



HAL
open science

Quantification biophysique du recrutement lymphocytaire : effets du Natalizumab

Clotilde Nodet

► **To cite this version:**

Clotilde Nodet. Quantification biophysique du recrutement lymphocytaire : effets du Natalizumab. Sciences pharmaceutiques. 2020. dumas-02990272

HAL Id: dumas-02990272

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-02990272>

Submitted on 5 Nov 2020

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.

THESE

PRESENTEE ET PUBLIQUEMENT SOUTENUE DEVANT LA
FACULTE DE PHARMACIE DE MARSEILLE

LE 29 OCTOBRE 2020

PAR

Mme Clotilde NODET

Né(e) le 11 Juillet 1996 à Salon-de-Provence

EN VUE D'OBTENIR

LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

TITRE :

Quantification Biophysique Du Recrutement
Lymphocytaire : Effets Du Natalizumab

JURY :

Président : Madame le professeur Nathalie BARDIN

Membres : Monsieur le professeur Philippe ROBERT
Madame le Docteur en Pharmacie Véronique NUHM

ADMINISTRATION

<i>Doyen :</i>	Mme Françoise DIGNAT-GEORGE
<i>Vice-Doyens :</i>	M. Jean-Paul BORG, M. François DEVRED, M. Pascal RATHELOT
<i>Chargés de Mission :</i>	Mme Pascale BARBIER, M. David BERGE-LEFRANC, Mme Manon CARRE, Mme Caroline DUCROS, Mme Frédérique GRIMALDI
<i>Conseiller du Doyen :</i>	M. Patrice VANELLE
<i>Doyens honoraires :</i>	M. Jacques REYNAUD, M. Pierre TIMON-DAVID, M. Patrice VANELLE
<i>Professeurs émérites :</i>	M. José SAMPOL, M. Athanassios ILIADIS, M. Jean-Pierre REYNIER, M. Henri PORTUGAL
<i>Professeurs honoraires :</i>	M. Guy BALANSARD, M. Yves BARRA, Mme Claudette BRIAND, M. Jacques CATALIN, Mme Andrée CREMIEUX, M. Aimé CREVAT, M. Bernard CRISTAU, M. Gérard DUMENIL, M. Alain DURAND, Mme Danielle GARÇON, M. Maurice JALFRE, M. Joseph JOACHIM, M. Maurice LANZA, M. José MALDONADO, M. Patrick REGLI, M. Jean-Claude SARI
<i>Chef des Services Administratifs :</i>	Mme Florence GAUREL
<i>Chef de Cabinet :</i>	Mme Aurélie BELENGUE
<i>Responsable de la Scolarité :</i>	Mme Nathalie BESNARD

DEPARTEMENT BIO-INGENIERIE PHARMACEUTIQUE

Responsable : Professeur Philippe PICCERELLE

PROFESSEURS

BIOPHYSIQUE

M. Vincent PEYROT
M. Hervé KOVACIC

GENIE GENETIQUE ET BIOINGENIERIE

M. Christophe DUBOIS

PHARMACIE GALENIQUE, PHARMACOTECHNIE INDUSTRIELLE,
BIOPHARMACIE ET COSMETIQUE

M. Philippe PICCERELLE

MAITRES DE CONFERENCES

BIOPHYSIQUE

M. Robert GILLI
Mme Odile RIMET-GASPARINI
Mme Pascale BARBIER
M. François DEVRED
Mme Manon CARRE
M. Gilles BREUZARD
Mme Alessandra PAGANO

GENIE GENETIQUE ET BIOTECHNOLOGIE

M. Eric SEREE-PACHA
Mme Véronique REY-BOURGARELPHARMACIE GALENIQUE, PHARMACOTECHNIE INDUSTRIELLE,
BIOPHARMACIE ET COSMETOLOGIEM. Pascal PRINDERRE
M. Emmanuel CAUTURE
Mme Véronique ANDRIEU
Mme Marie-Pierre SAVELLI

NUTRITION ET DIETETIQUE

M. Léopold TCHIAKPE

A.H.U.

