguin. Dans un dernier temps, les cellules souches sont réinjectées aux patients. Une fois transplantées les CSH vont se différencier en cellules immunitaires moins actives qui n'auront plus d'effet auto-immun comme c'est le cas dans la SEP.

Dans l'essai clinique de phase II (HALT-MS) menée sur 5 ans, ont été inclus 26 patients atteints de la forme récurrente-rémittente avec des rechutes sévères, fréquentes et des lésions neurologiques étendues. Les patients de l'étude ont d'abord reçu une immunothérapie à forte dose avant la greffe de cellules souches hématopoïétiques autologues (prélevées sur le patient lui-même). L'essai HALT-MS a conclu à l'absence de progression du handicap, de rechute des symptômes ou de nouvelles lésions cérébrales chez 69% des patients traités (87). Une publication a reporté que la mortalité évaluée chez 281 patients atteints majoritairement de formes progressives était de 2.8% 100 jours après la transplantation. Cette mortalité est favorisée par le contexte myéloablatif de cette thérapie (88).

Les traitements développés par des cellules souches non myéloablatifs sont explorés pour améliorer directement la remyélinisation. Les **cellules souches mésenchymateuses** (CSM) se trouvent au niveau de nombreux tissus de l'organisme (MO, peau, graisse). Dans un modèle de démyélinisation EAE, il a été montré *in vivo* que ces cellules souches peuvent inhiber la prolifération des cellules T. L'hypothèse de leur mécanisme d'action repose sur la capacité probable des CSM de se différencier dans le SNC en neurone et pourraient promouvoir la réparation endogène en recrutant les précurseurs neuronaux.

L'injection de CSM a déjà été réalisée par voies IV et intrathécal.

Une étude a été menée chez 10 patients atteints d'une SEP-SP avec des dommages de la vision. Après une seule administration par perfusion intraveineuse de cellules mésenchymateuses autologues dérivées de la moelle osseuse, l'acuité visuelle aurait été améliorée. Un patient de l'étude avait développé un rash après le traitement et deux patients ont contracté des infections bactériennes après 3-4 semaines de traitement (89). Dans cette thérapie à l'étude, il reste des interrogations quant à la capacité des CSM à migrer jusqu'au SNC et au suivi de leur distribution au niveau de l'organisme chez l'homme (90).

Comme le mentionne l'ARSEP, la priorité de la thérapie cellulaire doit concerner en premier les formes de SEP qui ne répondent pas aux traitements actuels (91).

Chez les patients atteints de la SEP, il a été observé depuis longtemps l'existence d'une réparation possible mais incomplète des plaques démyélinisantes (**Annexe 5)**. Actuellement, il n'existe pas d'explication précise et unique expliquant l'échec de la remyélinisation dans la sclérose en plaques. L'utilisation de modèles animaux de remyélinisation permet de mieux comprendre ce processus de réparation de la gaine de myéline qui échoue dans la sclérose en plaques. Par exemple, des voies intrinsèques de signalisation cellulaire ont été mises en évidence pour améliorer la remyélinisation en plus de Lingo détaillé précédemment telles que : Wnt/Beta-caténine, les récepteurs gama, Notch1/Jagged. Des facteurs de croissance pourraient également favoriser la remyélinisation, néanmoins peu d'études thérapeutiques sont en cours pour cette voie puisque le passage des facteurs de croissance à travers la BHE pour atteindre le SNC est difficile.

La compréhension et l'identification des mécanismes qui gouvernent la remyélinisation et les raisons de sa partialité dans la SEP permettront peut-être de découvrir de nouvelles cibles dans la SEP et par conséquent de nouvelles molécules thérapeutiques.

Après avoir décrit les pistes thérapeutiques en cours de développement clinique, nous aborderons dans une 3ème partie le travail d'un projet de recherche sur la remyélinisation mené au sein de l**'équipe Physiologie des cellules NG2** à l'**Université Paris Descartes** dans le cadre de mon master 2 Recherche « Signalisation Cellulaire et Neurosciences » à l'Université de Paris Saclay.

Ce travail porte sur **l'étude de la signalisation calcique dans les cellules de la lignée oligodendrocytaire au cours des différentes périodes d'une remyélinisation** complète au niveau du corps calleux chez la souris. Nous nous sommes demandés au cours de cette étude si les signaux calciques observés au cours de la remyélinisation dans les OPCs et OLs étaient dépendants de l'activité neuronale, comme c'est le cas pour la myélinisation, et s'ils différaient en fonction des périodes de la remyélinisation.

PARTIE 3 - ETUDE D'UNE CIBLE POTENTIELLE POUR AMELIORER LA REMYELINISATION : LA SIGNALISATION CALCIQUE DES CELLULES OLIGODENDROGLIALES

INTRODUCTION

Les cellules gliales du SNC représenteraient environ 65% des cellules chez un cerveau adulte de souris contre 90% chez l'homme (92). Plusieurs types de cellules gliales ont été décrits dont les principaux sont les astrocytes, les cellules microgliales, les **oligodendrocytes** (**OLs**), les **précurseurs des oligodendrocytes** (**OPCs** ou cellules NG2).

1. La myélinisation

1.1 La lignée oligodendrogliale

Comme vu dans la première partie de cette thèse, les oligodendrocytes sont un type de cellules gliales responsables de la myélinisation du SNC et de la remyélinisation en condition pathologique dans la sclérose en plaques. Ils sont générés à partir des OPCs très abondants au niveau du SNC à la naissance comme à l'âge adulte (93) (94).

Les précurseurs des oligodendrocytes du SNC ont été identifiés pour la première fois au début des années 80 (95), (96). Lors de leur découverte, ils étaient considérés comme un sous-type astrocytaire de par leur ressemblance morphologique stellaire avec un petit soma. Cependant, à la différence des astrocytes, les OPCs n'expriment pas la GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein) ce qui permet de les distinguer. Ces cellules sont présentes à la fois dans la substance grise et la substance blanche. Elles représentent entre 2 et 8% des cellules en fonction de la région du système nerveux à l'âge adulte (97).

Ces OPCs sont aussi nommées **cellules NG2-positives** (Nerve Glial antigen 2) en raison de la présence à leur membrane plasmique du protéoglycane NG2. La reconnaissance des OPCs est

possible par différents marquages reconnaissant la nestine (forme polysialilée de la NCAM), le récepteur du PDGF-α (Platelet Derived Growth Factor-α), antigène de la famille des gangliosides (GD3), ou le protéoglycane NG2. Seul le marquage PDGFR-α est véritablement spécifique des OPCs.

L'intérêt porté aux OPCs est lié à leur capacité de générer des oligodendrocytes matures capables de myéliniser plusieurs axones à la fois. Pour y parvenir, le processus est le suivant : les OPCs prolifèrent puis se différencient en pré-oligodendrocytes qui à leur tour deviennent des oligodendrocytes matures (**Figure 12**).

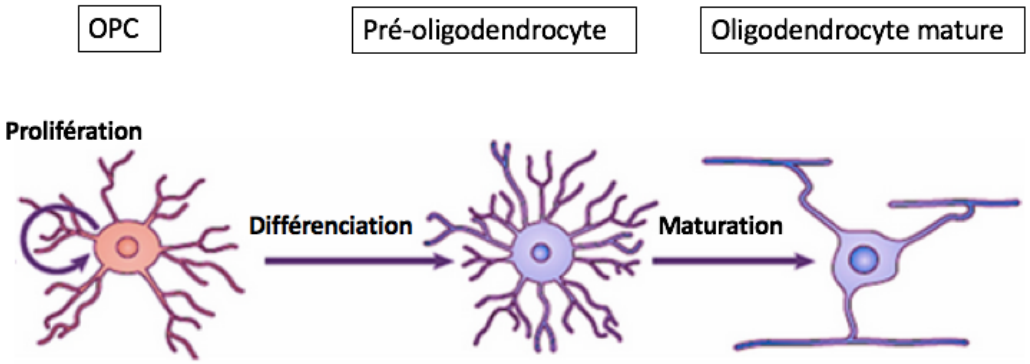


Figure 12 - Les étapes de prolifération, différentiation des OPCs et de maturation des pré-oligodendrocytes (7)

Certaines études menées *in vitro* sur cultures cellulaires extraites du nerf optique contredisent ce dogme du devenir des OPCs en oligodendrocytes matures. En effet, une capacité multipotente de ces cellules a été mise en évidence. Les OPCs seraient capables de redevenir des cellules souches multipotentes, et de régénérer soit des neurones, astrocytes ou des oligodendrocytes en fonction des facteurs extracellulaires (93). En utilisant des expériences de traçage cellulaire sur des souris transgéniques, il a été démontré que les OPCs peuvent générer des astrocytes au cours du développement dans certaines régions spécifiques du cerveau (99). La possibilité de générer des neurones à partir de ces cellules est encore débattue (94).

1.2 Influence de l'activité neuronale dans la myélinisation

Depuis une vingtaine d'années, une relation a été émise entre l'activité neuronale, le développement des OPCs et la myélinisation (100). Cette activité neuronale affecterait à la fois la prolifération et la différenciation des OPCs ainsi que la production de myéline.

Ce postulat a été déjà évoqué en 1986 par Macklin et al., en travaillant sur une co-culture neurones-OPCs. Une augmentation de la quantité d'ARNm de protéolipides de la myéline a été observée par comparaison à une culture d'OPCs sans neurone (101). De même, un peu plus tard Demerens et al. (1996), démontre également l'impact de l'activité électrique des axones sur la myélinogénèse (nombre d'oligodendrocytes myélinisants) en inhibant les potentiels d'action par des neurotoxines (TTX, α-scorpin toxin) (102). Récemment, il a été révélé que la stimulation des neurones glutamatergiques du cortex pré-moteur par une technique *in vivo* d'optogénétique favoriserait la prolifération des OPCs ainsi que l'oligodendrogénèse et la production de myéline (103).

Plusieurs publications ont reporté que les neurones déchargeant le plus ont tendance à être plus myélinisés (104) (105) (106).

L'impact de l'activité neuronale sur la myélinisation pourrait aussi être mentionné chez l'homme. Par exemple, après une tâche d'apprentissage répétée (pratique du piano, jonglage), une augmentation de la matière blanche a été observée à l'IRM (107). Cette augmentation de matière blanche pourrait être en lien soit avec de la myéline nouvellement formée sur des connexions entre neurones préexistants ou bien liée au développement de nouveaux réseaux neuronaux qui nécessitent d'être myélinisés.

De même chez la souris, l'apprentissage d'une nouvelle tâche motrice comme celle de courir sur une roue complexe augmenterait la myéline du cortex moteur (108).

Dans les années 2000, une communication synaptique a été découverte entre les OPCs et neurones de type gabaergique et glutamatergique (109)(110). Les OPCs seraient les seules cellules gliales du SNC capables d'avoir des contacts synaptiques avec les neurones. La communication synaptique

entre les cellules neuronales pré-synaptiques et les OPCs post-synaptiques jouerait un rôle dans la régulation des étapes de la myélinisation.

Le rôle de ces synapses reste à élucider. Certaines publications émettent l'idée que ces synapses peuvent influencer la prolifération des OPCs lors de la myélinisation physiologique (111) ainsi que lors de la remyélinisation à la suite d'une démyélinisation (112). Ces synapses sont perdues après la différenciation des OPCs en pré-oligodendrocytes (113). Alors que les neurones sont capables d'avoir des contacts synaptiques avec les OPCs, une publication de l'équipe « Physiologie des cellules NG2 » de l'université de Paris Descartes montre qu'elles ne seraient pas primordiales pendant la prolifération des OPCs se déroulant après une lésion démyélinisante (112). La myélinisation s'effectuerait également selon une communication extrasynaptique par le biais d'un relargage extrasynaptique de vésicules glutamatergiques par les neurones les plus actifs (112).

Ainsi, il est connu à ce jour que l'activité neuronale impacte la myélinisation. Cependant, la façon dont les neurones et OPCs communiquent pour influencer la myélinisation reste peu connue. Les potentiels d'action des neurones sont capables d'évoquer une variation calcique transitoire dans les OPCs (114) (115) (116). La signalisation calcique des OPCs et des oligodendrocytes pourrait donc constituer un mécanisme permettant de traduire l'activité neuronale en myélinisation. La prochaine partie abordera les voies d'entrée calcique au sein des cellules de la lignée oligodendrocytaire en réponse à l'activité neuronale et élucidera quel rôle joue le calcium dans le processus de myélinisation.

1.3 La signalisation calcique de la lignée oligodendrogliale au cours de la myélinisation

1.3.1 Les voies d'entrée du calcium dans la lignée des oligodendrocytes

Les cellules de la lignée oligodendrocytaire (OPCs et OLs) expriment un grand nombre de récepteurs sensibles aux neurotransmetteurs, et de canaux ioniques ou voltage-dépendants. Leur activation peut être influencée par l'activité neuronale et provoquer des variations de potentiels de la membrane plasmique des cellules de la lignée oligodendrocytaire.

Il existe **quatre voies principales d'entrée du calcium** extracellulaire dans la lignée des oligodendrocytes (**Figure 13**). **Une voie intrinsèque** peut également augmenter le calcium cytoplasmique à partir du relargage des organites (réticulum endoplasmique et mitochondrie).

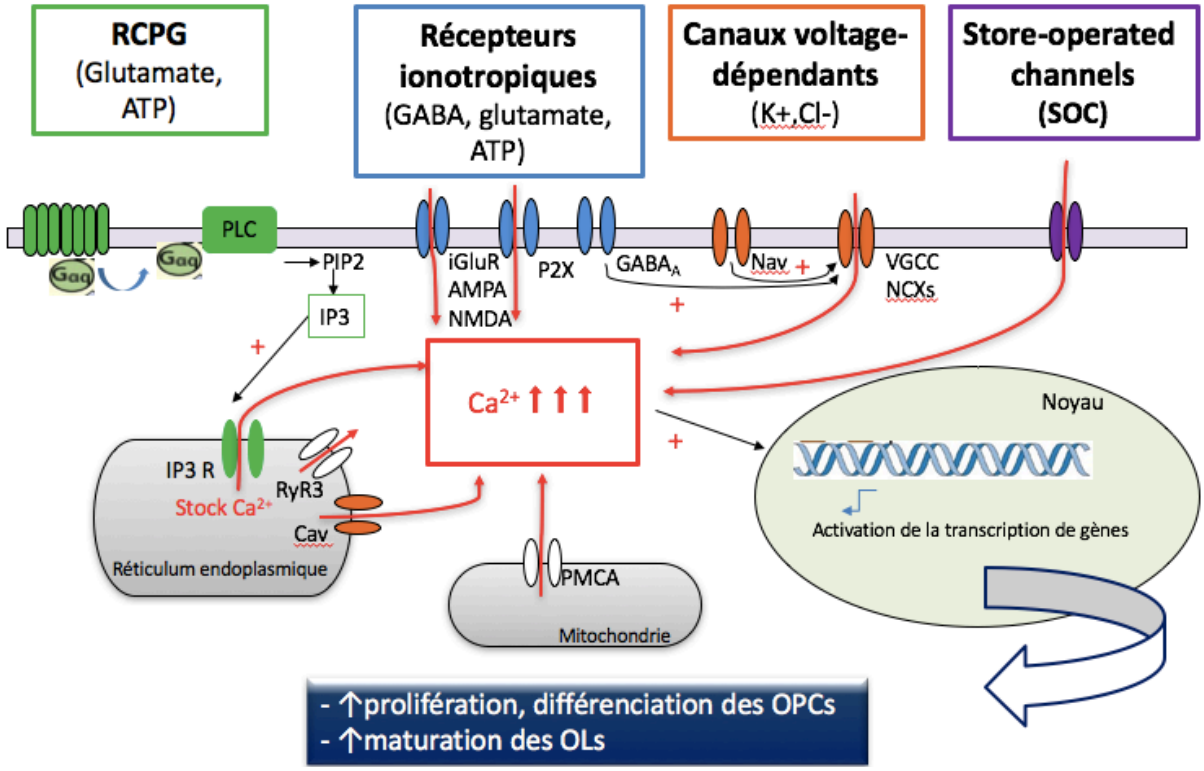


Figure 13 - Les différentes voies capables d'augmenter le calcium au niveau des cellules de la lignée oligodendrogliale influencées par l'activité neuronale

1.3.2 Les récepteurs métabotropiques du glutamate et de l'ATP

Les OPCs expriment des récepteurs métabotropiques du glutamate (GluRm). Ces récepteurs couplés aux protéines G sont activés après fixation du glutamate libéré par les neurones (ou les astrocytes). Puis, ils induisent la production d'IP3 qui à son tour, provoque la libération du calcium à partir des réservoirs du réticulum endoplasmique. Parmi ces récepteurs, les GluRm5 du groupe I ont été mis en évidence en plus grande proportion chez les OPCs que chez les OLs (117).

Les GluRms seraient impliqués dans la transduction locale de la MBP en réponse au glutamate (116). De plus, leur activation induirait une augmentation de l'expression des récepteurs NMDA très perméable au calcium (118). L'augmentation du calcium intracellulaire déclenche les voies de signalisation pour réguler le gène codant pour les canaux AMPA.

Les récepteurs métabotropiques de l'ATP (P2Y) seraient à la fois à l'origine de l'induction de la migration des OPCs et de l'inhibition de la prolifération (119). L'ATP a plus d'affinité pour les P2Y que les P2X ionotropiques. Ainsi, il a été proposé que l'ATP a seulement un effet sur la migration dans des conditions pathologiques.

1.3.3 Les récepteurs-ligands ou ionotropiques de l'ATP, GABA, glutamate

Les récepteurs NMDA sont très perméables au calcium et seraient détectés seulement chez 20% des OPCs (120) (121) . Le blocage de ces récepteurs provoque une diminution du calcium intracellulaire et une diminution de l'expression de la MBP (116). Les OPCs expriment de manière plus importante que les OLs les récepteurs AMPA. Ces récepteurs AMPA peuvent être activés grâce aux synapses glutamatergiques et sont perméables au calcium mais moins que les NMDA (109) .

D'autres récepteurs ionotropiques ont été mis en évidence tels que les récepteurs $GABA_A$ (122) et nicotiniques de type α_7 (123). L'ouverture des récepteurs $GABA_A$ entraine un efflux de chlore au niveau des OPCs et peut provoquer une dépolarisation à leur membrane plasmique (122). Il s'en suit une activation possible de canaux calciques voltage-dépendants (VGCCs), des échangeurs sodium-calcium qui sont perméables au calcium (117). En revanche les récepteurs nicotiques α_7 sont très perméable au sodium, potassium et un peu au calcium.

1.3.4 Canaux calciques voltage-dépendants

Les canaux calciques voltage-dépendants sont perméables au calcium après leur ouverture provoquée par une variation de potentiel membranaire (124). Ces canaux sont très exprimés au niveau des OPCs, après leur différenciation en oligodendrocytes leur expression diminue (125). Les OPCs expriment majoritairement l'isoforme de type L : Cav 1.2 (126) et Cav 1.3 ainsi que des canaux de type T (115). La délétion Cav 1.2 au niveau des OPCs a montré une diminution de la capacité des OPCs à proliférer et se différentier en OL (126).