THERAPIE CELLULAIRE

M. Jérémy MAGALON

ENSEIGNANTS CONTRACTUELS

ANGLAIS

Mme Angélique GOODWIN

DEPARTEMENT BIOLOGIE PHARMACEUTIQUE

Responsable : Professeur Philippe CHARPIOT

PROFESSEURS

BIOCHIMIE FONDAMENTALE, MOLECULAIRE ET CLINIQUE

M. Philippe CHARPIOT

BIOLOGIE CELLULAIRE

M. Jean-Paul BORG

HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE

Mme Françoise DIGNAT-GEORGE
Mme Laurence CAMOIN-JAU
Mme Florence SABATIER-MALATERRE
Mme Nathalie BARDIN

MICROBIOLOGIE

M. Jean-Marc ROLAIN
M. Philippe COLSO

PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE MEDICALE,
HYGIENE ET ZOOLOGIE

Mme Nadine AZAS-KREDER

MAITRES DE CONFERENCES

BIOCHIMIE FONDAMENTALE, MOLECULAIRE ET CLINIQUE

Mme Dominique JOURDHEUIL-RAHMANI
M. Thierry AUGIER
M. Edouard LAMY
Mme Alexandrine BERTAUD
Mme Claire CERINI
Mme Edwige TELLIER
M. Stéphane POITEVIN

HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE

Mme Aurélie LEROYER
M. Romaric LACROIX
Mme Sylvie COINTE

MICROBIOLOGIE

Mme Michèle LAGET
M. Michel DE MEO
Mme Anne DAVIN-REGLI
Mme Véronique ROUX
M. Fadi BITTAR
Mme Isabelle PAGNIER
Mme Sophie EDOUARD
M. Seydina Mouhamadou DIENE

PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE MEDICALE, HYGIENE ET ZOOLOGIE

Mme Carole DI GIORGIO
M. Aurélien DUMETRE
Mme Magali CASANOVA
Mme Anita COHEN

BIOLOGIE CELLULAIRE

Mme Anne-Catherine LOUHMEAU

A.H.U.

HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE

M. Maxime LOYENS

DEPARTEMENT CHIMIE PHARMACEUTIQUE

Responsable : Professeur Patrice VANELLE

PROFESSEURS

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION

Mme Catherine BADENS

CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET NUISANCES TECHNOLOGIQUES

M. Philippe GALLICE

CHIMIE MINERALE ET STRUCTURALE – CHIMIE THERAPEUTIQUE

M. Pascal RATHELOT
M. Maxime CROZET

CHIMIE ORGANIQUE PHARMACEUTIQUE

M. Patrice VANELLE
M. Thierry TERME

PHARMACOGNOSIE, ETHNOPHARMACOLOGIE, HOMEOPATHIE

Mme Evelyne OLLIVIER

MAITRES DE CONFERENCES

BOTANIQUE ET CRYPTOLOGAMIE, BIOLOGIE CELLULAIRE	Mme Anne FAVEL Mme Joëlle MOULIN-TRAFFORT
CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION	Mme Catherine DEFOORT M. Alain NICOLAY Mme Estelle WOLFF Mme Elise LOMBARD Mme Camille DESGROUAS
CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET NUISANCES TECHNOLOGIQUES	M. David BERGE-LEFRANC M. Pierre REBOUILLON
CHIMIE THERAPEUTIQUE	Mme Sandrine FRANCO-ALIBERT Mme Caroline DUCROS M. Marc MONTANA Mme Manon ROCHE
CHIMIE ORGANIQUE PHARMACEUTIQUE HYDROLOGIE	M. Armand GELLIS M. Christophe CURTI Mme Julie BROGGI M. Nicolas PRIMAS M. Cédric SPITZ M. Sébastien REDON
PHARMACOGNOSIE, ETHNOPHARMACOLOGIE, HOMEOPATHIE	M. Riad ELIAS Mme Valérie MAHIOU-LEDDET Mme Sok Siya BUN Mme Béatrice BAGHDIKIAN

MAITRES DE CONFERENCE ASSOCIES A TEMPS PARTIEL (M.A.S.T.)

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION	Mme Anne-Marie PENET-LOREC
CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET NUISANCES TECHNOLOGIQUES	M. Cyril PUJOL
DROIT ET ECONOMIE DE LA PHARMACIE	M. Marc LAMBERT
GESTION PHARMACEUTIQUE, PHARMACOECONOMIE ET ETHIQUE PHARMACEUTIQUE OFFICINALE, DROIT ET COMMUNICATION PHARMACEUTIQUES A L'OFFICINE ET GESTION DE LA PHARMAFAC	Mme Félicia FERRERA

A.H.U.

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION	M. Mathieu CERINO
--	-------------------

ATER

CHIMIE ANALYTIQUE	M. Charles DESMARCHELIER
CHIMIE THERAPEUTIQUE	Mme Fanny MATHIAS

DEPARTEMENT MEDICAMENT ET SECURITE SANITAIRE
Responsable : Professeur Benjamin GUILLET

PROFESSEURS

PHARMACIE CLINIQUE	Mme Diane BRAGUER M. Stéphane HONORÉ
PHARMACODYNAMIE	M. Benjamin GUILLET
TOXICOLOGIE GENERALE	M. Bruno LACARELLE
TOXICOLOGIE DE L'ENVIRONNEMENT	Mme Frédérique GRIMALDI

MAITRES DE CONFERENCES

PHARMACODYNAMIE	M. Guillaume HACHE Mme Ahlem BOUHLEL M. Philippe GARRIGUE
PHYSIOLOGIE	Mme Sylviane LORTET Mme Emmanuelle MANOS-SAMPOL
TOXICOCINETIQUE ET PHARMACOCINETIQUE	M. Joseph CICCOLINI Mme Raphaëlle FANCIULLINO Mme Florence GATTACECCA
TOXICOLOGIE GENERALE ET PHARMACIE CLINIQUE	M. Pierre-Henri VILLARD Mme Caroline SOLAS-CHEsNEAU Mme Marie-Anne ESTEVE

A.H.U.

PHARMACIE CLINIQUE	M. Florian CORREARD
PHARMACOCINETIQUE	Mme Nadège NEANT

CHARGES D'ENSEIGNEMENT A LA FACULTE

Mme Valérie AMIRAT-COMBRALIER, Pharmacien-Praticien hospitalier

M. Pierre BERTAULT-PERES, Pharmacien-Praticien hospitalier Mme Marie-Hélène BERTOCCHIO, Pharmacien-Praticien hospitalier Mme Martine BUES-CHARBIT, Pharmacien-Praticien hospitalier M. Nicolas COSTE, Pharmacien-Praticien hospitalier

Mme Sophie GENSOLLEN, Pharmacien-Praticien hospitalier M. Sylvain GONNET, Pharmacien titulaire

Mme Florence LEANDRO, Pharmacien adjoint M. Stéphane PICHON, Pharmacien titulaire

M. Patrick REGGIO, Pharmacien conseil, DRSM de l'Assurance Maladie

Mme Clémence TABELLE, Pharmacien-Praticien attaché Mme TONNEAU-PFUG, Pharmacien adjoint

M. Badr Eddine TEHHANI, Pharmacien – Praticien hospitalier M. Joël VELLOZZI, Expert-Comptable

Remerciements

Aux membres de mon jury,

Je remercie tout d'abord le *Professeur Philippe ROBERT*, pour sa gentillesse et sa bonne humeur quotidienne tout au long de mon stage hospitalier de 5^{ème} année, que j'ai effectué dans son équipe au laboratoire d'immunologie de la Conception. Ce stage m'a passionné, m'a permis de beaucoup apprendre dans le domaine de la recherche (moi, qui pourtant, ronchonnisais à l'idée de faire un stage hospitalier aussi long) et a surtout rendu possible la réalisation de cette thèse. Merci Philippe d'être ensuite devenu mon directeur de thèse et vive le chocolat !

Je remercie ensuite le *Professeur Nathalie BARDIN* d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse. C'est grâce à ses enseignements passionnants d'immunologie au cours de mes études, que je me suis dirigée vers le laboratoire d'immunologie de la Conception pour mon stage de 5^{ème} année, lors de la campagne des choix. Je vous remercie pour tout ce que vous m'avez appris !

Je remercie également ma tante, le *Docteur en Pharmacie Véronique PERRET* qui me fait l'honneur de compter parmi les membres de mon jury et pour qui, ce rôle tient autant à cœur.

À l'équipe du laboratoire « adhésion et inflammation » de la Conception,

Je remercie tout particulièrement la *technicienne de laboratoire Dominique TOUCHARD*, pour m'avoir enseigné la réalisation de toutes les manipulations, allant de la préparation des cellules et des surfaces aux expériences en chambre à flux, ce qui m'a permis de développer une totale autonomie au sein du laboratoire et de pouvoir exécuter les expériences décrites dans ma thèse.

À mes parents,

À qui je dédie une part dans ma réussite, pour m'avoir soutenue tout au long de ces longues études et surtout pour toute la logistique effectuée. Merci maman pour tous ces bons petits plats !

À mes grands-parents,

Qui nous ont quittés l'année dernière, mais qui doivent être très fiers de moi de là où ils reposent. Merci pour toutes les valeurs que vous m'avez transmises. Vous me manquez.

À Florence,

Merci pour tous ces bons moments de fous rires et de commérages qu'on a partagé depuis le lycée. Merci d'avoir été là, malgré nos chemins d'études qui ont pris des directions totalement différentes. Allez courage ma Flo, tu as bientôt fini toi aussi !

À Caroline,

Merci pour ces six années de pharmacie, qui par ta présence, m'ont laissées d'excellents souvenirs. Je pense à toutes les histoires « capitales » qu'on avait toujours à se raconter pendant les cours, pendant les goûter pris dans nos différents QG, mais également pendant les soirées films/pizzas, ou encore au moment des sorties chez Naf Naf. Merci pour tous ces moments de rigolade !