Le gène de la protéine basique de la myéline (MBP) code pour les protéines classiques MBP et pour les protéines golli. Ces protéines golli sont des apparentés structurelles de la MBP à la différence qu'elles ne font pas parties de la composition de la myéline. Par ailleurs, il a été montré que les

protéines Golli sont capables de moduler l'activité des canaux calciques voltage-dépendants, et d'augmenter le calcium intracellulaire pour stimuler la prolifération des OPCs (127). Ces protéines Golli seraient capables de stimuler la prolifération et la différenciation des OPCs au cours de la remyélinisation déclenchée après la démyélinisation induite par la cuprizone au niveau du corps calleux chez la Souris (128). L'effet des protéines Golli sur la remyélinisation est supposé être médié par un influx de calcium.

1.3.5 Store-operated calcium channels (SOCCs)

Les SOCCs représentent une autre source d'entrée calcique au sein des OPCs. De même que pour les canaux calciques voltage-dépendants, les protéines Golli réguleraient les SOCCs, et influenceraient les processus d'extension et de migration des OPCs (129).

Ainsi, le calcium intracellulaire serait un régulateur de la myélinisation. En effet, il est connu pour être un messager secondaire intracellulaire, capable d'activer de nombreuses voies de signalisation (ERK, Fyn kinase, MAPK). Cela aboutit à l'activation de la transcription de plusieurs gènes (ex: gènes de la MBP, proteines du cytosquelette) importants pour la prolifération, différenciation des OPCs, pour la maturation des OLs et pour la production de myéline (124). L'élévation du calcium intracellulaire dans la lignée oligodendrocytaire pourrait être déclenchée par une communication neurone-OPC (130).

1.4 Mesure du calcium dans la lignée des oligodendrocytes

De manière générale, la mesure directe du calcium libre dans les cellules est permise par deux types d'indicateurs calciques : ceux de nature synthétique (chimique) et ceux de nature protéique ou GECI (Genetically Encoded Calcium Indicators) dont les plus connues sont les GCaMP (131). Tous ces marqueurs se fixent uniquement au calcium intracellulaire libre et non pas au calcium lié à d'autres protéines cytosoliques. Ils jouent un rôle de tampon calcique exogène. Ceux de faible affinité pour le calcium présentent une meilleure cinétique que ceux de très forte affinité.

L'inconvénient des marqueurs calciques synthétiques est leur faible durée de vie, leur non spécificité cellulaire et la difficulté d'établir des enregistrements sur plusieurs jours.

Les GECI permettent de s'affranchir des problèmes rencontrés avec les marqueurs synthétiques, et d'avoir une expression plus ciblée, moins toxique et une bonne répétabilité de la mesure. Les GECI dérivent d'une GFP modifiée. Elles sont composées d'une EGFP (Enhanced Fluorescent Green Protein) liée d'un côté à la protéine calmoduline (CaM) et d'un autre côté au peptide M13, une séquence peptidique de la chaine légère de la myosine kinase (**Annexe 6**). La CaM est la partie du marqueur sensible aux variations calciques, capable de lier 4 molécules de calcium et de provoquer un changement structurel entre M13 et CaM.

2. La remyélinisation

Actuellement, même si de nombreuses connaissances existent sur le rôle du calcium intracellulaire des OPCs dans les différentes étapes du développement des OPCs en OLs et dans la myélinisation, peu le sont dans des conditions pathologiques de la myéline comme dans la sclérose en plaques.

2.1 La sclérose en plaques : Un exemple pathologique de remyélinisation incomplète

L'analyse de tissus *post-mortem* de patients SEP a mis en évidence une remyélinisation possible mais incomplète aux niveaux de certaines plaques (132) (**Annexe 3**). Les précurseurs des oligodendrocytes (OPCs) constituent une source principale d'OLs capable de réparer les défauts de myéline. Dans des modèles de démyélinisation chez la Souris, il a été montré que les OPCs peuvent produire de nouveaux oligodendrocytes matures capables de remyéliniser les axones démyélinisés (100).

Ce processus de remyélinisation consistant à réparer des défauts de myéline est aussi observé chez l'homme. Une publication récente montre par l'étude de tissus *postmortem* de patients que la remyélinisation est plus importante au niveau des lésions de la matière blanche comparées à celles de la matière grise (133).

Une des cibles thérapeutiques potentielles vise à améliorer la remyélinisation spontanée. La signalisation calcique pourrait représenter une voie importante pour améliorer la remyélinisation, mais son rôle dans la remyélinisation reste peu connu contrairement à la myélinisation.

2.2 Etudes préliminaires du laboratoire

Une étude récente du laboratoire a utilisé le modèle de remyélinisation induit par l'injection de lysolécithine (ou LPC) dans le corps calleux de Souris (112). Ce modèle présente l'avantage de récapituler en une trentaine de jours toutes les étapes de démyélinisation et remyélinisation observées dans certains cas pathologiques (**Figure 14**). Lors des deux jours qui suivent l'injection de LPC, nous observons une démyélinisation de la région, suivi d'un recrutement et d'une prolifération massive des OPCs entre le 3ème et le 7ème jour. Enfin, une différenciation massive est observée au 14ème jour ; celle-ci est suivie d'une remyélinisation qui s'opère environ 30 jours après l'injection de LPC (**Figure 14**). L'équipe a montré qu'après la démyélinisation du corps calleux, la communication synaptique axone-OPC était modifiée au cours de la remyélinisation (112). En effet, une forte diminution des synapses axone-OPC est observée 4 jours après injection de LPC, au moment de la forte prolifération des OPCs. Puis, après cette prolifération massive, les OPCs forment à nouveau des synapses.

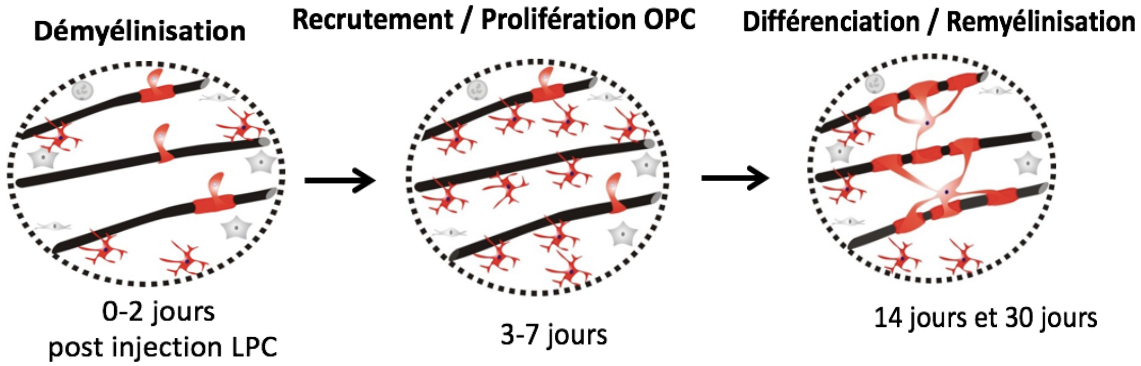


Figure 14 – Les étapes de la remyélinisation au cours du temps

1- La **démyélinisation** des axones est induite après l'injection de la lysolécithine. Cette étape dure 2 jours.

2- Le **recrutement et la prolifération** des OPCs se déroule entre le 3ème et 7ème jour après l'injection de la lysolécithine.

3- La **différenciation** des OPCs en OLs a lieu au 14ème jour et la **remyélinisation** complète des axones au 30ème jours après l'injection de l'agent démyélinisant (LPC).

OBJECTIFS ET HYPOTHESES

L'objectif principal de mon travail de recherche a été d'étudier les mécanismes responsables de la signalisation calcique dans les OPCs et les OLs aux différentes étapes de la remyélinisation (prolifération, différenciation).

En effet, il est déjà connu que la myélinisation est dépendante de l'activité neuronale. Cette activité neuronale entraine des variations calciques à l'intérieur des cellules de la lignée oligodendrogliale à travers différents canaux et récepteurs présents à leur membrane (134). Cependant, l'existence de cette signalisation calcique au cours de la remyélinisation n'est pas connue.

Notre **hypothèse principale** propose donc que **la signalisation calcique des cellules oligodendrogliales serait dépendante de l'activité neuronale et qu'elle diffèrerait en fonction des phases de la remyélinisation : entre la prolifération et la différenciation des OPCs en OLs.**

Pour répondre à l'hypothèse, nous avons étudié la signalisation calcique de l'oligodendroglie pendant la phase de prolifération des OPCs (3-5 jours post injection) et de différentiation en OLs (13-14 jours post injection) dans notre modèle de remyélinisation induit après la démyélinisation par injection de LPC au niveau du corps calleux chez la souris adulte. Les évènements calciques intracellulaires ont été détectés grâce à l'utilisation du marqueur GCaMP3 à différents stades de la remyélinisation sur des tranches aiguës de corps calleux à 3-5 jours après injection (phase de prolifération des OPCs) et à 13-14 jours après injection (phase de différenciation des OPCs).

MATERIELS ET METHODES

1. Animaux

Le laboratoire utilise des Souris génétiquement modifiées pour exprimer le marqueur calcique au niveau du lignage oligodendrocytaire grâce à un système Cre/lox. Ces Souris ont été générées à partir de deux lignées génétiquement modifiées : NG2-Cre$^{ERT2(+/-)}$ (135) et GCaMP3 $^{lox/lox}$ (136).

Chez ces Souris, l'expression du marqueur calcique protéique, GCaMP3, permet d'étudier la signalisation calcique dans les cellules de la lignée des oligodendrocytes. Son expression n'est pas constitutive, elle est spécifiée au niveau des cellules exprimant la protéine NG2 (OPCs, péricytes, microglie activée) grâce à une cassette STOP floxée, insérée en amont de son gène. La recombinaison de la GCaMP3 requiert l'activation de l'enzyme Cre recombinase capable d'exciser la cassette stop, une fois que sa translocation vers le noyau se produit après fixation du tamoxifène. En effet, les Souris sont injectées au tamoxifène (1mg) pendant 3 jours consécutifs en intrapéritonéal. Pour ce faire, une solution stock de tamoxifène (SigmaT5648) est préparée à une concentration de 10mg/ml dans Mygliol 812 (triglycérides) sous hotte chimique.

Pour toutes les expériences, nous avons utilisé des Souris adultes mâles et femelles âgées entre 45 et 65 jours et élevées dans des conditions standards. La myélinisation du corps calleux se déroule de façon très importante entre le 14ème et 45ème jours *post natal* où 13,5% (IC : 2,9%) des axones sont myélinisés. La myélinisation continuerait au-dessus du 240ème jours *post natal* où 28,2% (IC : 2,6%) des axones seraient myélinisés (137). L'avantage de travailler sur le corps calleux est de repérer facilement la lésion. Les procédures expérimentales ont été approuvées par le comité d'éthique de l'Université Paris-Descartes.

2. Modèle de remyélinisation spontanée

Une démyélinisation est induite par l'injection *in vivo* de lysolécithine (LPC, L-α-lysophosphatidylcholine, Sigma Aldrich L4129) chez les souris adultes NG2-Cre$^{ERT2(+/-)}$; GCaMP3$^{lox/lox}$ de chaque côté du corps calleux (**Figure 15**). A la suite de la démyélinisation, une remyélinisation spontanée s'ensuit ce qui nous permet d'étudier les différentes étapes pour aboutir à la remyélinisation. Ce modèle de démyélinisation induit par le LPC est très couramment utilisé et bien établi au sein du laboratoire (112). Le mécanisme d'action du LPC n'est pas complètement élucidé. Cependant, le LPC serait toxique pour les oligodendrocytes matures par sa forte affinité pour la MBP (myelin binding protein) et pour les lipides spécifiques de la myéline (138). Le LPC injecté induit une démyélinisation locale inflammatoire au niveau du corps calleux en activant les macrophages et donc la phagocytose de la myéline présente à la membrane des oligodendrocytes (139).

Par une méthode chirurgicale stéréotaxique, l'animal est anesthésié en intrapéritonéal par une solution de Kétamine 0.01mg/g (Virbac) et Xylazine 2% 0.01mg/g (Rompun, Bayer) dans du tampon phosphate salin (PBS). Une fois anesthésié et placé dans l'appareil stéréotaxique, nous injectons 1.2µL d'une solution à 1% de LPC dilué dans une solution de tampon phosphate (**Figure 15**).

Les coordonnées d'injection dans le corps calleux droit et gauche sont calculées à partir du Bregma qui est un point d'intersection entre les sutures coronales et sagittales de la boite crânienne (**Figure 15-C**).

Les coordonnées d'injection de l'agent démyélinisant (LPC) par rapport au bregma sont de : 1mm en latéral, 1.5 mm en rostral et 1.8mm en profondeur par rapport à la surface du cortex cérébral. En fonction de ces coordonnées calculés, deux ouvertures sont réalisées au niveau de la boite crânienne afin d'introduire jusqu'au corps calleux la micropipette d'injection en verre. L'injection comporte plusieurs étapes. Pour chaque côté du corps calleux, 2 injections consécutives de 0.6 µl de LPC (1%) sont réalisées en attendant 5 minutes entre chaque, le temps que le LPC se répande correctement au sein du corps calleux et pour que la pression exercée lors de l'injection ne soit pas trop grande.

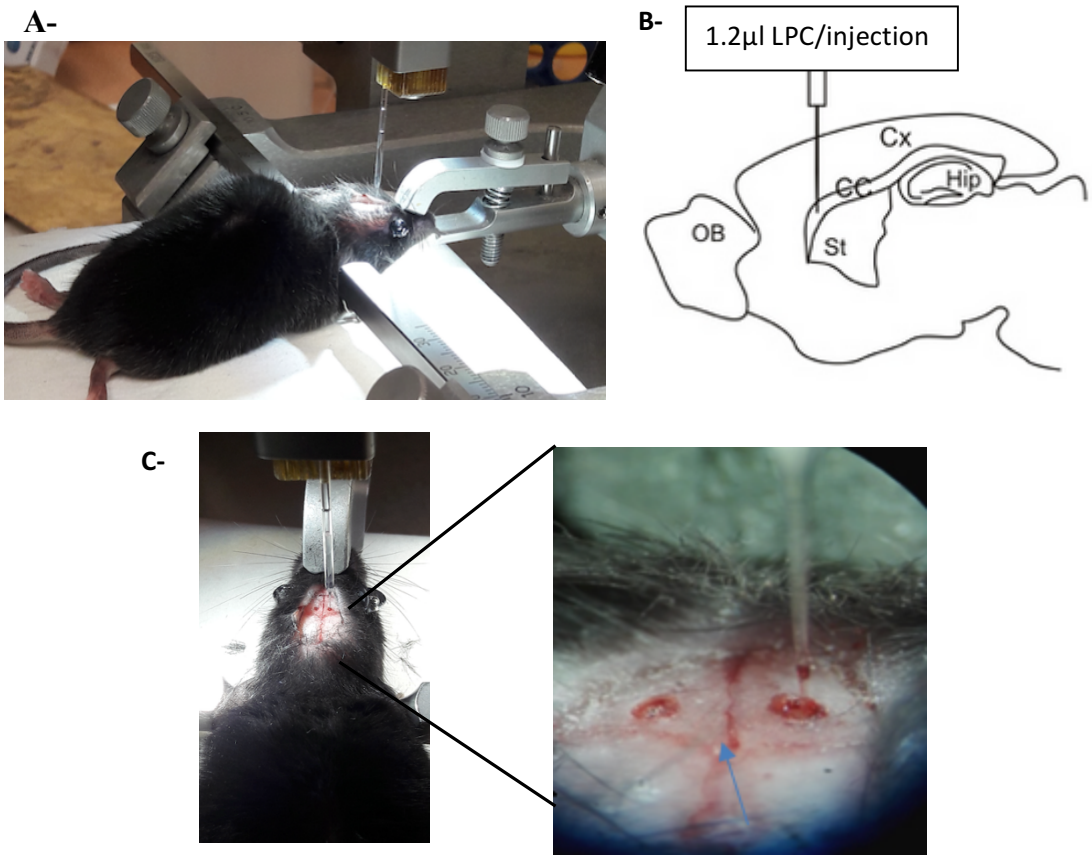


Figure 15 – Chirurgie stéréotaxique pour l'injection du LPC in vivo au niveau du corps calleux

A. Emplacement de l'animal sur l'appareil de stéréotaxie avec au-dessus de sa boîte crânienne la micropipette d'injection de LPC.

B. Localisation de l'injection de 1.2µl LPC (1%) dans le CC (corps calleux) ; Cx (cortex) ; Hip (hippocampe) ; St (striatum) ; Ob (bulbe olfactif).

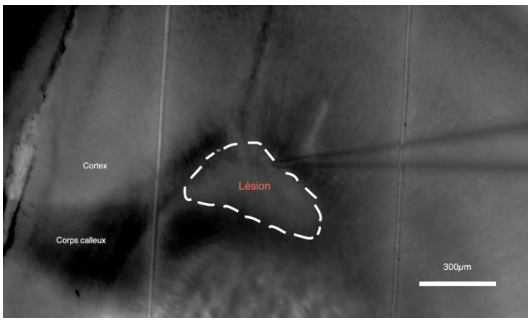
C. Zoom sur la boite crânienne de l'animal montrant la position par rapport au bregma (flèche bleue) des deux entrées de la micropipette d'injection de LPC pour atteindre le corps calleux.

3. Préparation des tranches aiguës du corps calleux

Les animaux sont sacrifiés par dislocation cervicale et décapitation. Les cerveaux sont rapidement extraits de la boîte crânienne, et placés dans une solution de coupe froide bullée avec du carbogène (95% O2, 5% CO2) et composée de (en mM) : KCl [2.5]; NaH_2PO_4 [1.4], $NaHCO_3$ [30], HEPES [20], Urea [2], NMDG [93], HCl [93], Glucose [25], sodium ascorbate [5], Sodium pyruvate [3], $MgCl_2$ [10], $CaCl_2$ [0.5] (pH≈ 7,4 et osmolarité ≈ 330 mOsm). Des tranches coronales de cerveau de 300 µm d'épaisseur sont obtenues à l'aide du vibratome (Microm HM 650V, Thermo Scientific). Chacune des tranches est dans un premier temps transférée dans une chambre contenant la solution de dissection chauffée à 34°C au bain-marie, pendant 8 minutes pour mieux protéger les cellules endommagées par la coupe. Dans un deuxième temps, les tranches sont déposées dans une solution de perfusion pendant 10 min à 34°C composée de (en mM) : NaCl [126], KCl [2.5], NaH_2PO_4 [1.25], $NaHCO_3$ [26], Glucose [20], Pyruvate [5], $MgCl_2$ [1], $CaCl_2$ [2] (pH≈ 7.4, osmolarité ≈ 330 mOsm). Les tranches sont ensuite conservées dans la solution de perfusion pendant moins de 1h à température ambiante (TA, 23°C) avant leur enregistrement.

4. Imagerie calcique

Les tranches extraites d'un même cerveau sont déposées individuellement dans une chambre d'enregistrement sous le trajet optique d'un microscope à épifluorescence (BX51 Olympus) en baignant à température ambiante, et à un débit continu (2-3 ml/min) dans la solution de perfusion en présence ou non d'agents pharmacologiques selon l'expérience menée. Une fois la tranche mise sous le microscope, la région démyélinisée du corps calleux est repérée sur chaque tranche par vidéomicroscopie (DIC) en utilisant l'objectif 4X. La présence d'une région plus claire et brillante au niveau du corps calleux indique la présence d'une lésion (**Figure 16-A**). Son identification est confirmée par épifluorescence à l'objectif 40X (λ 470nm) car la zone démyélinisée contient une plus forte densité de cellules GCaMP3 positives qui résultent de la période de recrutement des OPCs dans la lésion (voir Résultats).