À Thomas,

Mon cœur, merci d'avoir toujours été là pour m'encourager dans les moments les plus difficiles lors de la rédaction de cette thèse. Merci de m'avoir laissé ton bureau et de t'être occupé des problèmes de forme que j'ai rencontré, tu es un amour.

« L'université n'entend donner aucune approbation, ni improbation aux opinions émises dans les thèses. Ces opinions doivent être considérées comme propres à leurs auteurs. »

I.	Introduction	1
1.	La sclérose en plaques	1
1.1	Définition.....	1
1.2	Epidémiologie.....	2
1.2.1	Incidence et prévalence	2
1.2.2	Répartition géographique.....	2
1.2.2.1	Dans le monde	2
1.2.2.2	En France.....	4
1.3	Etiologie.....	5
1.3.1	La susceptibilité génétique	5
1.3.2	Les facteurs environnementaux	6
1.3.2.1	Vitamine D et exposition aux UV :.....	6
1.3.2.2	Le virus d'Epstein-Barr (EBV) :.....	6
1.3.2.3	Tabac :	6
1.3.2.4	Hygiène :	7
1.4	Physiopathologie.....	7
1.4.1	L'encéphalomyélite aiguë expérimentale.....	8
1.4.2	Les plaques de démyélinisation et l'inflammation	9
1.5	Diagnostic.....	10
1.6	Evolution et complications.....	11
1.7	Thérapeutiques	14
1.7.1	Le traitement des poussées	14
1.7.2	Les traitements de fond	14
1.7.2.1	Classiques (avant le natalizumab)	15
a.	1 ^{ère} ligne : les immunomodulateurs :	15
b.	2 ^{ème} ligne : les immunosuppresseurs :.....	17
1.7.2.2	Introduction du Natalizumab (Tysabri®)	18
1.7.2.3	Après le natalizumab :.....	19
a.	1 ^{ère} ligne : du côté des immunomodulateurs :	19
b.	2 ^{ème} ligne : du côté des immunosuppresseurs :	19
c.	L'Avenir... La neuroprotection et la remyélinisation :	20
1.7.3	Les traitements symptomatiques	21
2.	Le recrutement leucocytaire et l'adhésion dans l'inflammation	22
2.1	Général.....	22
2.1.1	L'immunité innée et l'immunité adaptative	22
2.1.2	L'endothélium vasculaire	24
2.1.3	Les étapes du recrutement leucocytaire	27
2.2	Spécificités du SNC	28
2.3	Le cas de la SEP.....	30
3.	Le natalizumab, les intégrines et leurs ligands	32
3.1	Structure du natalizumab.....	32
3.2	L'intégrine $\alpha 4\beta 1$	33
3.2.1	Structure	33
3.2.2	Expression	36
3.2.3	Les différentes conformations et l'affinité pour le ligand	37
3.3	Les ligands de l'intégrine $\alpha 4\beta 1$	38
3.3.1	VCAM-1	38
3.3.2	La fibronectine	40
3.3.3	JAM-2 (ou JAM-B)	41
3.3.4	Le cas de Madcam-1	42
3.4	Liaison du natalizumab à l'intégrine $\alpha 4\beta 1$	43

4. Méthodes d'exploration de l'adhésion cellulaire	45
4.1 La méthode classique.....	45
4.2 La chambre à flux laminaire	46
5. Principe de l'étude	48
II. Matériel et méthodes	49
1. Préparation des cellules T.....	49
2. Préparation des surfaces	51
3. Culture des cellules endothéliales	53
4. Systèmes complet matériel et microscopes.....	53
5. Logiciels	56
III. Résultats	60
1. Sur surfaces modèles recouvertes de VCAM-1 (données préalables du laboratoire)	60
1.1 Avec les LTM traités par natalizumab	60
1.1.1 Expérience de capture	61
1.1.2 Expérience de migration	61
1.2 Avec les LTM traités par un Fab de natalizumab.....	63
1.2.1 Expérience de capture	63
1.2.2 Expérience de migration	64
2. Sur surfaces modèles recouvertes de fibronectine (expériences réalisées en partie durant cette thèse)	64
3. Culture des cellules endothéliales	65
IV. Discussion	69
V. Conclusion.....	72
VI. Liste des abréviations	73
VII. Liste des figures	75
VIII. Bibliographie.....	77

I. Introduction

1. La sclérose en plaques

1.1 Définition

La sclérose en plaques (SEP) est une maladie inflammatoire auto-immune du système nerveux central (SNC) exclusivement : ses cibles seront donc le cerveau et la moelle épinière. On note cependant une exception hors SNC qui est l'atteinte du nerf optique car, dérivé au niveau embryologique du pédicule optique, il est constitué de prolongement de cellules du SNC (1).