A- 

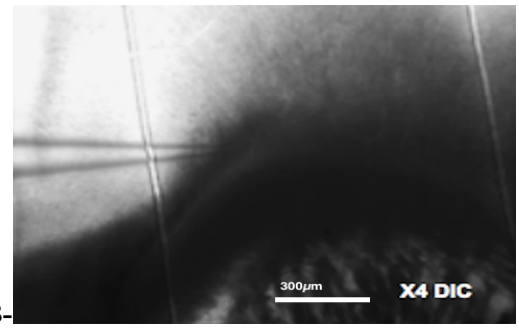
B- 

Figure 16 - Corps calleux de souris visualisé sur tranches aigues de cerveau coupées selon le plan coronal (objectif 4x, DIC)

A- Corps calleux avec lésion démyélinisante induite par le LPC (entourée de pointillés blancs)

B- Corps calleux sans lésion

Après l'identification de la lésion, la profondeur d'enregistrement sur les tranches au niveau de la lésion du corps calleux est prise en compte. Elle ne doit pas être en surface pour éviter les cellules mortes, ni trop en profondeur pour favoriser la détection d'évènements calciques. Pendant l'enregistrement calcique (objectif 40X), la tranche de cerveau est illuminée sur toute sa surface par épifluorescence à une longueur d'onde monochromatique de 470 nm, à une fréquence de 10Hz pendant environ 3 min et avec un temps d'exposition de 50 ms grâce à un système de LED (CoolLed pE-2) commandé par le logiciel Clampex à travers l'interface Digidata 1440A (Molecular Device). Une caméra CCD (charged-coupled device, Optimos) synchronisée avec le système de LED enregistre les images sous le logiciel Micromanager (ImageJ). Le nombre d'enregistrements par tranche est de 3 maximums pour minimiser le photoblanchiment du marqueur calcique au niveau de l'enregistrement.

Les enregistrements calciques sont réalisés sur tranches issues de 2 stades de remyélinisation différents(112):

- Population 1 : Souris à 3-5 jpi (Période de recrutement et de prolifération des OPCs)
- Population 2 : Souris à 13-14 jpi (Période de différenciation des OPCs en oligodendrocytes)

Les cellules OPCs ont été mises en évidence morphologiquement et reconnues sur tranches aigues de cerveau par microscopie à épifluorescence grâce au marqueur calcique $GCaMP_3$ fluorescent exprimé sous le contrôle du promoteur NG2 présent au niveau des OPCs, péricytes et cellules

microgliales activées. La distinction OPCs-péricytes est facile sur le plan morphologique. En effet, les péricytes se trouvent associés à des vaisseaux sanguins visibles par microscopie et ont une morphologie bipolaire qui délimite le vaisseau.

4.1 Pharmacologie

Plusieurs outils pharmacologiques appliqués dans le bain ont été utilisés pour investiguer les mécanismes de signalisation qui soutiennent l'activité calcique de l'oligodendroglie dans les lésions démyélinisantes. Nous avons utilisé d'abord 0.5 µM de tétrodotoxine (TTX), un inhibiteur des canaux sodiques voltage-dépendants très nombreux au niveau des nœuds de Ranvier des neurones, et qui bloque donc l'émission de potentiel d'action. Puis, 100 µM de Cadmium (Cd^{2+}) a été appliqué afin de bloquer les canaux calciques dépendants du potentiel de type haut seuil (L-type VGCCs). Pour inhiber les canaux calciques à bas seuil (T-type VGCCS), nous avons testé 200 µM de chlorure de Nickel ($NiCl_2$). Finalement, un cocktail d'inhibiteurs des récepteurs métabotropiques au glutamate, composé de 50 µM de MPEP (2-Methyl-6-(phenylethynyl)pyridine hydrochloride, un inhibiteur de GluRm5 du groupe I) et de 100 µM de CPPK ((*RS*)-α-Cyclopropyl-4-phosphonophenylglycine, un inhibiteur de GluRm du groupe II et III), a été également testé.

Tous les inhibiteurs ont été dilués dans une solution de perfusion (extracellulaire). L'enregistrement commence après 3-5 min de l'application de la solution de TTX, tandis que pour le Nickel, Cadmium, iGluRm, il débute après 10 min d'application sur tranche.

Pour les deux stades de remyélinisation à 3-5 jpi et à 13-14 jpi, des tranches contrôles sans molécule inhibitrice ont d'abord été enregistrées, suivi d'un deuxième enregistrement en présence des inhibiteurs (TTX, $NiCl_2$, Cd^{2+} ou iGluRm). De plus, des enregistrements ont été réalisés en appliquant directement les inhibiteurs afin de distinguer si une diminution du signal observée serait liée à l'effet des inhibiteurs ou au photoblanchiment du marqueur calcique.

4.2 Analyse des enregistrements calciques

Chaque enregistrement est composé de 1500 images prises à une fréquence de 10 Hz. Pour toutes les images de l'enregistrement, 100 ROIs (Region Of Interests) ont été définis en forme de rectangle de taille identique. Les données brutes d'intensité de fluorescence au cours du temps ont été extraites pour chacun des 100 ROI à l'aide du logiciel image J, puis traitées sous Excel. Les 20 premiers points de chaque trace ont été enlevés car elle montrait une forte décroissance pendant cette période. Le fluorochrome de la GCaMP3 perd de sa brillance lorsqu'il est soumis à une excitation lumineuse prolongée ce qui se traduit par une diminution de fluorescence au cours du temps ne correspondant pas à la perte d'un vrai signal calcique. Pour s'affranchir de ce phénomène de photoblanchiment, les 100 traces ont été ajustées avec une double exponentielle décroissante. L'ajustement a ensuite été soustrait pour tous les ROIs d'un même enregistrement sous le logiciel Igor 6.0 Pro à l'aide de l'outil Neuromatic et une macro développée par l'équipe (Voir Résultats).

Ainsi, grâce à cette analyse peuvent être détectées des augmentations de fluorescence correspondant à une augmentation calcique intracellulaire. Un ROI est défini comme « actif » (ayant des réponses calciques), si et seulement si la valeur de son aire sous la courbe (Area-Under-the-Curve : AUC) est deux fois supérieure à son écart-type. L'écart-type a été calculé par la moyenne des écarts-types de 6 AUC consécutifs de ROIs du même enregistrement ne présentant pas d'activité au cours du temps. La courbe des AUC nous a permis de choisir ces 6 ROIs pour lesquelles aucune activité n'a été détectée.

Deux paramètres ont été définis pour pouvoir comparer les enregistrements calciques. Le premier paramètre déterminé est la moyenne des **pourcentages de ROIs « actifs »** qui se définit par le nombre de ROIs pour lesquels une augmentation de fluorescence a été détectée sur un enregistrement divisé par le nombre total de ROIs (soit 100).

Etant donné la grande variabilité des amplitudes et des cinétiques des événements calciques détectés, nous avons opté pour déterminer un deuxième paramètre : les moyennes des **aires sous la courbe des ROIs « actifs »**. L'intérêt de ce paramètre est de donner une information sur l'intensité et/ou la fréquence des évènements calciques au niveau d'un enregistrement.

4.3 Tests statistiques

Les analyses statistiques sont effectuées avec le logiciel Graphpad (Prism). Nos valeurs ne respectent pas la loi normale, la distribution des valeurs est non gaussienne. Le test de Kruskal Wallis a été utilisé pour comparer les médianes des 2 paramètres. Il s'agit d'un test non paramétrique qui est une alternative du test ANOVA lorsque l'hypothèse de normalité n'est pas acceptable. Il s'applique pour des échantillons indépendants provenant de populations différentes. Ensuite, le test de Dunn's non paramétrique a été utilisé pour comparer plusieurs groupes supérieurs à 3 de taille différente.

Pour la comparaison de données non pairées de deux groupes : contrôle et cadmium, le test de Mann Whitney non paramétrique a été utilisé. Les valeurs aberrantes au sein d'un même groupe de mesure ont été enlevées et identifiées par un test d'outlier du logiciel Graphpad (Prism).

5. Immunomarquage

Préalablement à l'immunomarquage, les tranches de cerveau déjà enregistrées en imagerie calcique sont récupérées de la chambre d'enregistrement, fixées directement au paraformaldéhyde 4% pendant 1h et maintenues en PBS à 4°C jusqu'à utilisation. Pour l'immunomarquage, elles sont tout d'abord perméabilisées pendant 2h à température ambiante sous agitation avec une solution de 4% de sérum de chèvre (Normal Goat Serum, NGS), 95% tampon phosphate, 1% Triton X-100 (Sigma Aldrich). Cette solution de perméabilisation fragilise les membranes cellulaires, les anticorps y pénètreront plus facilement pour se fixer à leurs cibles. Ensuite, un lavage est réalisé pendant 20 minutes au PBS, suivi de l'incubation des 3 anticorps primaires dilués dans une solution Triton 0.2% et NGS 2% pendant 3 nuits, à 4°C sous agitation (**Tableau II**).

L'excédent d'anticorps primaire est ensuite rincé grâce à 3 lavages au PBS sous agitation pendant 10 min. Puis, les tranches sont incubées à l'abri de la lumière avec les anticorps secondaires couplés à une molécule fluorescente en utilisant une dilution 1 : 500 dans une solution de Triton 0.2% et NGS 2%, 2h à TA sous agitation (**Tableau II**). Après l'incubation, les tranches sont rincées 3 fois au PBS pendant 10min à TA sous agitation et montées sur lame avec un milieu Vectashield pour leur

observation au microscope confocal. Pour chacune des coupes de cerveau, la zone d'intérêt qu'est la zone de lésion démyélinisée a été imagée avec un microscope confocal LSM710 (Zeiss) et le logiciel Zen Black. La lésion est identifiée à un grossissement 20X qui permet de visualiser la lésion correspondant à une région avec un faible marquage de la MBP. Le grossissement 63X permet de visualiser les cellules plus en détail à l'intérieur de la lésion.

Tableau II - Marquage immunologique : Anticorps primaires et secondaires

Ac primaires	**Anti-Olig 2** rabbit (1 :400) *Millipore*	**Anti-MBP** rat (1 :100) *Abcam*	**Anti-GFP** chicken (1 :200) *Invitrogen*
Type de marquage	Toutes les cellules de la lignée oligodendrocytaire	La protéine basique de la myéline	GCaMP3, exprimée sous contrôle du promoteur NG2 dans les OPCs et les péricytes
Ac secondaires	Alexa 405 anti-rabbit (1 :500) *Invitrogen*	Alexa 555 anti-rat (1 :500) *Invitrogen*	Alexa 488 anti-chicken (1 :500) *Invitrogen*

6. Chronologie du protocole

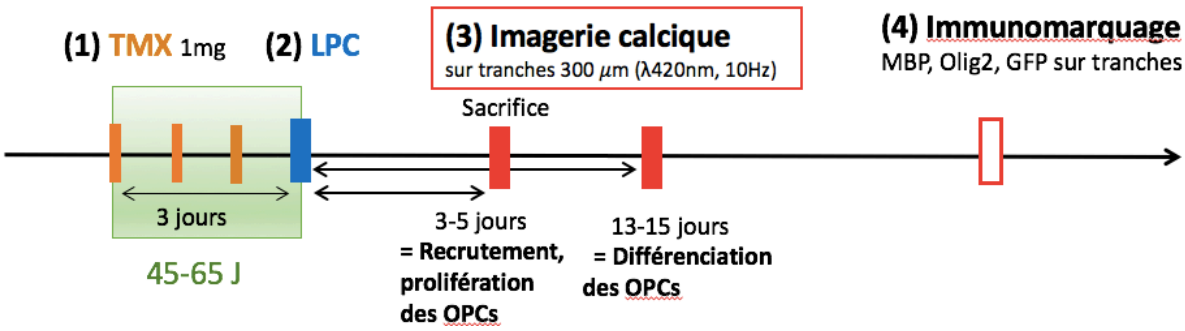


Figure 17 – Schéma du protocole

Toutes les expériences menées ont suivi le protocole suivant :

(1) Induction de l'expression de l'indicateur calcique GCaMP3 dans les OPCs et péricytes par l'injection d'1mg de tamoxifène en intrapéritonéal pendant 3 jours consécutifs.

(2) Mise en œuvre d'un modèle de remyélinisation spontanée après l'injection stéréotaxique de LPC (lysolecithine) au niveau du corps calleux chez des souris âgées entre 45 et 65 jours.

(3) Réalisation d'enregistrements calciques sur tranches aigües de cerveau de 300µm entre 3 et 14 jours après l'injection de LPC correspondant aux périodes de recrutement, prolifération et de différenciation des OPCs.

(4) Immunomarquage (MBP, Olig2, GFP) sur les mêmes tranches que celles enregistrées en imagerie calcique à 3-5 jpi et 13-14 jpi afin de confirmer la lésion démyélinisante et de suivre la différenciation des OPCs.

RESULTATS

1. Caractérisation de la lésion démyélinisante induite par le LPC sur tranches aigües de cerveau au niveau du corps calleux

La lésion démyélinisante induite par l'injection stéréotaxique de LPC au niveau du corps calleux chez la souris a été identifiée en amont des enregistrements calciques par l'observation sous microscope à épifluorescence (**Figure 16 et Figure 18**) ; ainsi qu'en aval par un marquage immunohistochimique des tranches (**Figure 19**).

La lésion est identifiée avant chaque enregistrement calcique à l'aide du microscope à épifluorescence à l'objectif 4X en DIC. A 5 jpi (**Figure 18-A**, gauche) de même qu'à 13 jpi (**Figure 18-B**, gauche) la lésion apparait comme une région plus claire du corps calleux à la différence du contrôle non lésé (**Figure 18-C**, gauche) où le corps calleux garde un aspect relativement homogène en noir.

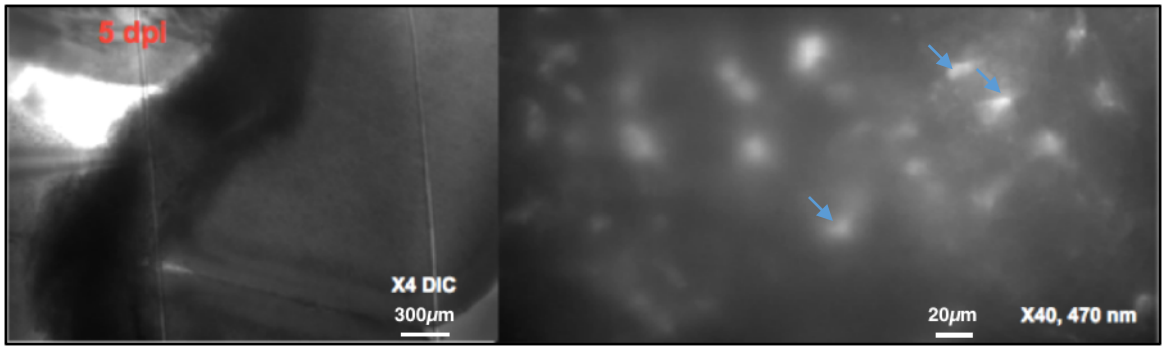
L'observation au microscope à épifluorescence au grossissement 40X permet de mettre en évidence une augmentation de la densité des cellules marquées par la $GCaMP_3$ fluorescente dans la lésion. En effet, la densité cellulaire observée sur tranche au niveau du corps calleux à 5 jpi et à 13 jpi (**Figure 18-A** et **B**, droite) est plus importante qu'au niveau du contrôle non lésé ayant subi la chirurgie (**Figure 18-C**, droite). Bien que des péricytes et une sous-population de microglies activées peuvent exprimer la GCamp3 dans les lésions chez la souris NG2-$Cre^{ERT2(+/-)}$; $GCaMP_3^{lox/lox}$, une très forte densité en OPCs est attendue à 3-5 jpi (112). Les OPCs peuvent être reconnus morphologiquement à 5 jpi de par leur forme stellaire avec un petit soma (**Figure 19-B** et **C**, droite, flèches bleues).

Ainsi, le modèle de démyélinisation induit par le LPC a pu être reproduit au cours du stage. Les critères pour mettre en évidence la lésion par épifluorescence sont les mêmes à 3-5 jours (phase de prolifération des OPCs : 3-5 jpi) ainsi qu'à 13-14 jours (phase de différenciation : 13-14 jpi). Ils se définissent notamment par une forte densité cellulaire fluorescente au grossissement X40 au microscope à épifluorescence et par une région plus claire au niveau du corps calleux.

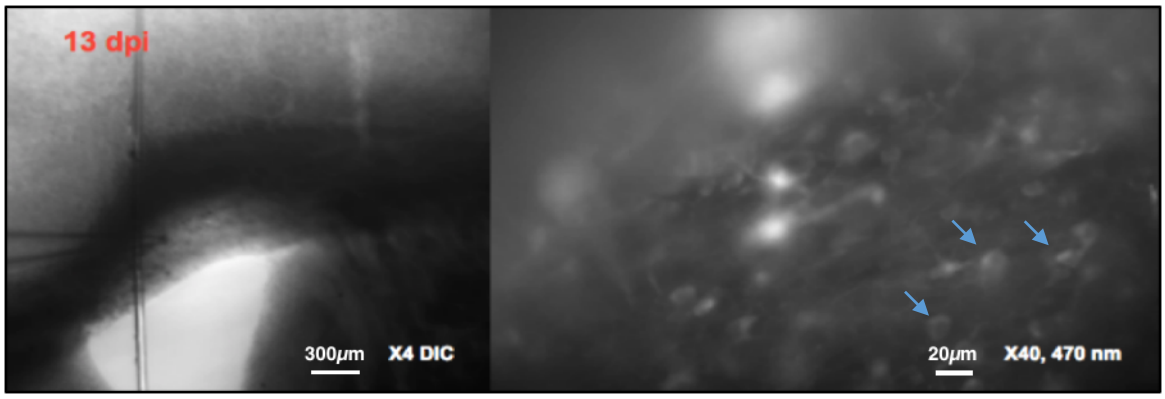
L'utilisation de la double souris transgénique NG2-Cre$^{ERT2(+/-)}$; GCaMP$_3$$^{lox/lox}$ permet de mettre en évidence évènements calciques dans les OPCs ainsi que les OLs nouvellement formés issus de la remyélinisation. En effet, comme la GCaMP$_3$ est placée sous le contrôle du promoteur NG2, seules les cellules exprimant ce protéoglycane pourront exprimer le marqueur calcique, ainsi que les cellules issues de leur différenciation (OLs). Les péricytes sont des cellules de vaisseaux qui peuvent être aussi marqués ; liés à l'expression du protéoglycane NG2. De manière générale, les enregistrements ont été effectués si possible dans une partie de la lésion où il y avait le moins de péricytes et microglies visibles.

La lésion est également confirmée par marquages immunohistochimiques obtenus au niveau du corps calleux d'une tranche aigüe de 300 µm d'un animal quatre jours après l'induction de la démyélinisation par le LPC (**Figure 19**). La lésion observée au microscope confocal à l'objectif 20X (voir Matériels et Méthodes) peut être mise en évidence par la perte d'une protéine de la myéline : la MBP (**Figure 19-A**), et par la présence d'oligodendroglie révélés par la co-localisation du marquage anti-Olig2 et d'anti-GFP (**Figure 19-B**). La GCaMP3 exprimée dans l'oligodendroglie permet le marquage anti-GFP de cette cellule puisque la GCaMP3 dérive de la GFP. Cependant, nous détectons également des péricytes et des cellules Olig2$^-$ qui correspondent probablement à des microglies. En effet, une sous-population de microglie activée dans ce type de lésion peut exprimer le NG2 (112) et, par conséquent, la GCamp3 dans la souris NG2-Cre$^{ERT2(+/-)}$; GCaMP3$^{lox/lox}$. Faute de temps, je n'ai pas pu réaliser des comptages cellulaires pour déterminer la proportion d'oligodendroglie, de péricytes et de microglie dans les lésions, la morphologie des cellules observées par microscopie à épifluorescence montre une forte densité de ces cellules (**Figure 18-A et B**). Les péricytes sont bipolaires et accolés à des vaisseaux et la microglie activée est amiboïde et souvent de plus grande taille que les OPCs.

A- Lésion au moment de la prolifération (5 jpi)



B- Lésion au moment de la différenciation des OPCs (13 jpi)



C- Contrôle sans lésion

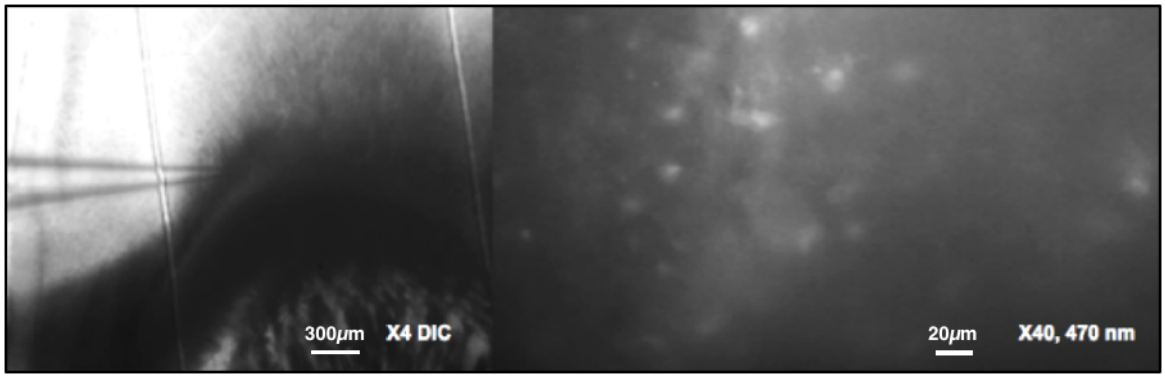


Figure 18 - Mise en évidence de la lésion sur tranche par épifluorescence au moment de la prolifération (3-5 jpi) ainsi qu'au moment de la différenciation des OPCs (13-15 jpi).

Ces images de lésion sont obtenues avant l'enregistrement calcique sur des tranches coronales. La partie gauche de ces 3 images est observée en contraste interférentiel (DIC) avec un objectif 4X et la partie droite en épifluorescence avec un objectif 40X (λ470nm). La fluorescence des images de droite correspond à la fluorescence de la Gcamp3 intracellulaire.

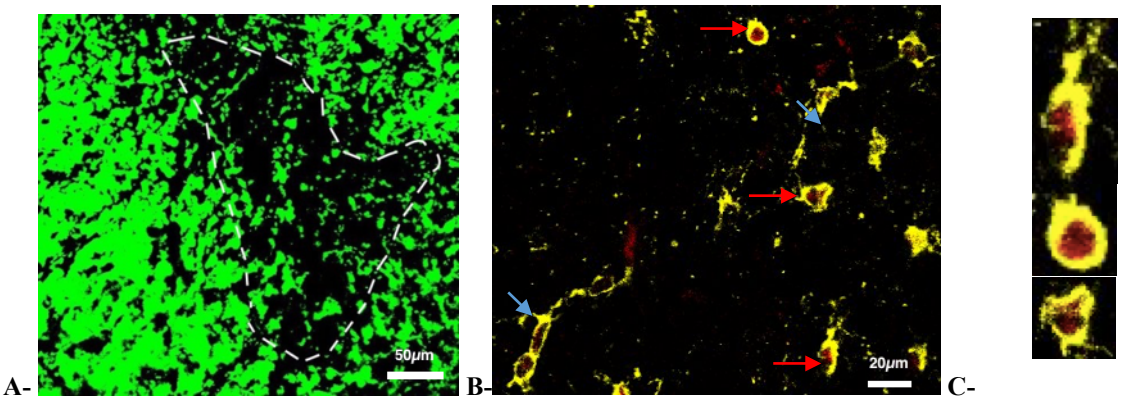


Figure 19 - Mise en évidence de la lésion sur une tranche à 4 jpi par immunohistochimie *a posteriori* de l'enregistrement calcique.

A- Immunomarquage anti-MBP (en vert) pour révéler une protéine de la myéline. L'observation s'effectue à l'aide d'un microscope confocal à un grossissement 20X du corps calleux. La partie du corps calleux la moins marquée par le marquage anti-MBP représente la zone de démyélinisation, entourée par les pointillées blancs.

B- Colocalisation du marquage anti-Olig2 (jaune) et anti-GFP (rouge) révélant la présence d'OPCs (flèches rouges horizontales), de péricytes de vaisseaux (flèches bleues transversales). Observation à l'objectif 20X au microscope confocal.

C- Agrandissement des 3 cellules exprimant le marqueur de la lignée d'oligodendrocytes (GFP+ et Olig2+) pointés par les flèches rouges sur la Figure 19-B.

2. Procédure d'acquisition des données obtenues après imagerie calcique

Tous les enregistrements en imagerie calcique ont été réalisés au niveau des lésions chez des souris adultes. Pour chaque enregistrement des variations calciques intracellulaires, un seul plan de la tranche est enregistré au cours du temps. L'élaboration d'un quadrillage de la zone enregistrée en 100 ROIs (Regions Of Interest) permet d'élargir l'analyse des évènements calciques à un champ relativement large comprenant un grand nombre de cellules Gcamp3^{+}, ayant lieu aussi bien dans les cellules du plan, que dans les cellules au-dessus et en dessous du plan enregistré. A l'aide du logiciel image J, nous avons pu prédéterminer pour chaque enregistrement 100 ROIs de superficie identique (**Figure 20-A**). Ainsi, la probabilité de détection d'évènements calciques entre les ROIs tend vers l'identique puisqu'ils présentent tous la même surface d'analyse. De manière générale, l'analyse de 100 ROIs par enregistrement est une méthode d'analyse qui est reproductible et facilite la comparaison entre différents enregistrements.

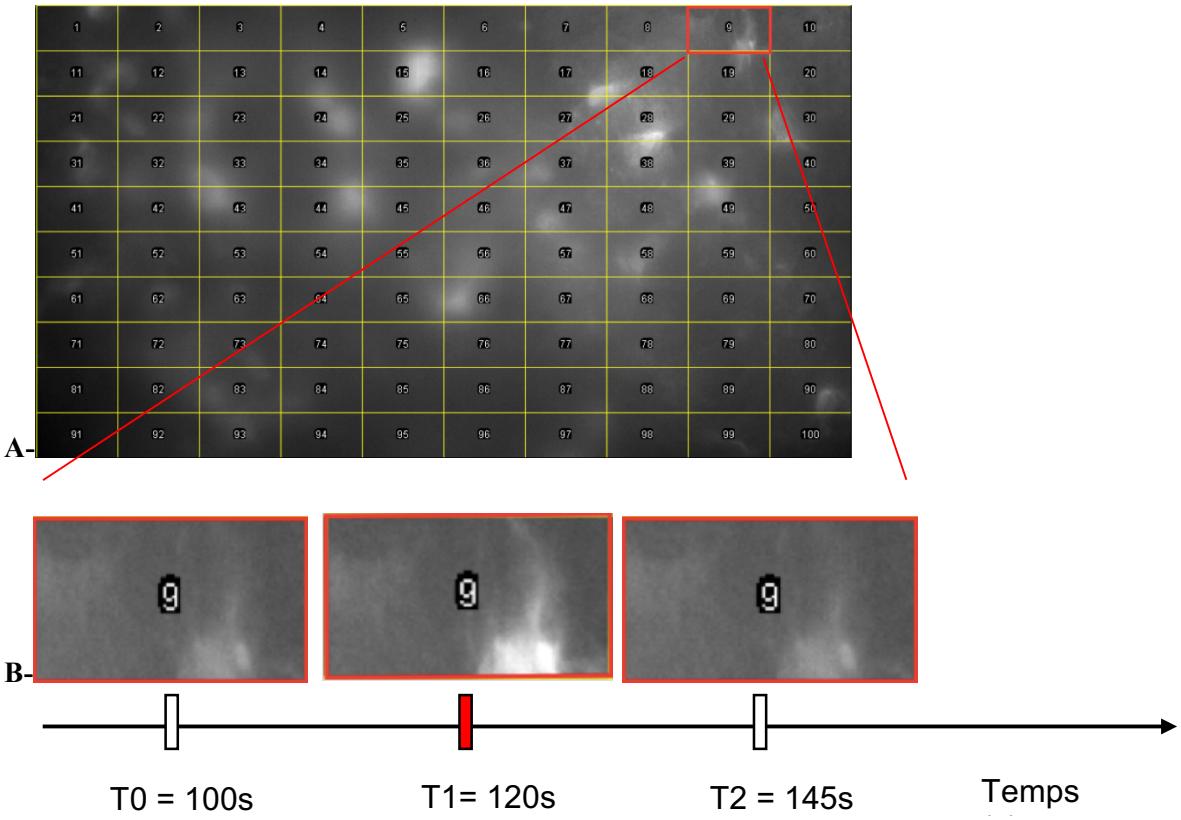


Figure 20 - Quadrillage d'un enregistrement en 100 ROIs et grossissement sur un ROI présentant une activité calcique au cours du temps.

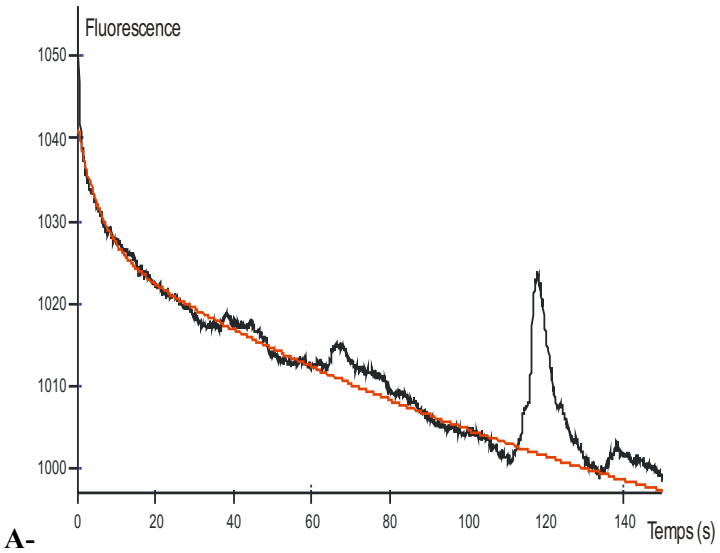
A- Quadrillage de la zone de lésion en 100 ROIs identiques, enregistrés simultanément au cours du temps

B- Mise en évidence de variations de fluorescence au niveau du ROI 9 à des temps d'enregistrements différents. T0 (100s) à T1 (120s) et à T2 (145s). Nous pouvons remarquer une activité calcique transitoire à T1.

Le ROI 9 (**Figure 20-B**) est une région où a été détecté un évènement calcique visible à l'œil nu. Une augmentation de fluorescence est observée entre T0 et T1, puis celle-ci diminue entre T1 et T2. Dans le but de quantifier et d'analyser les évènements calciques comme celui du ROI 9, les données « brutes » d'intensité de fluorescence sont dans un premier temps extraites à l'aide du logiciel ImageJ de façon automatique pour les 100 ROIs. Ainsi, 100 traces sont obtenues, elles représentent l'intensité de fluorescence au cours du temps pour les 100 ROIs. L'allure de ces traces suit celle d'une double exponentielle décroissante comme illustrée sur la **Figure 21-A** au niveau du ROI 9. Cette décroissance correspond à une perte du signal de base au cours du temps qui a pour origine le phénomène de photoblanchiment du marqueur calcique au cours du temps.

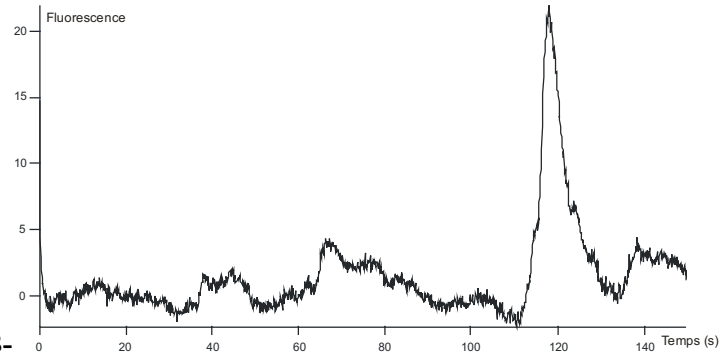
Pour analyser et comparer les enregistrements entre eux, la ligne de base (période sans activité) des courbes de leurs ROIs doit être proche de 0. Il a été possible de s'affranchir du phototoblanchiment en corrigeant toutes les traces des ROIs par la soustraction d'une double exponentielle décroissante. La **Figure 21-A** illustre l'ajustement de la trace du ROI 9 par une double exponentielle décroissante. La trace 9 est remise à 0 en soustrayant l'ajustement à la trace (**Figure 21-B**). Ensuite, à partir des traces corrigées, nous avons calculé les aires sous la courbe des 100 traces d'un enregistrement à l'aide de Neuromatic dans le logiciel Igor Pro (**Figure 21-C**). La valeur de l'AUC (aire sous la courbe) du ROI 9 est au moins supérieure à deux fois l'écart standard à la moyenne (ou SEM en anglais : Standard Error of the Mean) calculée à partir de 6 AUC proches de 0. Le ROI 9 est donc considéré comme un ROI présentant une activité calcique (voir Matériels et Méthodes).

Par la suite, nous avons déterminé grâce à cette méthode d'analyse des données si des différences de signaux calciques existent entre la période de prolifération (3-5 jpi) et de différenciation (13-14 jpi) et ce en testant différentes conditions. Les paramètres *in fine* mesurés pour comparer les enregistrements entre eux ont été : le pourcentage de ROI actifs d'un champ enregistré et la moyenne des AUC pour les ROIs actifs.



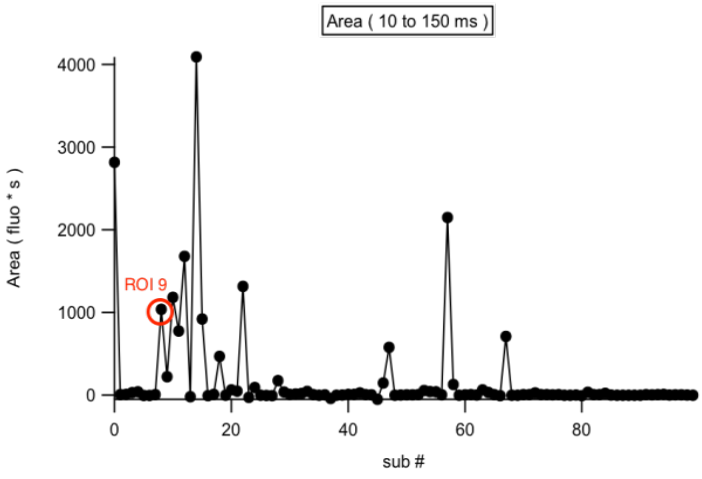
A-

A-Trace de l'intensité de fluorescence du ROI 9 au cours du temps ajusté par une double exponentielle décroissante (courbe rouge).



B-

B-Correction de la trace d'intensité de fluorescence du ROI 9 au cours du temps par la soustraction de la courbe d'ajustement.



C-

C-Courbes des AUC pour les 100 ROIs de l'enregistrement contenant le ROI 9. L'aire est mesurée pour chaque trace entre 10 ms et 150 ms pour éviter les premiers points qui n'ont pas pu être ajustés correctement.

Figure 21 - Analyse du signal calcique à travers l'exemple du ROI 9 d'un enregistrement

3. Comparaison de l'activité calcique dans la lignée oligodendrogliale entre la période de prolifération (3-5 jpi) et de différenciation des OPCs (13-14 jpi) lorsque l'activité neuronale est inhibée ou pas par la TTX.

Pour savoir si l'activité neuronale peut influencer les signaux calciques de l'oligodendroglie au cours de la remyélinisation, nous avons inhibé les potentiels d'action des neurones en appliquant la TTX (0.5µM) qui bloque la génération des potentiels d'action.

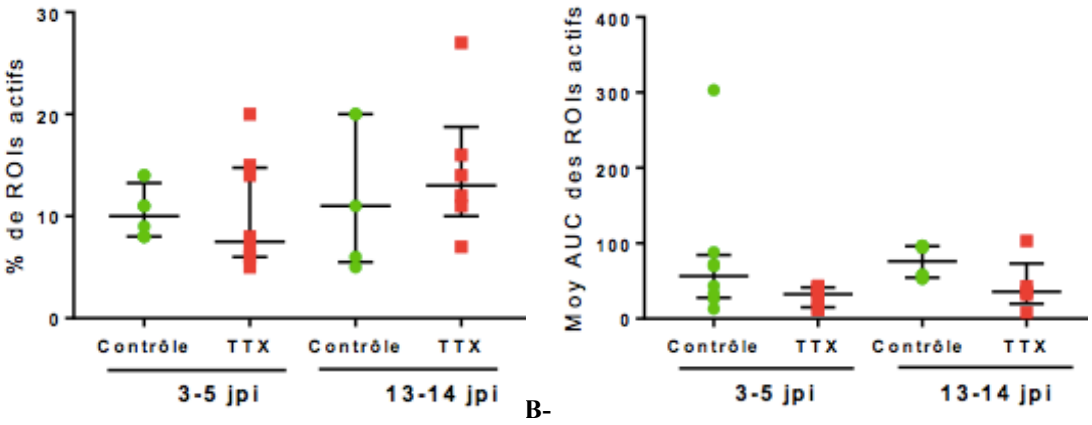


Figure 22 - Activité calcique mesurée à 3-5 jpi et à 13-14 jpi avec ou sans l'inhibition de l'activité neuronale par la TTX (0.5µM)

A- Médianes des pourcentages des ROIs actifs par enregistrement calculées à 3-5jpi sans TTX (n=8, animaux= 6), avec TTX (n= 8, animaux= 2) et à 13-14jpi sans TTX (n= 5, animaux= 4) et avec TTX (n= 6, animaux= 4) (n : nombre d'enregistrements total inclus dans le groupe). Le test non paramétrique Kruskal-Wallis a été utilisé (p-value= 0.515 > 0.05 : ns) suivi du test de comparaisons multiple Dunn's (les p-values contrôle vs TTX à 3-5 jpi, contrôle 3-5jpi vs contrôle 13-14jpi et contrôle vs TTX à 13-14jpi sont toutes supérieures à 0.05 : différence non significative).