Le terme « sclérose en plaques » désigne des composantes caractéristiques de la maladie :

- Sclérose : pour la dégénérescence entraînée des tissus atteints du SNC.
- Plaques : pour l'aspect histologique historique des lésions décrit pour la 1^{ère} fois par le docteur Charcot en 1868 (2). Aujourd'hui ces lésions aux aspects de plaques sont observables par l'imagerie de résonance magnétique (IRM).

Cette dégénérescence est causée par la destruction de la gaine de myéline, substance qui permet la transmission de l'influx nerveux et qui englobe les axones des neurones. Cette destruction est d'origine auto-immune, puisque ce sont nos propres cellules immunitaires présentes à l'état physiologique en tant que cellules circulantes dans le sang, qui vont franchir la barrière hémato-encéphalique (BHE) et rentrer dans le SNC pour s'attaquer à la gaine de myéline des axones. Les cellules incriminées principalement sont les lymphocytes T, une catégorie de leucocytes, qui jouent un rôle primordial dans la réponse immunitaire secondaire et dont la maturation se fait dans le thymus (d'où le T pour thymus). Ceci aboutira dans tous les cas à une perturbation de la transmission de l'influx nerveux et aura des conséquences symptomatiques plus ou moins

importantes selon la localisation des lésions. Toutefois, l'évolution de ces lésions reste imprévisible.

1.2 Epidémiologie

1.2.1 Incidence et prévalence

La sclérose en plaques est la première cause de handicap non traumatique chez l'adulte jeune en France. Elle affecte aujourd'hui plus de 110 000 personnes en France, 400 000 en Europe et 2,3 millions dans le monde. Son incidence en France est en augmentation avec 5 000 nouveaux cas diagnostiqués chaque année. Sa prévalence, comprise entre 80 et 123 cas pour 100 000 habitants en France, est particulièrement élevée chez les adultes jeunes puisque l'âge moyen de la maladie se situe entre 20 et 40 ans. Une autre particularité est qu'elle est prépondérante dans la population féminine avec un sex-ratio femmes/hommes de 2,6 (3).

On note également de façon sporadique des formes pédiatriques (débutant avant 18 ans) ainsi que des formes tardives (débutant après 40 ans) (3).

1.2.2 Répartition géographique

1.2.2.1 Dans le monde

Les données épidémiologiques nous permettent d'observer que la répartition de la SEP dans le monde n'est pas uniforme. Bien qu'ayant leurs limites, ce sont des outils importants pour mettre en place les moyens de prise en charge des patients et pour en trouver ses causes.

Tout d'abord, le nombre de cas de SEP est plus important dans les régions tempérées que tropicales et atteint son maximum dans les pays industrialisés. Le nombre de personnes atteintes augmente dans chaque hémisphère, lorsque l'on s'éloigne de l'équateur vers les pôles (4).