B- Médianes des moyennes de l'aire sous la courbe des ROIs actifs mesurées pour chaque enregistrement calcique à 3-5 jpi sans TTX (n= 8) et avec TTX (n= 8) et à 13-14 jpi avec TTX (n= 5) ou sans TTX (n=4). Le test non paramétrique Kruskal-Wallis a été utilisé (p-value= 0.0391<0.05 : différence significative) suivi du test de comparaisons multiple Dunn's. La seule différence significative est celle entre le groupe contrôle 13-14jpi et le groupe TTX 3-5jpi.

Une différence statistiquement significative des médianes des moyennes de l'aire sous la courbe des ROIs actifs (p-values> 0.05) a été trouvée entre le groupe contrôle sans TTX à 13-14 jpi et le groupe avec TTX à 3-5 jpi (**Figure 22-B**). La comparaison des groupes contrôle sans TTX à 13-14 jpi et TTX à 3-5 jpi n'est pas la plus pertinente pour l'étude. Néanmoins, ce résultat suggère que la diminution des PA des neurones par la TTX (tétrodotoxine) impacte l'activité calcique dans les OPCs au moment de leur prolifération et de leur différenciation au cours de la remyélinisation.

Pour les deux stades de la remyélinisation (3-5jpi et 13-14jpi), il existe une tendance à avoir des moyennes des AUC plus faibles en présence de TTX par rapport au contrôle respectif de la même période de la remyélinisation. En effet, la **Figure 22-B** montre une plus faible médiane des AUC des ROIs actifs à la fois au moment de la prolifération (3-5 jpi) et de la différenciation des OPCs (13-14 jpi) en présence de TTX comparée au contrôle. Les interquartiles sont représentés par des traits noirs verticaux pour chacun des groupes de mesure, ce paramètre permet d'avoir une représentation de la dispersion des données. Plus de manipulations en présence de TTX sont nécessaires pour évaluer si l'inhibition de l'activité à un effet sur les AUC des ROIs actifs. L'AUC des ROIs actifs permet de reporter une évaluation sur l'amplitude et la fréquence des évènements calciques. Tandis que le pourcentage de Rois actifs permet de mesurer l'étendue spatiale des signaux calciques sur la tranche.

Des enregistrements successifs mesurés dans des conditions identiques sur la même position d'une tranche ont été réalisés pour s'assurer que la mesure n'était pas impactée par le photoblanchiment du marqueur calcique. Le **Tableau III** montre l'évolution des paramètres pour des enregistrements successifs.

En effet, entre le premier, deuxième et troisième enregistrement pour une même position donnée en présence de TTX, il a été observé une augmentation (tranche 1) et/ou une diminution du pourcentage de ROIs actifs (tranche 2, 3). De même pour les valeurs de la médiane des moyennes des AUC des ROIs actifs, nous avons relevé aussi bien des augmentations (tranche 2) entre le 1^{er}, $2^{ème}$, $3^{ème}$ enregistrement que des diminutions (tranche 1 et 3) (**Tableau III**). Le photobleaching du marqueur calcique ne semble pas interférer notre mesure pour des enregistrements répétés.

Condition en présence de :	1er enregistrement		2ème enregistrement		3ème enregistrement	
Tranche 1 **TTX** 3-5 jpi	7%	42,4	14%	38,7	Non effectué	
Tranche 2 **TTX** 3-5 jpi	20%	11,9	5%	23,5	6%	43,6
Tranche 3 **TTX** 13-14 jpi	16%	35,9	7%	31,8	Non effectué	

Tableau III - Evolution de l'activité calcique entre le 1er, 2ème voir 3ème enregistrement réalisés à sur une même position de la tranche en présence de TTX aussi bien à 3-5 jpi ou 13-14 jpi.

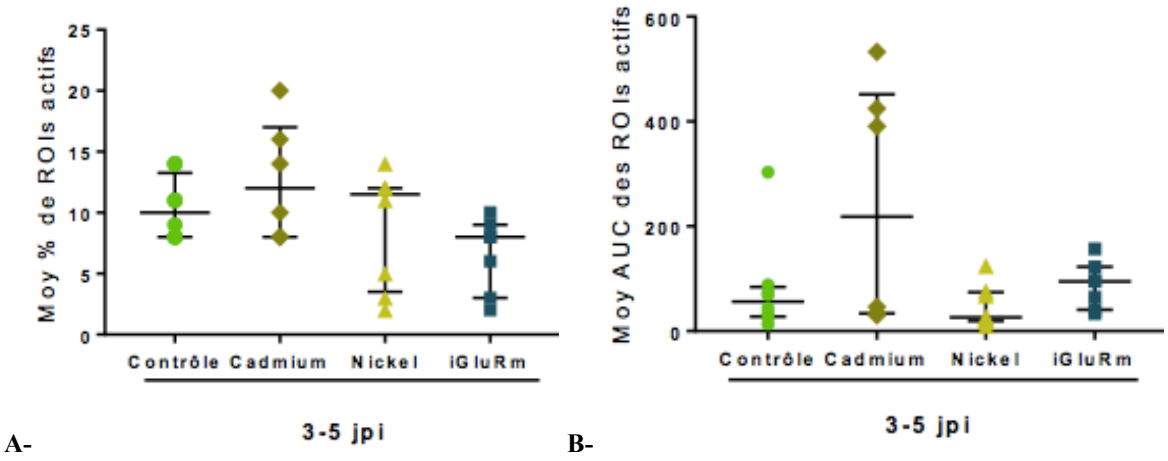
Les colonnes des 1er, 2ème, 3ème enregistrements sont séparées en deux colonnes : celles de gauche correspondent aux valeurs de % de ROIs « actifs » (en jaune), et celles de droite aux moyennes des AUC des ROIs actifs (en orange).

4. Etudes des mécanismes de signalisation possibles à l'origine de l'activité calcique dans les cellules de la lignée oligodendrogliale à 3-5 jpi (période de prolifération des OPCs) par différents outils pharmacologiques (Cadmium, Nickel, iGluRm)

Les OPCs expriment des récepteurs responsables d'influx calciques vers le cytosol tels que les récepteurs métabotropiques activés par le glutamate environnant, et les canaux calciques dépendant du potentiel (VGCCs). Les OPCs expriment à la fois les VGCCs de type L très exprimés au niveau de leur corps cellulaire et les VGCCs de type T. Il a été montré *in vitro* seulement pour les VGCCs de type L qu'ils jouaient un rôle crucial dans la migration, prolifération et différenciation des OPCs au cours de la myélinisation (120). Nous nous sommes demandés si cela était également le cas au cours de la remyélinisation spontanée.

Expérimentalement, l'utilisation d'outils pharmacologiques a servi à tester différentes voies potentielles impliquées dans l'activité calcique de l'oligodendroglie au cours de la remyélinisation. Nous avons appliqué sur les tranches du cadmium et du nickel pour bloquer respectivement les VGCCs de type T et L (voir Matériels et Méthodes). De même, nous avons étudié l'implication de

la voie des récepteurs métabotropiques du glutamate par un cocktail d'inhibiteur de GluR5m et du groupe II et III (voir Matériels et Méthodes).



A- **B-**

Figure 23 - Activité calcique mesurée à 3-5 jpi dans différentes conditions avec ou sans inhibiteur (Cadmium, Nickel, iGluR)

A- Médianes des pourcentages moyennés de ROIs actifs détectés par enregistrement dans les conditions suivantes : Contrôle sans inhibiteurs (n=8, animaux=6), avec Cadmium (n=6, animaux=2), avec Nickel (n=8, animaux=3) et avec iGluRm (n=7, animaux=3). Le test non paramétrique Kruskal-Wallis a été appliqué (p-value = 0,107> 0,05 : ns), suivi du test de Dunn's (les p-values contrôle vs Cadmium ou Nickel ou iGluRm sont toutes supérieures à 0,05 : ns).

B- Médianes des aires sous les courbes des ROIs moyennées pour lesquelles a été détectée une augmentation du signal calcique (n et animaux identique de la Figure 23-A pour toutes les conditions : contrôle sans inhibiteurs, Cadmium, Nickel, iGluRm. Le test non paramétrique Kruskal-Wallis a été appliqué (p-value= 0,157> 0,05 : ns), suivi du post test Dunn's (contrôle vs Cadmium ou iGluRm : p-values > 0,999 > 0,05 : ns et contrôle vs Nickel p-value = 0,5273 > 0,05 : ns)

La **Figure 23-A** ne montre aucune différence statistiquement significative du % de ROIs actifs entre les 3 conditions avec les inhibiteurs comparés au contrôle sans inhibiteurs (p values>0.05) à la période de prolifération des OPCs. De même, la **Figure 23-B** ne montre aucune différence lorsque sont comparées les moyennes des AUC des ROIs actifs (p value>0.05).

Néanmoins, dans les **Figure 23-A et B**, les 2 paramètres ne révèlent pas la même tendance d'évolution entre les groupes. Néanmoins les signaux calciques auraient tendance à être plus importants au sein du groupe cadmium mais l'interquartile reste très grand par rapport aux autres groupes. L'importante dispersion des points par rapport à la médiane favorise la non significativité du test de comparaison des moyennes de Dunn's entre les groupes avec molécules inhibitrices et contrôle.

A la période de prolifération (3-5 jpi), le cadmium, nickel et les iGluRm n'ont pas changé de façon significative les paramètres par rapport au contrôle. Néanmoins, le nickel et les iGluRm sont ceux qui ont tendance à se différencier le plus des valeurs du contrôle pour la mesure de la moyenne des ROIs actifs (cas du nickel) et pour le pourcentage des ROIs actifs (cas des iGluRm) (**Figure 23-B**). Plus d'expériences sont nécessaires pour mieux comprendre cette tendance de l'effet de ces deux inhibiteurs : nickel et iGluRm.

De la même manière que pour les enregistrements réalisés en présence de TTX **(Tableau III)**, nous avons effectué des contrôles pour s'assurer que le photoblanchiment n'impactait pas notre mesure. Nous avons regardé le comportement d'enregistrements répétés sur un même champ en présence de Cadmium et de Nickel (**Tableau IV**).

Condition en présence de :	**1er enregistrement**		**2ème enregistrement**		**3ème enregistrement**	
Cadmium 3-5 jpi	8%	30,4	14%	532,9	20%	390,7
Nickel 3-5 jpi	12%	24,0	12%	27,6	11%	24,4

Tableau IV - Evolution de l'activité calcique entre le 1er, 2ème, 3ème enregistrement réalisés sur une même position de la tranche en présence de Cadmium, Nickel à 3-5 jpi.

Les colonnes des 1er, 2ème, 3ème enregistrement sont séparées en deux colonnes : celles de gauche correspondent aux valeurs de % de ROIs « actifs » (en jaune), et celles de droite aux moyennes des AUC des ROIs actifs (en orange).

Entre le 1er, 2ème et 3ème enregistrement pour une même position donnée en présence de Cadmium a été observée une augmentation des 2 paramètres mesurés.

5. Compréhension de l'activité calcique au sein de la lignée oligodendrogliale à 13-14 jpi (période de différenciation des OPCs) par le Cadmium

Pour savoir si les VGCCs avaient un impact sur les signaux calciques au moment de la différenciation à 13-14 jpi, nous avons appliqué comme pour la période de prolifération un inhibiteur : le cadmium. Faute de temps de manipulation, nous avons testé moins d'outils pharmacologiques à 13-14 jpi comparé à 3-5 jpi.

Comme illustré précédemment pour la période 3-5 jpi, à 13-14 jpi aucune différence statistiquement significative n'a été observée pour les deux paramètres mesurés (la moyenne des pourcentages de ROIs actifs et la moyenne des AUC des ROIs actifs) entre les groupes contrôles et le Cadmium (**Figure 24-A** et **B**). Une très forte variabilité des médianes a été observée pour les groupes contrôles sans inhibiteur et en présence de cadmium (**Figure 24-A et B**).

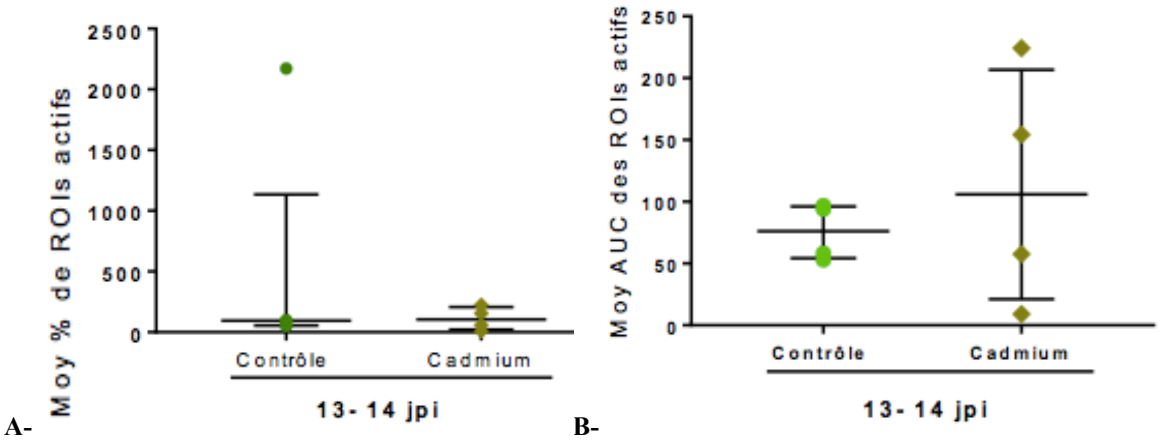


Figure 24 - Activité calcique mesurée à 13-14 jpi pendant la différenciation dans différentes conditions avec ou sans Cadmium

A- Médianes des pourcentages moyennés pour chaque ROIs actifs par enregistrement sur des tranches mesurées à 13-14 jpi sans Cadmium=contrôle (n=5, animaux=4) et avec Cadmium (n=4, animaux=4). Pour comparer des valeurs qui ne suivent pas la loi normale de deux groupes le test de Mann Whitney a été utilisé : p value=0.8492> 0.05 : pas de différence statistiquement significative).

B- Médianes des moyennes des AUC des ROIs pour lesquelles a été détectée une augmentation de fluorescence mesurée sans Cadmium ou avec Cadmium. Les effectifs et l'échantillonnage sont les mêmes que ceux de la Figure 24-A. Pour comparer des valeurs qui ne suivent pas la loi normale de deux groupes le test de Mann Whitney a été utilisé : p value=0.9048> 0.05 : pas de différence statistiquement significative).

DISCUSSION

Dans cette étude, l'objectif a été d'étudier les mécanismes responsables de la signalisation calcique dans les OPCs et OLs au cours de la remyélinisation spontanée et de savoir si les signaux calciques sont induits par l'activité neuronale. L'utilisation de différents moyens pharmacologiques (TTX, iGluRm, Cadmium, Nickel), nous a permis de mesurer si les signaux calciques de l'oligodendroglie étaient dépendants de l'activité neuronale et/ou s'ils impliquaient les canaux calciques voltage-dépendants de type L et T et les récepteurs métabotropiques du glutamate. Les résultats obtenus dans le modèle de remyélinisation chez la souris ne nous permettent pas de déterminer à ce jour le mécanisme responsable des signaux calciques au niveau des cellules oligodendrogliales lors de la prolifération (3-5jpi) et de la différenciation (13-14jpi) des OPCs au cours de la remyélinisation. Cependant, il reste possible que l'activité neuronale inhibée dans notre étude par la TTX ainsi que les canaux calciques à bas seuil (VGCCs) inhibée par le nickel soient impliqués dans les signaux calciques au cours de la remyélinisation.

Nos résultats ont montré que le blocage de l'activité neuronale par la TTX (0.5µM) a eu un effet significatif sur la signalisation calcique au cours de la remyélinisation pendant la prolifération avec TTX et la différenciation des OPCs sans inhibition de l'activité neuronale (**Figure 22-B**). Même si un effet de la TTX reste possible, il ne serait de toute façon pas complet. Une des raisons de cette non inhibition est peut-être que les signaux calciques des OPCs et OLs dépendent d'une communication avec les astrocytes et les cellules microgliales activées environnants. En effet, les astrocytes seraient capables comme les neurones d'évoquer des changements de la signalisation calcique des cellules gliales exprimant NG2, dont les OPCs, en libérant de l'ATP et du glutamate (140). Les astrocytes libèrent trois principaux gliotransmetteurs : le glutamate, l'ATP, et le GABA. Ces gliotransmetteurs agiraient sur les récepteurs extrasynaptiques des cellules NG2 : iGluR, P2X, P2Y.

En plus d'augmenter le nombre de manipulation en TTX, nous pourrions tester dans le sens inverse l'impact de l'activité lorsqu'elle est stimulée. Pour ce faire, il serait possible de stimuler l'activité neuronale en appliquant des trains de stimulations par des électrodes extracellulaires dans la lésion

ou bien en forçant le relargage vésiculaire par l'application de sécrétaguogues (Barium, Ruthénium), ou de la Bilirubine dans le bain de perfusion des tranches. En parallèle, il a déjà été montré que la stimulation électrique de neurones présynaptiques provoquait l'augmentation du calcium intracellulaire et le recrutement des OPCs (117).

Il est possible que les canaux calciques voltages-dépendants n'aient pas eu d'influence significative sur les signaux calciques pendant la différenciation (13-14 jpi) des OPCs au cours de la remyélinisation. En effet, il est connu que l'expression de ces récepteurs est diminuée au moment de la différenciation des OPCs ce qui expliquerait qu'à 13-14 jpi nous n'avons pas relevé de différence significative entre le groupe contrôle (sans molécule inhibitrice) et le groupe avec cadmium. Des expériences supplémentaires permettront d'éclaircir ces deux aspects.

La remyélinisation complète est un processus qui s'établit en 30 jours dans notre modèle. Nous avons étudié les périodes de prolifération (3-5 jpi) et de différenciation (13-14 jpi) des OPCs au cours de la remyélinisation. Pour ces deux périodes, nous n'avons pas trouvé de différence de l'activité calcique, il en existe peut-être une après **21 jpi**. Des manipulations futures doivent être effectuées aux périodes plus tardives de la remyélinisation. En effet, il est possible que la signalisation calcique soit différente à 21 jpi par rapport aux périodes les plus précoces de la remyélinisation pour plusieurs raisons. D'une part, les OPCs et les OLs n'expriment pas les mêmes récepteurs impliqués dans les flux calciques à leur membrane plasmique. Par exemple, l'expression des VGCCs est beaucoup plus faible au niveau des OLs par rapport aux OPCs (125). Une autre différence est à relever entre les OPCs et les OLs à savoir que seuls les OPCs sont capables de former avec les neurones des synapses perdues après leur différenciation. Les résultats de l'équipe avaient montré précédemment que les OPCs contactaient peu de synapse glutamatergique pendant la prolifération dans notre modèle de démyélinisation induit par le LPC. Ces synapses seraient impliquées dans l'inhibition de la prolifération des OPCs (112). Dernièrement, il a été montré au niveau des OLs uniquement que l'activation des transporteurs sodiques dépendant du glutamate participait au processus de maturation. Cet effet serait associé à une élévation intracellulaire de calcium et à la phosphorylation de la CaMKIIβ (calcium sensor calcium/calmodulin-dependent kinase type Iiβ) (140).

Pour la suite de ce projet, d'**autres voies d'entrée calcique extrinsèque** de la lignée oligodendrogliale restent à tester tels que les récepteurs purinergiques de l'ATP, NMDA, les SOCCs et les GABAergique. Il serait possible d'inhiber ces récepteurs avec les bloqueurs suivants : la Suramine (10μM) pour les récepteurs P2Y/P2X de l'ATP, le NMQX (100μM) pour les NMDA, l'utilisation d'animaux transgéniques présentant des délétions des SOCCS, la Gabazine pour les récepteurs $GABA_A$, et le CGP 55845A pour les $GABA_B$.

Les récepteurs AMPA comparés aux NMDA seraient plus importants aux stades les plus précoces de la remyélinisation notamment de la prolifération (134).

Outre les pistes d'entrée calcique extrinsèques, il nous reste à explorer l'entrée calcique des **voies intrinsèques** à la cellule. En effet, le calcium intracellulaire peut augmenter à partir de la libération des stocks intracellulaires tels que le réticulum endoplasmique et de façon moindre de la mitochondrie. Une augmentation de calcium dans ces organelles peut s'effectuer par la pompe SERCA au niveau du RE et par la PMCA ; un transporteur de la mitochondrie (141) (142). Pour étudier l'impact de ces voies intrinsèques dans la signalisation calcique de la lignée oligodendrogliale au cours de la remyélinisation, nous pourrions utiliser la thapsigargine pour inhiber spécifiquement la SERCA ATPase.

De manière générale, l'inconvénient des outils pharmacologiques utilisés pour l'étude des voies d'entrée du calcium au sein de la lignée oligodendrogliale est la non spécificité d'action des molécules inhibitrices puisque les récepteurs qu'elles modulent sont exprimés aux niveaux d'autres cellules gliales (astrocytes, microglie) et éventuellement des axones qui traversent le corps calleux.

Il a été suggéré que **les astrocytes** seraient capables de promouvoir la myélinisation en réponse à des stimuli électriques évoqués par des stimulations extracellulaires (140). Néanmoins, un mécanisme potentiel pourrait passer par le LIF (cytokine leukemia inhibitory factor) sécrété par les astrocytes en réponse à la libération d'ATP des axones lorsqu'ils déchargent, et serait l'élément responsable pour promouvoir la myélinisation. A contrario, il a été montré *in vitro* que les astrocytes seraient capables par un contact physique avec les OLs d'inhiber la translocation de l'ARNm de la MBP dans ces OLs

et d'inhiber l'oligodendrogénèse. Le rôle des astrocytes reste à déterminer en condition de remyélinisation.

Une étude a investi le profilage cellulaire au cours du temps entre la démyélinisation induite par le bromure d'éthidium et la fin de la remyélinisation (134). Il a été identifié une perte des astrocytes jusqu'à 14 jpi puis une recolonisation complète à 21 jpi. Dans notre modèle de démyélinisation, il est connu que le LPC ne détériore pas les astrocytes et les cellules microgliales (138). En revanche, il nous faudrait mieux comprendre le rôle des astrocytes dans la réponse calcique de l'oligodendroglie. Nous pouvons émettre l'hypothèse qu'il existe une communication astrocyte-OPC aux différents stades de la remyélinisation qui peut influencer les mesures de notre étude.

Dans la littérature et dans nos expériences, il y a quelques confusions sur les cellules dites NG2 que l'on caractérise de cellules OPCs. Le marqueur NG2 n'est pas spécifique des OPCs puisqu'il est également exprimé par les péricytes et, dans certains cas, par les cellules microgliales réactivées. Sachant que le marqueur spécifique des OPCs est le PDGFR-α, le laboratoire est en train de développer pour la suite du projet une **souris PDGFR-αCre : GCaMP6** (98). Ainsi, les péricytes et les cellules microgliales n'exprimeront pas le marqueur calcique, ce qui permettra à terme de suivre uniquement les variations calciques dans les OPCs et les OLs. De plus, le marqueur GCaMP3 sera changé par la GCaMP6, plus sensible aux variations calciques intracellulaires (143). Il sera plus adéquat pour étudier les cinétiques calciques.

Dans les prochaines manipulations, il serait intéressant de réaliser en parallèle des observations à l'épifluorescence dans les mêmes conditions des expériences réalisées au **microscope bi-photon**. La haute résolution du biphoton, nous permettra d'observer la signalisation calcique sur une cellule spécifiquement et de déterminer si ces signaux sont localisés au niveau du soma ou des prolongements des OPCs ou des OLs. Ces cellules pourraient être identifiées facilement par leur morphologie caractéristique et distincte. De plus, l'analyse de dynamiques calciques localisées sera possible, et permettra également de renseigner sur la ou les voie (s) de signalisation impliquée(s) aux différentes étapes de la remyélinisation.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES DE L'ETUDE

L'étude menée s'inscrit dans un projet global dont l'objectif final est de déterminer si l'activité neuronale module de manière différente les signaux calciques des OPCs et des OLs pendant les différentes phases de la remyélinisation. De plus, le calcium constituerait un potentiel candidat pour faire le lien entre l'activité neuronale et la remyélinisation.

Cette étude a permis de mettre en place pour la première fois dans ce projet une méthode de traitement et d'analyse des signaux calciques enregistrés. Une analyse différente des signaux calciques avec d'autres calculs de paramètres pourrait être réalisée pour s'affranchir du biais de la densité cellulaire qui n'est pas identique d'un enregistrement à l'autre.

Dans l'étude menée, les résultats n'ont pas pu définir le ou les mécanisme(s) responsable(s) de la signalisation calcique de la lignée oligodendrogliale pendant les différentes phases de la remyélinisation, d'autres pistes d'entrée calcique extrinsèques et intrinsèques des OPCs et des OLs restent à explorer.

Il est pour l'instant difficile de tirer des conclusions sur l'effet de l'activité neuronale sur les signaux calciques au cours de la remyélinisation. En effet, seules des expériences de blocage de l'activité neuronale ont été effectuées par une molécule inhibitrice (la tétrodotoxine) et des expériences futures de stimulation par différents outils pharmacologiques et non pharmacologiques permettront d'effectuer des comparaisons et de répondre à cette interrogation.

A terme, une fois le mécanisme cellulaire identifié responsable des signaux calciques, il serait intéressant en le bloquant de montrer le rôle fonctionnel du calcium à l'intérieur de la cellule oligodendrogliale en condition de lésion. En s'inspirant du rôle du calcium dans la myélinisation, nous pourrions montrer les différents rôles du calcium dans la remyélinisation. Par exemple, le rôle du calcium dans la motilité des OPCs pourrait se démontrer par une modification des protéines du cytosquelette (actine) (144). L'effet du calcium dans la prolifération pourrait être mis en évidence par un marquage à l'EdU des cellules oligodendrogliales. De plus, le rôle du calcium dans la différenciation et maturation des OPCs pourrait être montré par la quantification de l'ARNm de la

MPB, une protéine de la myéline lorsque la voie de signalisation est bloquée ou pas. Enfin, l'utilisation d'injection d'adénovirus floxés permettrait de cibler le canal ou le récepteur oligodendrogliale et d'analyser son rôle potentiel dans le processus de remyélinisation (prolifération, différenciation).

Ce projet de recherche fondamentale vise à terme à trouver un nouvel outil moléculaire potentiel pour impacter l'oligodendrogénèse en condition de démyélinisation. L'objectif final est de comprendre le processus qui gouverne le taux d'OPCs, la réparation de la myéline et d'ouvrir de nouvelles perspectives en termes de cibles thérapeutiques pour promouvoir la remyélinisation dans la sclérose en plaques.

THÈSE SOUTENUE PAR : **Mathilde RICHARD**

TITRE :

LA SCLEROSE EN PLAQUES, PERSPECTIVES THERAPEUTIQUES : ETUDE DES SIGNAUX CALCIQUES INTRACELLULAIRES DE LA LIGNÉE OLIGODENDROGLIALE AU COURS DE LA REMYELINISATION CHEZ LA SOURIS

CONCLUSION

La sclérose en plaques est une pathologie démyélinisante du système nerveux central chez le sujet jeune (20-40 ans). Le mécanisme de la maladie se caractérise par une attaque auto-immune de la gaine de myéline responsable de l'apparition progressive de plaques démyélinisantes et d'une neurodégénérescence secondaire. Les causes à l'origine du déclenchement de la maladie sont non établies, plusieurs étiologies ont été avancées comme les facteurs génétiques, et environnementaux (niveau d'ensoleillement, agents infectieux, tabac…). Il semble que la SEP soit une maladie plurifactorielle ce qui rend difficile la possibilité de prévenir et de guérir la maladie.

Les traitements de fond actuels ont commencé leur essor il y a deux décennies en 1993 avec les interférons et l'acétate de glatiramère. Depuis d'autres molécules sont apparues mais leurs approches se limitent au contrôle de la composante inflammatoire de la maladie.

Plus de 40 molécules sont en cours de développement clinique pour la prise en charge de la SEP. Certaines d'entre elles agissent sur de nouvelles cibles du système immunitaire comme l'anticorps monoclonal humanisé anti-CD20 (Ocrelizumab). D'autres pistes thérapeutiques visent à optimiser l'action de molécules déjà existantes en modulant plus sélectivement la cible pour diminuer les effets indésirables, c'est le cas du Siponimod. L'anticorps (GNbAC1) en cours de phase II dirigé contre une protéine de l'enveloppe d'un rétrovirus permettra peut-être d'agir directement sur un facteur causal potentiel (HERV).

Chez les patients atteints de la SEP, une réparation des lésions démyélinisantes est possible mais reste partielle et hétérogène en fonction du stade de la maladie, des individus et d'une plaque à l'autre pour un patient donné. Plusieurs voies de signalisation responsables de l'échec de la remyélinisation ont été identifiées et ont permis l'essor d'une nouvelle stratégie thérapeutique favorisant la réparation directe de la myéline endommagée. Parmi les molécules à l'étude qui favorisent la remyélinisation endogène, on peut citer la biotine, l'opicinumab (un anticorps anti-Lingo). Ces molécules agissent soit en amplifiant des facteurs activateurs soit en inhibant ceux qui empêchent la remyélinisation.

Les principales sources de remyélinisation endogène sont les précurseurs d'oligodendrocytes (OPCs) qui s'activent, puis migrent vers la zone de lésion pour ensuite se différencier en oligodendrocytes avant d'effectuer la myélinogénèse. Ces cellules persistent au sein des lésions de SEP. L'insuffisance de remyélinisation au sein des lésions de SEP serait liée à un échec de la prolifération, différenciation ou de maturation des OPCs en oligodendrocytes matures chargés de produire la myéline.

En comparaison à la remyélinisation, il est connu que la myélinisation est dépendante de l'activité neuronale capable d'évoquer des augmentations intracellulaires transitoires de calcium dans la lignée des oligodendrocytes. Le calcium intracellulaire des OPCs et OLs est un messager secondaire capable de réguler la transcription de gènes, notamment ceux impliqués dans la prolifération, différenciation des OPCs en OLs. Peu de connaissances existent sur les signaux calciques lors de la remyélinisation. L'objectif du projet de recherche en Neurosciences abordé dans cette thèse a été de comprendre l'impact de l'activité neuronale sur les signaux calciques au cours de la remyélinisation et d'identifier les mécanismes responsables des variations calciques dans l'oligodendroglie. Notre modèle de remyélinisation a été induit après la démyélinisation par la lysolécithine au niveau du corps calleux chez un modèle de souris transgénique exprimant un marqueur calcique (GCaMP3).

Bien que des variations calciques spontanées aient été observées en contrôle, nous n'avons pas révélé d'effet significatif de l'inhibition de l'activité neuronale par la tétrodotoxine (TTX) sur la signalisation calcique à deux stades de la lésion (prolifération des OPCs et différentiation en OLs). Néanmoins, une tendance à la baisse de l'aire-sous-la courbe a été visible ce qui suggère un possible effet sur l'amplitude des signaux qui sera testée ultérieurement par d'autres expériences. De même,

nous avons testé si les signaux calciques étaient dus à l'activation des récepteurs métabotropiques du glutamate (GluRm) et/ou des canaux calciques dépendants du potentiel (VGCCs). Nos résultats n'ont montré aucun effet des inhibiteurs de GluRm et VGCCs. Cependant, un effet du Nickel, inhibiteur des VGCCs de bas seuil reste possible et devra être testé ultérieurement. D'autres pistes restent à évaluer comme les réservoirs intracellulaires issus du réticulum endoplasmique et de la mitochondrie. Ce travail constitue une première analyse des signaux calciques de la lignée des oligodendrocytes dans la remyélinisation.

Les perspectives prévoient des expériences de stimulation de l'activité neuronale en comparaison à l'inhibition sur une nouvelle lignée de souris qui permettra un marquage plus spécifique des signaux calciques. Lorsque le mécanisme responsable des signaux calciques de l'oligodendroglie au cours de la remyélinisation sera identifié, il sera intéressant de montrer le rôle fonctionnel du calcium dans ce processus de réparation de la gaine de myéline pour *in fine* identifier de nouvelles cibles thérapeutiques.

L'intérêt de développer des molécules autour de la stratégie remyélinisante est de pouvoir à terme restaurer la conduction de l'influx nerveux, mais aussi de protéger les axones neuronaux et de prévenir l'aggravation du handicap. A l'avenir, une prise en charge combinant des interventions immunitaires, de neuroprotection et de réparation de la gaine de myéline, en plus des traitements symptomatiques, permettra de mieux prendre en charge les patients avec un ralentissement de la progression de la maladie, voire même une régression du handicap.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER

Grenoble, le : 4/09/2017

LE DOYEN LE PRÉSIDENT DE LA THÈSE

Pr. Michel SÈVE **Pr. Christophe RIBUOT**

Faculté de Pharmacie,
Université Grenoble Alpes

Serment de Galien

« Je jure en présence des Maîtres de la Faculté, des Conseillers de l'Ordre des Pharmaciens et de mes condisciples :

D'honorer ceux qui m'ont instruit(e) dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses. Que je sois couvert(e) d'opprobre et méprisé(e) de mes confrères si j'y manque ».

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

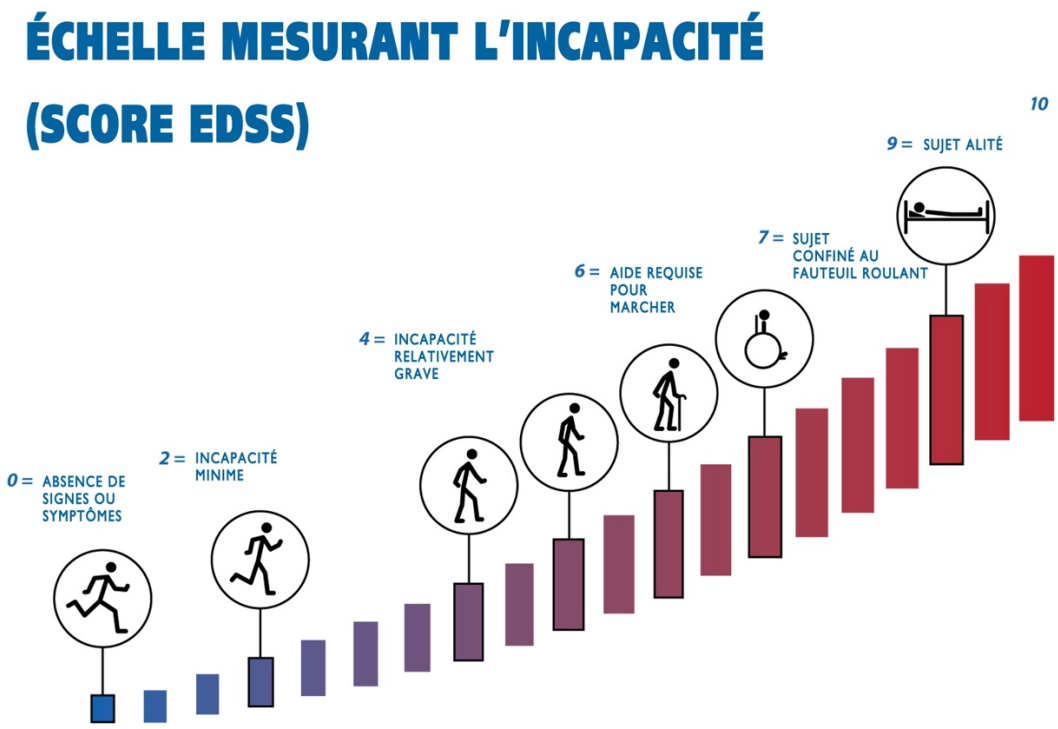
1. Gonsette.R, "La Sclérose en plaques : Maladie, espoirs et réalité." Editeur : Fondation Charcot. http://www.fondation-charcot.org/sites/default/files/books/frch1.pdf
2. Landtblom A-M, et al. "The first case history of multiple sclerosis: Augustus d'Esté (1794-1848)". févr 2010.
3. P.Kerschen. "La sclérose en plaques : aperçu historique". La Lettre du Neurologue. Vol XIV n°2. Fév 2010. http://www.edimark.fr/Front/frontpost/getfiles/16042.pdf
4. F. Alfons Schelling. Carswell's classical 1838 Illustration of a peculiar diseased state of the spinal cord andpons http://www.ms-info.net/evo/msmanu/1022.htm
5. Fondation Arsep. "Historique de la maladie". https://www.arsep.org/library/media/other/historique_de_la_sep.pdf
6. Patrick Hautecoeur. " Histoire de la sep". 2012 https://www.arsep.org/library/media/other/docs_patients/Histoire-de-la-sep-2012.pdf
7. Fields RD. "A new mechanism of nervous system plasticity: activity-dependent myelination". Nature, déc 2015
8. Morrison BM, et al. "Oligodendroglia: metabolic supporters of axons". Trends Cell Biol, déc 2013
9. Ravera S, et Panfoli I. "Role of myelin sheath energy metabolism in neurodegenerative diseases". Neural Regen es, oct 2015
10. Morell P, Quarles RH. "Characteristic Composition of Myelin". 1999 https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK28221/
11. Schmitt S, et al. "Metabolism and functions of lipids in myelin". Biochim Biophys, août 2015
12. Ishii A, et al. "Human myelin proteome and comparative analysis with mouse myelin". Proc Natl Acad Sci, 25 août 2009
13. Larousse É. Encyclopédie Larousse - sclérose en plaques. http://www.larousse.fr/encyclopedie/medical/sclérose_en_plaques/16025
14. HAS, Guide - Affection de longue durée - Sclérose en plaques, 2006. http://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/07-024_sclerose-guide_sans_lap.pdf
15. Orton S-M, et al, "Association of UV radiation with multiple sclerosis prevalence and sex ratio in France. Neurology, 1 févr 2011.
16. Milo R, Kahana E. "Multiple sclerosis: Geoepidemiology, genetics and the environment". Autoimmun Rev, mars 2010
17. Gosette. R, "La Sclérose en plaques : Maladie, espoirs et réalité." Editeur : Fondation Charcot, page 9. http://www.fondation-charcot.org/sites/default/files/books/livrefr-fondation-charcot.pdf
18. Centre de référence des maladies neuro inflammatoires de l'enfant, "Protocole National de Diagnostic et de Soins (PNDS) Sclérose en Plaques de l'enfant", juillet 2016 http://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/2016-07/pnds_-_sclerose_en_plaques_de_lenfant.pdf
19. Popescu BFG, et al. "Pathology of Multiple Sclerosis: Where Do We Stand?" Contin Lifelong Learn Neurol, août 2013.
20. Frischer JM, et al. "The relation between inflammation and neurodegeneration in multiple sclerosis brains". Brain, 1 mai 2009
21. Associations des Collèges des Enseignants d'Immunologie des Universités de langue française, "ITEM 125: Sclérose en plaques", 2010-2011. http://campus.cerimes.fr/immunologie/enseignement/immuno_125/site/html/cours.pdf
22. Neuro-CEB, Don du cerveau post mortem pour la recherche scientifique, Les pathologies étudiées : la sclérose en plaques http://www.neuroceb.org/pathologie-sep.htm
23. Hemmer B, et al. "New concepts in the immunopathogenesis of multiple sclerosis, Nat Rev Neurosci, 1 avr 2002.
24. Lucchinetti CF, et al. " Distinct Patterns of Multiple Sclerosis Pathology Indicates Heterogeneity in Pathogenesis". Brain Pathol, 1 juill 1996.
25. Mainero C, et al. "In vivo imaging of cortical pathology in multiple sclerosis using ultra-high field MRI". Neurology, 22 sept 2009
26. Enseignement Médecine Université de Genève, "La Sclérose en plaques", juin 2010. http://www.medecine.unige.ch/enseignement/apprentissage/module4/immersion/archives/2009_2010/travaux/10_r_sep.pdf
27. Servier, "Bientôt un traitement pour toutes les formes de la sclérose en plaques ?", 2014. http://blog.servier.fr/bientot-un-traitement-pour-toutes-les-formes-de-la-sclerose-en-plaques/
28. MSIF, "Formes évolutives de la SEP", MS in focus n°14, 2009. https://www.msif.org/wp-content/uploads/2014/09/MS-in-focus-14-Disease-courses-French.pdf
29. Ebers GC, et al. "A genetic basis for familial aggregation in multiple sclerosis". Nature, 14 sept.
30. Novartis pharmaceuticals, rubrique Sclérose en plaques [Internet]. http://www.info-sclerose-en-plaques.ch/sclerose-en-plaques-sep/causes
31. TIMSGC& TWTCCC. "Genetic risk and a primary role for cell-mediated immune mechanisms in multiple sclerosis". Nature, août 2011.
32. Zalc.B, INSERM. "La sclérose en plaques est une maladie auto-immune qui affecte le système