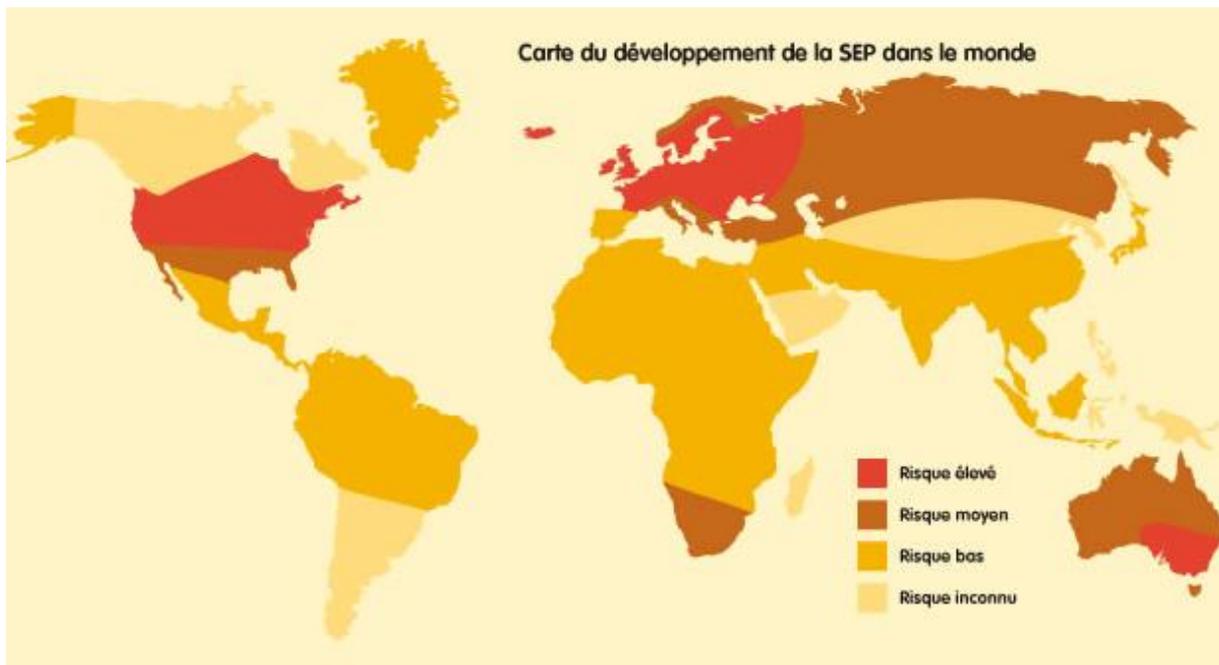


Figure 1 Répartition de la SEP dans le monde, d'après Milo et Al 2003.

Cette augmentation visible de la prévalence avec la latitude a été décrite en premier par J.F Kurtzke et a appelé ce phénomène « le gradient de latitude ». Il a ainsi défini trois zones de prévalence dans le monde (5) :

- Une zone de forte prévalence (> 30 cas pour 100 000 habitants) incluant le Nord de l'Europe, le Nord des Etats Unis et du Canada, le Sud de l'Australie et de la Nouvelle Zélande.
- Une zone de moyenne prévalence (5 à 30 cas pour 100 000 habitants) incluant le Sud de l'Europe et des Etats Unis et le Nord de l'Australie.
- Une zone de faible prévalence (< 5 cas pour 100 000 habitants) comprenant l'Asie, l'Amérique du Sud et l'Afrique.

1.2.2.2 En France

La France a une position géographique intéressante puisqu'elle se situe entre des zones de fortes (le Nord) et de faible prévalence (le Sud) en Europe, décrites par Kurtzke en 1975 (5).

Cette répartition hétérogène de la maladie existe aussi sur le territoire français. En effet, la SEP a une prévalence particulièrement élevée dans le Nord-Est de la France tandis que le Sud-Ouest ne demeure que très faiblement touché (6).

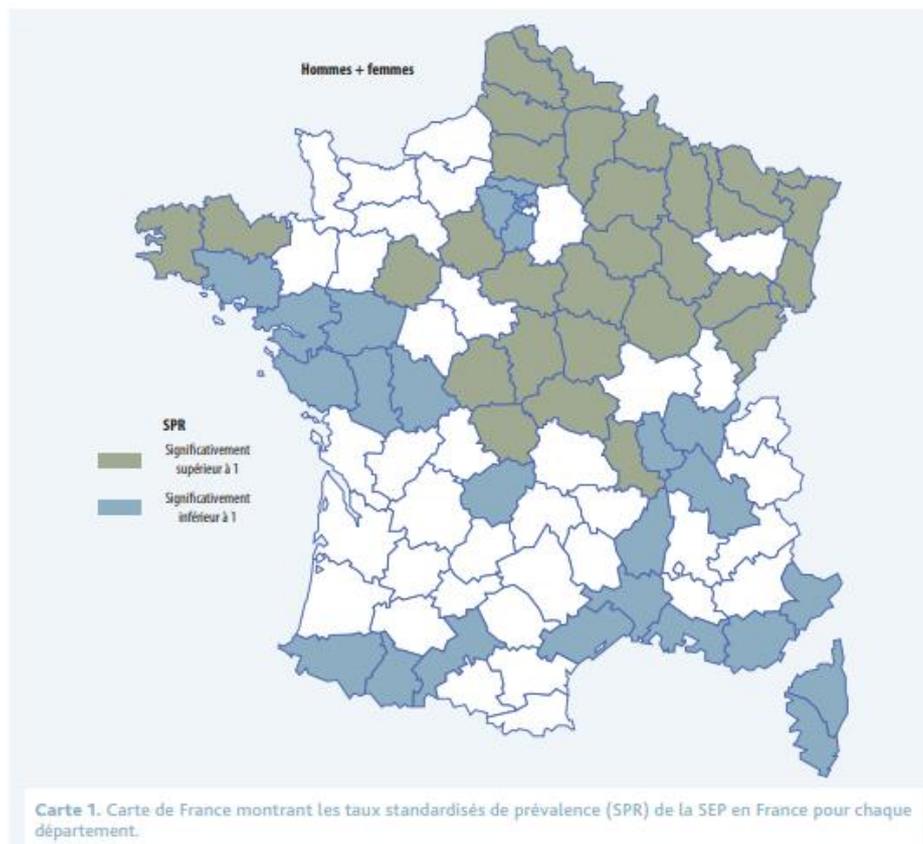


Figure 2 Répartition de la SEP en France d'après Fromont et Moreau, *La lettre de neurologie* 2009.