nerveux central". 2014
http://www.inserm.fr/thematiques/neurosciences-sciences-cognitives-neurologie-psychiatrie/dossiers-d-information/sclerose-en-plaques-sep
33. Damotte.V, Thèse doctorale : Cerveau, Cognition, Comportement. "Génétique de la sclérose en plaques : Héritabilité manquante et charge génétique", 2013
https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00929806/document
34. Hautecoeur P. La sclérose en plaques : de la neuroimmunologie à l'immunomodulation. BASH, 2004.
35. Tao C, et al. " Association between human herpesvirus & human endogenous retrovirus and MS onset & progression". J Neurol Sci, 15 janv.
36. Munger KL, Ascherio A. "Risk factors in the development of multiple sclerosis". Expert Rev Clin Immunol. 1 sept 2007.
37. Munger KL, et al. "Anti-Epstein-Barr virus antibodies as serological markers of multiple sclerosis: a prospective study among United States military personnel". Mult Scler Houndmills Basingstoke Engl. oct 2011
38. Barnett MH, et al. "Migration and multiple sclerosis in immigrants from United Kingdom and Ireland to Australia: a reassessment. III: risk of multiple sclerosis in UKI immigrants and Australian-born in Hobart, Tasmania". J Neurol. 1 avr 2016.
39. Ascherio A, et al. "Vitamin D and multiple sclerosis". Lancet Neurol, juin 2010.
40. Beretich BD, Beretich TM. "Explaining multiple sclerosis prevalence by ultraviolet exposure: a geospatial analysis". Mult Scler Houndmills Basingstoke Engl. août 2009
41. Ramagopalan SV, et al. "Rare variants in the CYP27B1 gene are associated with multiple sclerosis". Ann Neurol. déc 2011.
42. Hawkes CH. "Smoking is a risk factor for multiple sclerosis: a metanalysis". Mult Scler J. juin 2007.
43. Handel AE, et al. "Smoking and multiple sclerosis: an updated meta-analysis". PloS One. 13 janv 2011.
44. Mikaeloff Y, et al."Parental smoking at home and the risk of childhood-onset multiple sclerosis in children". Brain J Neurol. oct 2007.
45. Lyon-Caen O, Clanet M. "La sclérose en plaques", pages 148. John Libbey Eurotext, 1997.
46. Artemiadis AK, et al. "Stress as a Risk Factor for Multiple Sclerosis Onset or Relapse: A Systematic Review". Neuroepidemiology. 17 févr 2011.
47. Mia Topsoe Mailand et Jette Lautrup Frederiksen. "Vaccines and multiple sclerosis: a systematic review". Journal of Neurology, 2016.
http://resolver.ebscohost.com.gate2.inist.fr/openurl?sid=Entrez%3aPubMed&id=pmid%3a27604618&site=ftf-live
48. OMS, "Vaccin contre l'hépatite B et sclérose en plaques", extrait du rapport de la réunion du GACVS 2002.
http://www.who.int/vaccine_safety/committee/topics/hepatitisb/multiple_sclerosis/Jun_2002/fr/
49. Vichnin M, et al. "An Overview of Quadrivalent Human Papillomavirus Vaccine Safety: 2006 to 2015". Pediatr Infect Dis J. sept 2015.
50. Cyim, Collège des Enseignants de Neurologie. "Sclérose en plaques", 2016. https://www.cen-neurologie.fr/deuxi%C3%A8me-cycle%20/sclerose-plaques
51. GILLAIN.N, "L'analyse du LCR dans le diagnostic de la Sclérose en plaques", 2007.
http://www.lesjeudisdefleurus.org/uploads/files/compte_rendus/Mme_GILLAIN
52. Lyon-Caen O, Clanet M. La sclérose en plaques. Paris: J. Libbey; 2002.
53. Bianchi V, El anbassi S. "Médicaments". Bruxelles: De Boeck; 2012.
54. Castro-Borrero W, et al. "Current and emerging therapies in multiple sclerosis: a systematic review". Ther Adv Neurol Disord, juill 2012.
55. Caulin C, Vidal SA. Vidal Recos recommandations en pratique, 2014.
56. Madsen C. "The innovative development in interferon beta treatments of relapsing-remitting multiple sclerosis". Brain Behav. juin 2017
https://www-ncbi-nlm-nih-gov.gate2.inist.fr/pmc/articles/PMC5474703/
57. Claire BLIN. Thèse d'exercice en pharmacie: " Traitements de la sclérose en plaques par la natalizumab: bilan d'utilisation et evaluation de la qualité", 2011.
http://docnum.univ-lorraine.fr/public/SCDPHA_T_2011_BLIN_CLAIRE.pdf
58. Moreau T. "Sclérose en plaques". 2017.
59. Marriott JJ, et al. Evidence Report: The efficacy and safety of mitoxantrone (Novantrone) in the treatment of multiple sclerosis: Report of the Therapeutics and Technology Assessment Subcommittee of the American Academy of Neurology. Neurology. 4 mai 2010.
60. Polman CH, et al. "A randomized, placebo-controlled trial of natalizumab for relapsing multiple sclerosis". N Engl J Med. 2 mars 2006.
61. HAS. "Aubagio 14mg comprimé pelliculé". Commission de la transparence, le 5 mars 2014.
62. Gold R, et al. "Placebo-Controlled Phase 3 Study of Oral BG-12 for Relapsing Multiple Sclerosis". N Engl J Med. 20 sept 2012.
63. HAS, Synthèse d'avis de la commission de la transparence : Lemtrada (alemtuzumab), janvier 2016.
https://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/2016-04/lemtrada_synthese_ct14394.pdf
64. ARSEP, Hautecoeur. P. "Les douleurs dans la sclérose en plaques".
https://www.arsep.org/library/media/other/docs_patients/Douleurs-dans-la-SEP-oct-2015.pdf
65. Gavin Giovannoni, présentation : "The future ", MS Trust. https://www.slideshare.net/mstrust/the-future-presentation-by-gavin-giovannoni
66. Salzer J, et al. "Rituximab in multiple sclerosis. Neurology". 15 nov 2016.

67. X.Montalban et al. "Ocrelizumab versus Placebo in Primary Progressive Multiple Sclerosis". The new england journal of medecine, 19 jan 2017. http://www.nejm.org/doi/pdf/10.1056/NEJMoa1606468
68. Subei AM, Cohen JA. "Sphingosine 1-Phosphate Receptor Modulators in Multiple Sclerosis". CNS Drugs. juill 2015.
69. Mao-Draayer Y, et al. "The sphingosine-1-phosphate receptor: A novel therapeutic target for multiple sclerosis and other autoimmune diseases". Clin Immunol. 1 févr 2017.
70. Comi G, et al. "Placebo-Controlled Trial of Oral Laquinimod for Multiple Sclerosis". N Engl J Med, 15 mars 2012.
71. Vollmer TL, et al. "A randomized placebo-controlled phase III trial of oral laquinimod for multiple sclerosis". J Neurol. 1 avr 2014.
72. Sedel F, et al. "High doses of biotin in chronic progressive multiple sclerosis: A pilot study". Mult Scler Relat Disord. 1 mars 2015.
73. Tourbah A, et al. "MD1003 (high-dose biotin) for the treatment of progressive multiple sclerosis: A randomised, double-blind, placebo-controlled study". Mult Scler Houndmills Basingstoke Engl. nov 2016.
74. SFEndocrino : Dosages d'hormones thyroïdiennes et biotine http://www.sfendocrino.org/article/798/dosages-d-rsquo-hormones-thyroidiennes-et-biotine:
75. Laurent Suchet. Présentation 2016 https://fr.slideshare.net/LaurentSuchet/corse-2016
76. Shao Z, et al. "LINGO-1 Regulates Oligodendrocyte Differentiation through the Cytoplasmic Gelsolin Signaling Pathway". J Neurosci Off J Soc Neurosci. 22 mars 2017.
77. Jepson S, et al. "LINGO-1, a Transmembrane Signaling Protein, Inhibits Oligodendrocyte Differentiation and Myelination through Intercellular Self-interactions". J Biol Chem. 22 juin 2012.
78. Assessment of Clemastine Fumarate as a Remyelinating Agent in Multiple Sclerosis https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02040298
79. Ryan Rong Wang. "Histamine H3 receptor negatively regulates oligodendrocyte differentiation and myelinisation", 2014. https://onlinelibrary.ectrims-congress.eu/ectrims/2014/ACTRIMS-ECTRIMS2014/64324/ryan.rong.wang.histamine.h3.receptor.negatively.regulates.oligodendrocyte.html?f=m1
80. Schwartzbach CJ, et al. "Lesion remyelinating activity of GSK239512 versus placebo in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis: a randomised, single-blind, phase II study". J Neurol. 2017.
81. Mullard A. "Remyelination researchers regroup after proof-of-concept setback in multiple sclerosis". Nat Rev Drug Discov. août 2016.
82. Pirko I, et al. "A human antibody that promotes remyelination enters the CNS and decreases lesion load as detected by T2-weighted spinal cord MRI in a virus-induced murine model of MS". 19 août 2004
83. Mullin AP, et al. "rHIgM22 enhances remyelination in the brain of the cuprizone mouse model of demyelination". Neurobiol Dis. sept 2017.
84. Smith ES, et al. "SEMA4D compromises blood-brain barrier, activates microglia, and inhibits remyelination in neurodegenerative disease". Neurobiol Dis. janv 2015.
85. LaGanke C, et al. "Safety/tolerability of the anti-semaphorin 4D Antibody VX15/2503 in a randomized phase 1 trial". Neurol Neuroimmunol Neuroinflammation, 16 juin 2017
86. GeNeuro. "En savoir plus à propos de la SEP et du rétrovirus MSRV" http://www.geneuro.ch/fr/technologies-fr/domaine-therapeutique/sep-msrv
87. Nash RA, et al. High-dose immunosuppressive therapy and autologous HCT for relapsing-remitting MS. Neurology. 28 févr 2017.
88. Muraro PA, et al. "Long-term Outcomes After Autologous Hematopoietic Stem Cell Transplantation for Multiple Sclerosis. JAMA Neurol". 1 avr 2017.
89. Connick P, et al. "Autologous mesenchymal stem cells for the treatment of secondary progressive multiple sclerosis: an open-label phase 2a proof-of-concept study". Lancet Neurol. févr 2012.
90. Dulamea A. "Mesenchymal stem cells in multiple sclerosis - translation to clinical trials". J Med Life. 2015.
91. ARSEP. "Thérapies par cellules souches dans la sep", 2012. https://www.arsep.org/library/media/other/docs_patients/Cellules-souches---patients-ARSEP.pdf
92. Allen NJ, Barres BA. "Neuroscience: Glia, more than just brain glue". Nature. février 2009.
93. Nishiyama A, et al. "Polydendrocytes (NG2 cells): multifunctional cells with lineage plasticity". Nat Rev Neurosci, janv 2009.
94. Richardson WD, et al. "NG2-glia as multipotent neural stem cells: fact or fantasy?", Neuron, 26 mai 2011.
95. Stallcup WB. "The NG2 antigen, a putative lineage marker: immunofluorescent localization in primary cultures of rat brain". Dev Biol. 15 avr 1981.
96. Levine JM, Card JP. "Light and electron microscopic localization of a cell surface antigen (NG2) in the rat cerebellum: association with smooth protoplasmic astrocytes". J Neurosci. 1 sept 1987.
97. Dawson MRL, et al. "NG2-expressing glial progenitor cells: an abundant and widespread population of cycling cells in the adult rat CNS". Mol Cell Neurosci, oct 2003.
98. Kang SH, et al. "NG2+ CNS glial progenitors remain committed to the oligodendrocyte lineage in postnatal life and following neurodegeneration". Neuron, 18 nov 2010.
99. Su Z, Yuan Y, et al. "Reactive astrocytes inhibit the survival and differentiation of oligodendrocyte precursor cells by secreted TNF-α". J Neurotrauma, juin 2011.
100. Wang S, Young KM. "White matter plasticity in adulthood". Neuroscience, 12 sept 2014.
101. Macklin WB, et al. "Expression of myelin proteolipid and basic protein mRNAs in cultured cells". J Neurosci

Res. 1986.
102. Demerens C, et al. "Induction of myelination in the central nervous system by electrical activity". Proc Natl Acad Sci. 9 mars 1996.
103. Gibson EM, et al. "Neuronal activity promotes oligodendrogenesis and adaptive myelination in the mammalian brain". Science, 2 mai 2014.
104. Wake H, Ortiz FC, Woo DH, Lee PR, Angulo MC, Fields RD. "Nonsynaptic junctions on myelinating glia promote preferential myelination of electrically active axons". Nature commun, 2015.
105. Mensch S, et al. "Synaptic vesicle release regulates myelin sheath number of individual oligodendrocytes in vivo". Nat Neurosci, mai 2015.
106. Hines JH, et al. "Neuronal activity biases axon selection for myelination in vivo". Nat Neurosci. mai 2015.
107. Bengtsson SL, et al. "Extensive piano practicing has regionally specific effects on white matter development". Nat Neurosci. sept 2005.
108. McKenzie IA, et al. "Motor skill learning requires active central myelination". Science. 17 oct 2014.
109. Bergles DE, et al. "Glutamatergic synapses on oligodendrocyte precursor cells in the hippocampus". Nature. 11 mai 2000.
110. Mangin J-M, Gallo V. "The curious case of NG2 cells: transient trend or game changer?" ASN Neuro. 10 mars 2011.
111. Mangin J-M, et al. "Experience-dependent regulation of NG2 progenitors in the developing barrel cortex". Nat Neurosci. sept 2012.
112. Sahel A, et al. "Alteration of synaptic connectivity of oligodendrocyte precursor cells following demyelination". Cell Neurosci,17 mars 2015
113. Kukley M, et al. "The Fate of Synaptic Input to NG2 Glial Cells: Neurons Specifically Downregulate Transmitter Release onto Differentiating Oligodendroglial Cells". J Neurosci, 16 juin 2010.
114. Káradóttir R, et al. "NMDA receptors are expressed in oligodendrocytes and activated in ischaemia." Nature. 22 déc 2005.
115. Pitman KA, Young KM. "Activity-dependent calcium signalling in oligodendrocyte generation". Int J Biochem Cell Biol. août 2016.
116. Wake H, et al. "Control of Local Protein Synthesis and Initial Events in Myelination by Action Potentials". Science. 16 sept 2011.
117. Haberlandt C et al. "Gray Matter NG2 Cells Display Multiple Ca2+-Signaling Pathways and Highly Motile Processes". 24 mars 2011
118. Zonouzi M, et al."Bidirectional plasticity of calcium-permeable AMPA receptors in oligodendrocyte lineage cells". Nat Neurosci. 9 oct 2011.
119. Agresti C, et al. "Metabotropic P2 receptor activation regulates oligodendrocyte progenitor migration and development". Glia. 15 avr 2005.
120. Cheli VT, et al. "Voltage-gated Ca++ entry promotes oligodendrocyte progenitor cells maturation and myelination in vitro". Exp Neurol. mars 2015.
121. Kirischuk S, et al. "Subcellular heterogeneity of voltage-gated Ca2+ channels in cells of the oligodendrocyte lineage". Glia. janv 1995.
122. Lin S, Bergles DE. "Synaptic signaling between GABAergic interneurons and oligodendrocyte precursor cells in the hippocampus". Nat Neurosci. janv 2004.
123. Vélez-Fort M, Audinat E, Angulo MC. "Functional alpha 7-containing nicotinic receptors of NG2-expressing cells in the hippocampus". Glia. 1 août 2009
124. Berridge MJ, et al. "The versatility and universality of calcium signalling". Nat Rev Mol Cell Biol. oct 2000.
125. Fulton D, et al. "Regulation of L-type Ca++ currents and process morphology in white matter oligodendrocyte precursor cells by golli-myelin proteins". Glia. août 2010.
126. Cheli V, et al. "Voltage-gated Ca++ entry promotes oligodendrocyte progenitor cells maturation and myelination in vitro". Exp Neurol. mars 2015.
127. Paez PM, et al. "Golli myelin basic proteins regulate oligodendroglial progenitor cell migration through voltage-gated Ca++ influx". J Neurosci Off J Soc Neurosci. 20 mai 2009.
128. Paez PM, et al. "Golli myelin basic proteins stimulate oligodendrocyte progenitor cell proliferation and differentiation in remyelinating adult mouse brain". Glia. juillet 2012.
129. Paez PM, et al. "Modulation of canonical transient receptor potential channel 1 in the proliferation of oligodendrocyte precursor cells by the golli products of the myelin basic protein gene". J Neurosci Off J Soc Neurosci. 9 mars 2011.
130. Maldonado PP, Angulo MC. "Multiple Modes of Communication between Neurons and Oligodendrocyte Precursor Cells". Neurosci Rev J Bringing Neurobiol Neurol Psychiatry. juin 2015.
131. Grienberger C, Konnerth A. "Imaging Calcium in Neurons". Neuron. 8 mars 2012;73.
132. Franklin RJM. "Why does remyelination fail in multiple sclerosis?" Nat Rev Neurosci. sept 2002.
133. Kipp M, et al. " Endogeneous remyelination: findings in human studies". CNS Neurol Disord Drug Targets. août 2012.
134. Gautier HOB, et al. "Neuronal activity regulates remyelination via glutamate signalling to oligodendrocyte progenitors". Nat Commun. 6 oct 2015.
135. Huang W, et al. "Novel NG2-CreERT2 knock-in mice demonstrate heterogeneous differentiation potential of NG2 glia during development". Glia. juin 2014.
136. Zariwala HA, et al. "A Cre-dependent GCaMP3 reporter mouse for neuronal imaging in vivo". J Neurosci Off J Soc Neurosci. 29 févr 2012.

137. Sturrock RR. "Myelination of the Mouse Corpus Callosum". Neuropathol Appl Neurobiol. 1 nov 1980.
138. Vereyken EJF, et al. "An in vitro model for de- and remyelination using lysophosphatidyl choline in rodent whole brain spheroid cultures". Glia. sept 2009.
139. Ousman SS, David S. "Lysophosphatidylcholine induces rapid recruitment and activation of macrophages in the adult mouse spinal cord". Glia. mars 2000.
140. Hamilton N, et al. "Axons and astrocytes release ATP and glutamate to evoke calcium signals in NG2-glia". Glia. 1 janv 2010.
141. Alberdi E, et al. "Calcium and glial cell death. Cell Calcium". sept 2005.
142. Simpson PB, et al. "High density distribution of endoplasmic reticulum proteins and mitochondria at specialized Ca2+ release sites in oligodendrocyte processes". J Biol Chem. 5 sept 1997.
143. Chen T-W, et al. "Ultrasensitive fluorescent proteins for imaging neuronal activity". Nature. juillet 2013.
144. Simpson PB, Armstrong RC. "Intracellular signals and cytoskeletal elements involved in oligodendrocyte progenitor migration". Glia. mars 1999.



Annexe 1 – L'échelle de l'EDSS est graduée de 0 à 10 et sert d'outil pour l'évaluation de l'invalidité

Tableau 5 - Tableau récapitulatif des critères révisés de McDonald pour le diagnostic de SEP (3).	
Présentations cliniques	**Données supplémentaires afin de poser le diagnostic de SEP**
≥ 2 poussées avec signes cliniques objectifs de ≥ 2 lésions	Aucune
≥ 2 poussées avec signes cliniques objectifs d'une lésion **ET** un antécédent caractéristique de SEP (sémiologie, évolution)	Aucune
≥ 2 poussées avec signes cliniques objectifs d'une lésion	La dissémination dans l'espace pourra être retenue si : - l'IRM montre ≥ 1 lésion dans 2 des 4 régions caractéristiques de SEP (périventriculaire, juxtacorticale, sous-tentorielle*, médullaire*) - ou si le patient présente une poussée dans un autre territoire
1 poussée avec des signes cliniques objectifs de ≥ 2 lésions	La dissémination dans le temps pourra être retenue si : - l'IRM montre la présence simultanée de lésions asymptomatiques dont certaines sont rehaussées par le gadolinium et d'autres non **OU** la présence d'une nouvelle lésion T2 et/ou d'une nouvelle lésion prenant le gadolinium (quel que soit le délai entre les deux clichés) - ou si le patient présente une nouvelle poussée
1 poussée avec des signes cliniques objectifs d'une lésion (SCI)	La dissémination dans l'espace pourra être retenue si : - l'IRM montre ≥ 1 lésion dans 2 des 4 régions caractéristiques de SEP (périventriculaire, juxtacorticale, sous-tentorielle*, médullaire*) - ou si le patient présente une poussée dans un autre territoire La dissémination dans le temps pourra être retenue si : - l'IRM montre la présence simultanée de lésions asymptomatiques dont certaines sont rehaussées par le gadolinium et d'autres non **OU** la présence d'une nouvelle lésion T2 et/ou d'une nouvelle lésion prenant le gadolinium (quel que soit le délai entre les deux clichés) - ou si le patient présente une nouvelle poussée
Aggravation progressive de symptômes neurologiques évocateurs de SEP (primaire progressive)	Présence d'une aggravation de la maladie sur un an (de manière rétrospective ou dans le cadre d'un suivi) **ET** deux des trois critères suivants : - mise en évidence d'une dissémination spatiale au niveau encéphalique (≥1 lésion T2 dans au moins 1 région caractéristique de la SEP (périventriculaire, juxtacorticale, sous-tentorielle) - mise en évidence d'une dissémination spatiale au niveau médullaire (≥ 2 lésions T2 médullaires) - Mise en évidence d'une synthèse intrathécale d'immunoglobulines (présence d'une augmentation de l'index IgG et/ou de bandes oligoclonales)
*si le patient présente une symptomatologie médullaire ou du tronc cérébral, la(les) lésion(s) symptomatiques n'est (ne sont) pas prise(s) en compte dans ce calcul	

Annexe 2 - Critères de McDonald révisés en 2010 diagnostic de la SEP. Ils permettent un diagnostic plus précoce de la SEP selon le tableau clinique du patient (155).

Molécules	Mécanisme d'action	Etudes précliniques/ cliniques (I-III) (nom de l'étude)	Personnes concernées et comparateur	Voies et doses	Résultats des études	Compagnie
Stratégie immunomodulatrice						
Ceralifimod (ONO-1641)	Agoniste S1P1 et S1P5, séquestre les lymphocytes dans les organes lymphoides	Phase II (DreaMS) vs placebo (156)	SEP-RR	VO 0.15mg, 0.1mg ou 0.05mg/jour en une seule prise	Non communiqué	Ono Pharmaceutical
GSK2018682	Agoniste du récepteur S1P1 et S1P5, séquestre les lymphocytes dans les organes lymphoides	Phase I (157)	Volontaires sains	VO	Non communiqué	GSK
Laquinimod	Module le shift des cytokines Th1 à Th2, stimule des facteurs neurotrophiques	Phase III (ALLEGRO) vs placebo (158)	SEP-RR	VO 0.6mg/jour en une seule prise	↓23% le taux de rechute, ↓36% le risque de handicap, ↓37% des lésions et ↓33% atrophie cérébrale	Teva
		Phase III (BRAVO) vs placebo et interféron β1a (80)	SEP-RR		↓33.5% la progression du handicap, ↓27.5% de l'atrophie cérébrale Pas de différence des scores EDSS et du taux annualisé de poussée vs interféron β1a, mais une différence de l'atrophie cérébrale plus diminuée avec le laquinimod	

Siponimod	Agoniste sélectif S1P, empêche migration en des cellules immunitaires en dehors des tissus lymphatiques	Phase III (EXPAND) vs placebo (159)	SEP-SP	VO 2mg/jour en une seule prise	↓21%progression de la maladie après 3mois de traitement, ↓86,6% lésion T1, ↓81% lésion T2 (160)	Novartis
Ocrelizumab	Anticorps humanisé anti-CD20	Phase III (OPERA 1 et 2) vs interféron β1a	SEP-RR	IV 600mg tous les 6mois	↓46-47% taux de poussées, ↓37-43% la progression du handicap, ↓94-95% lésions gadolinium, ↓46-47% lésion T2N , ↓ 24% atrophie cérébrale (59)	Roche
Ofatumumab ***Arzerra®***	Anticorps anti-CD20, favorise la phagocytose des LB	Phase II vs placebo	SEP-RR	2 perfusions de 100mg, 300mg ou 700mg	Aucun développement d'anticorps anti-oftumumab, ↓ importante LB, ↓de l'activité de >99% des nouvelles lésions à l'IRM dans les 24 premières semaines (161)	Genmab/ Novartis
		Phase III en cours (ASCLEPIOS) vs placebo	SEP-RR et	SC 1 fois toutes les 4 semaines	Non communiqué	
Ozanimod	Agoniste du récepteur SP1PR1 et S1PR5, inhibe la migration des cellules immunitaires au site d'inflammation	Phase III en cours (SUNBEAM) vs interféron β1a (*Avonex®*)	SEP-RR	VO 0.5mg ou 1mg	Non communiqué	Celgene
		Phase III en cours (RADIANCE)			Non communiqué	

Ponesimod (ACT-128800) VO	Agoniste du récepteur de la sphingosine-1-phosphate SP1, empêche l'entrée des cellules du système immunitaire dans le cerveau	Phase III (OPTIMUM) en cours vs tériflunomide (162)	SEP-RR	VO 20mg/jour	Non communiqué	Actelion pharmaceuticals
Rituximab	Anticorps monoclonal chimérique anti-CD20	Etude de cohorte rétrospective de sécurité et d'efficacité en Suède	SEP-RR, SEP-SP et PP	IV 500 ou 1000mg tous les 6-12 mois	EDSS : inchangé (SEP-RR), et augmenté de 0.5 (SEP-SP) et de 1 (SEP-PP) (75)	Roche
Masitinib	Inhibiteur de la tyrosine kinase, réduit l'activation des LT	Phase II/III en cours vs placebo (163)	SEP-PP et SEP-SP	6mg/kg/jour	Résultats en cours sur l'efficacité et sur la sécurité du masitinib	AB Science
Stratégie d'amélioration de la remyélinisation						
Benztropin	Antagoniste récepteurs muscariniques M1 et M3, favorise la différenciation des oligodendrocytes	Préclinique (164)	-	-	-	-
Biotine (*Qizenday*® en ATU**)**	Vitamine H, active d'une coenzyme de la synthèse de la myéline	Phase III vs placebo (83)	SEP progressive	VO 100mg 3 fois/jour	Amelioration du handicap chez 13% des patients traités (mesure de l'EDSS et du TW25)	MedDay
		Phase III vs placebo (165)		VO 100mg/jour en une seule prise	Non communiqué	

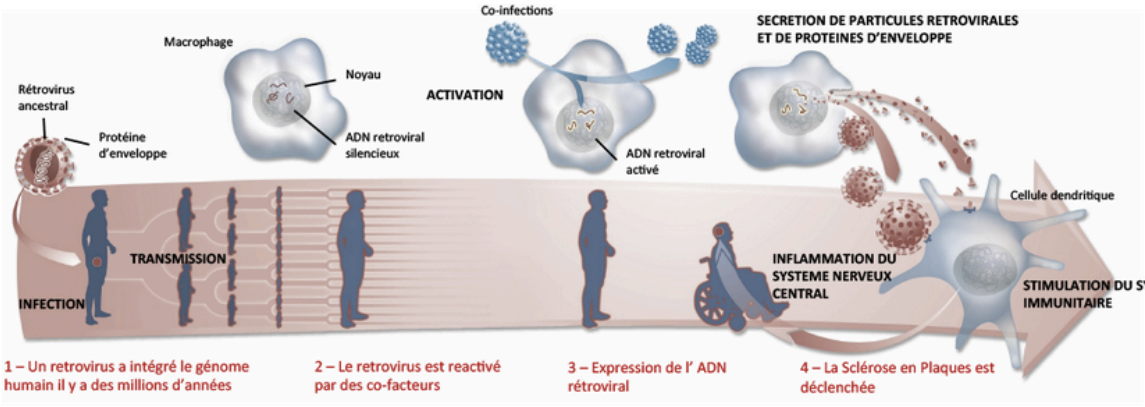
Clémastine	Anti-histamine, anti-muscarinique. Favorise la différenciation des OPCs en OLs (166), et accélérait la cinétique de remyélinisation (166)	Phase II en cours (ReBUILD) vs placebo (88)	SEP-RR	4mg deux fois par jour	Pré-résultats: Amélioration de l'examen des potentiels évoqués visuelles	-
Dompéridone	Elève la quantité de prolactine une protéine qui améliorait la réparation de la myéline (167)	Phase II en cours	SEP-SP	40mg/jour	Résultats en cours sur la prévention du handicap de la marche (mesure T25W)	-
Miconazole et Clobetazole	Antifongique- Module les cellules souches endogènes et augmente le nombre OLs lors de la remyélinisaition *in vivo* (168)	Préclinique (169)	-	-	-	-
Opicinumab Anticorps monoclonal humain anti-Lingo (BIIB033)	Favorise la différenciation des OPCs en OLs, en bloquant une protéine inhibitrice de la remyélinisation (Lingo) (170)(87)	Phase II SYNERGY vs placebo (171)MS	SEP-RR, SEP-SP	IV 3, 10, 30 ou 100mg/kg toutes les 4 semaines	Pas d'amélioration Clinique ou cognitive : échec de l'étude qui serait lié à l'incapacité de l'anticorps à franchir la BHE	Biogen
Bexarotene	Agoniste des récepteurs rétinoïdes X (RXRγ). Favorise la différenciation des OLs (172)	Préclinique (173)	SEP-RR	-	-	-

rHIGM22	Anticorps monoclonal recombinant humain dirigé contre des lipides de la myéline, réduit l'apoptose cellulaire (92) (93)	Phase I vs placebo (174)	SEP-RR après une poussée	Perfusion IV	Résultats en cours sur la sécurité et la tolérance de rHIGM22	Biogen

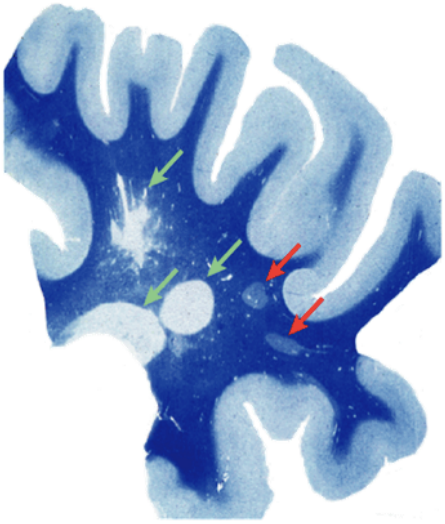
Annexe 3 - Tableau non exhaustif des molécules en cours d'études précliniques et cliniques et celles qui ont échoué

La sélection de ces molécules dans ce tableau ce justifie soit par rapport à leur avancée dans les étapes cliniques, soit parce qu'elles ont été médiatisées au cours de congrès nationaux sur la SEP organisés par l'ARSEP en 2016 et 2017 par des chercheurs biologistes, et par des médecins neurologues à réécouter suivant ces liens :

- *https://www.youtube.com/watch?v=6qsKNnKWVnI*
- *https://www.youtube.com/watch?v=pNbcVj91ySc*

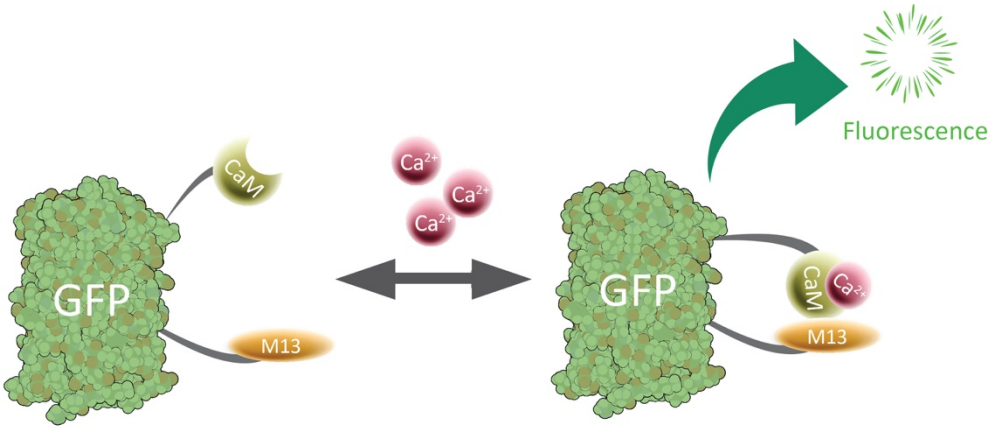


Annexe 4 - Mécanisme hypothétique en faveur d'une étiologie rétrovirale de la SEP (96)



Annexe 5 - Coupe *postmortem* de cerveau humain sur laquelle la myéline est marquée au luxol (en bleu) (142)

Cette image met en évidence des plaques démyélinisantes (pointées par les flèches vertes) et l'existence concomitante aux niveaux de certaines un phénomène de remyélinisation (pointé par les flèches rouges).



Annexe 6 - Structure schématique du marqueur calcique protéique GCaMP et son fonctionnement.

La GCaMP est capable de lier 4 molécules de calcium, cela induit un changement conformationnel de la protéine qui va ensuite pouvoir émettre de la fluorescence

LA SCLEROSE EN PLAQUES, PERSPECTIVES THERAPEUTIQUES :

ETUDE DES SIGNAUX CALCIQUES INTRACELLULAIRES DE LA LIGNÉE OLIGODENDROGLIALE AU COURS DE LA REMYELINISATION CHEZ LA SOURIS

RÉSUMÉ : La sclérose en plaques (SEP) est une maladie démyélinisante inflammatoire chronique du système nerveux central. En France, la SEP touche environ 80 000 personnes et représente la première cause de handicap sévère non traumatique chez les trentenaires. La maladie se caractérise par une perte progressive de la gaine de myéline détruite par le système immunitaire qui provoque la diminution de l'influx nerveux. Les thérapies actuelles ciblent uniquement des composantes inflammatoires.

Au niveau de certaines lésions démyélinisées, une réparation endogène de la gaine de myéline est possible mais reste partielle. Les cellules précurseurs d'oligodendrocytes (OPCs) sont la principale source de remyélinisation.
La transplantation de cellules souches est à l'étude pour réaliser une remyélinisation exogène des lésions absentes d'OPCs. Des anticorps anti-Lingo et anti-sémaphorine 4D sont notamment en cours d'essais cliniques pour favoriser la remyélinisation endogène des lésions où les OPCs persisteraient.
L'activité neuronale module la myélinisation et provoque des fluctuations calciques au niveau des OPCs. Le calcium régule la transcription de gènes impliqués dans la prolifération, différenciation des OPCs en oligodendrocytes et dans la myélinisation. La partie expérimentale de cette thèse étudie les mécanismes responsables des signaux calciques des OPCs au cours de la remyélinisation et tente de comprendre s'ils dépendent de l'activité neuronale chez un modèle murin.
Un progrès des connaissances sur la remyélinisation permettra peut-être la découverte de nouvelles cibles thérapeutiques pour réparer la gaine de myéline endommagée et éviter la neurodégénérescence.

MOTS CLÉS : Sclérose en plaques, traitements, remyélinisation, activité neuronale, calcium

ABSTRACT : Multiple sclerosis (MS) is a chronic demyelinating and inflammatory disease of the central nervous system. MS affects about 80 000 people in France and represents the first cause of non-traumatic disability among young adults (20-40 years old). The major disease's characteristic is the progressive loss of myelin sheath, which is destroyed by the immune system itself, provoking a diminution of the nerve impulse conduction.

The current medical therapies are only effective to target inflammatory components. A spontaneous reparation of the damaged myelin sheath in MS is well known, but unfortunately still partial. The main source of remyelination is oligodendrocyte precursor cells (OPCs). Stem cell transplantation is studied to achieve an exogenous remyelination of the lesions without OPCs. Furthermore, antibodies (anti-Lingo and anti-semaphorin 4D) are currently in clinical trials in order to promote an endogen remyelination of lesions with persisting OPCs.

Neuronal activity can modulate myelination and cause calcium increases in OPCs. The intracellular calcium of OPCs is known as a secondary messenger capable of regulating the transcription of genes, especially those involved in proliferation, differentiation of OPCs into OLs and in myelination. The main goal of the experimental work carried out in this thesis is to understand whether calcium signals depend on neuronal activity during remyelination with a murin model.

The development of remyelination knowledge will result in the discovery of new therapeutic targets and might restore the myelin sheath promoting neuroprotective therapeutic strategies in MS.

KEY WORDS: Multiple sclerosis, treatments, remyelination, neuronal activity, calcium

Auteur : Mathilde RICHARD [Données à caractère personnel]