1.3 Etiologie

L'étiologie exacte de la SEP, encore inconnue aujourd'hui, suscite de nombreuses questions. Il s'agit d'une maladie acquise, donc non héréditaire. Comme la plupart des maladies auto-immunes, elle apparaît le plus probablement comme une maladie multifactorielle résultant d'une implication étroite et complexe entre des susceptibilités génétiques individuelles et des facteurs environnementaux (tabac, exposition aux UV, hygiène) et infectieux (infection par l'Epstein Barr Virus) (7).

1.3.1 La susceptibilité génétique

Tout d'abord il est important de différencier susceptibilité génétique et maladie génétique, cette dernière étant responsable des maladies mendéliennes héréditaires. Dans une maladie héréditaire, une mutation précise sur un gène déterminé est transmise qui fait que l'on naît avec un gène défectueux codant pour une protéine anormale, incapable d'accomplir sa fonction ou altérant la quantité de protéine fonctionnelle. Une maladie se développe donc dans tous les cas, inévitablement, sans qu'aucun autre facteur entre en jeu.

A l'inverse une susceptibilité génétique est portée par un groupe de gènes, mais ceux-ci sont normaux dans leur fonctionnement. Il faut donc obligatoirement une conjonction avec l'intervention d'autres facteurs, exogènes, pour que la maladie se développe (8).

La susceptibilité génétique de la SEP a été démontrée à la suite d'études épidémiologiques menées dans des familles où plusieurs membres étaient atteints. Il a été mis en évidence que le risque de développer la SEP était de 30 % pour des jumeaux monozygotes si un des deux jumeaux l'avait déjà contracté, puis diminuait à 7 % pour des jumeaux dizygotes et à moins de 5 % pour des frères et sœurs (9). Il s'en est suivi d'études d'associations pangénomiques pour mettre en évidence les gènes de susceptibilité et il est apparu clairement que les gènes incriminés étaient associés à la réponse immunitaire, le plus significatif étant celui codant pour le CMH-II (10).

1.3.2 Les facteurs environnementaux

Depuis plus de 30 ans, l'impact des facteurs environnementaux a été démontré dans la SEP mais nous ne pouvons en citer un avec une certitude absolue. Nous allons donc évoquer succinctement ceux dont les données scientifiques sont les plus nombreuses (8).

1.3.2.1 Vitamine D et exposition aux UV

Les données épidémiologiques ont permis de mettre en évidence une superposition entre les régions de France peu ensoleillées et une prévalence élevée de la SEP (6). Sachant que le soleil permet de produire la vitamine D et que celle-ci a un rôle connu sur le système immunitaire (11), des données expérimentales ont rejoint ces données épidémiologiques en confirmant des taux effondrés de vitamine D chez les sujets atteints de SEP (12). La supplémentation de vitamine D chez les patients atteints de SEP reste encore à évaluer, bien qu'elle soit systématique chez ceux en hypovitaminose D (12).

1.3.2.2 Le virus d'Epstein-Barr (EBV)

De nombreuses études sont en faveur de l'association de l'EBV et de la SEP. À la suite d'études de cristallographie, on a remarqué que l'EBV possédait une similitude de structure avec la protéine basique de la myéline. Ainsi le système immunitaire, préalablement développé pour neutraliser l'EBV, serait en situation de confusion et par similitude s'attaquerait à la myéline (8).

1.3.2.3 Tabac

Des méta-analyses suggèrent que le risque de SEP est augmenté chez les patients fumeurs par rapport aux non-fumeurs et que ce risque augmente avec le nombre de cigarettes fumées par jour. Il semble également que les patients fumeurs développent une maladie plus sévère que les non-fumeurs (13).

1.3.2.4 Hygiène

La chute vertigineuse des maladies infectieuses dans nos sociétés occidentales au cours de ces dernières décennies a été marquée par une inversion de tendance de la courbe des maladies auto-immunes qui, elles, explosent (14). En effet, les infections par des agents pathogènes nous font produire plus de lymphocytes, en particulier ceux impliqués dans la régulation de notre système immunitaire, les lymphocytes T régulateurs, qui contrôlent les lymphocytes auto-réactifs (8). La chute de ces maladies infectieuses serait donc un facteur favorable à l'apparition d'une auto-immunité par une trop grande tolérance immunitaire.

1.4 Physiopathologie

La sclérose en plaques est une maladie inflammatoire touchant le système nerveux central. Sur le plan mécanistique, il s'agit d'une maladie auto-immune dans laquelle les cellules du système immunitaire circulant dans le sang infiltrent le SNC et sont responsables de lésions démyélinisantes, lésions dans lesquelles on peut observer une inflammation focale chronique et des dommages cellulaires irréversibles (15). Ceci entraîne une altération de la conduction nerveuse pouvant aller jusqu'à la perte axonale. La gaine de myéline peut cependant aussi être réparée (figure 3).

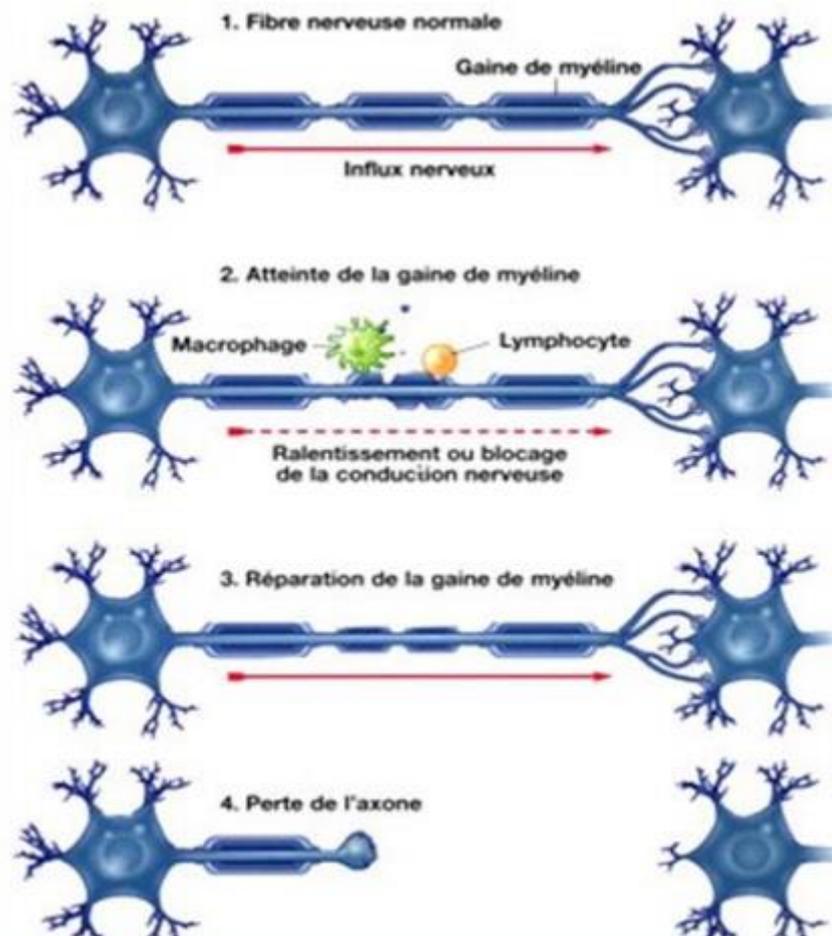


Figure 3 Physiopathologie de la SEP, d'après Camdessanche 2004.

1.4.1 L'encéphalomyélite aiguë expérimentale

Décrite pour la 1^{ère} fois au XIX^{ème} siècle, la physiopathologie de la SEP reste malgré tout encore obscure. C'est l'existence d'un modèle animal, l'encéphalomyélite aiguë expérimentale (EAE), qui a permis de mieux comprendre les acteurs cellulaires et moléculaires impliqués dans la formation des lésions de la SEP. Ce modèle, basé sur l'immunisation d'un animal contre un peptide ou une protéine de la myéline, a mis en évidence une action centrale de la maladie qu'est l'activation des cellules lymphocytaires T CD4⁺. Le modèle animal ayant ses limites, des prélèvements de sang, de liquide céphalo-rachidien ou encore des prélèvements biopsiques ont permis de mettre en évidence un rôle des lymphocytes T CD8⁺ mais également des lymphocytes B (16).

Les LT CD4+, reste cependant les acteurs majeurs de la maladie. En effet, ces cellules sont, avec les macrophages, caractéristiques de l'infiltrat inflammatoire présent au sein des lésions de démyélinisation avec une répartition oligoclonale (17).

1.4.2 Les plaques de démyélinisation et l'inflammation

Les plaques de démyélinisation et l'inflammation caractérisent la maladie. Les plaques peuvent apparaître au sein de toute la zone myélinisée du SNC, ce qui explique la diversité des signes cliniques. Elles sont de tailles variables et d'âge différent. Leur nombre, leur taille, leur localisation et leur forme varient d'un patient à l'autre. Il existe des zones de prédilection à leur apparition telles que les aires périventriculaires, le nerf et le chiasma optique, la substance blanche hémisphérique, le tronc cérébral, le cervelet et la moelle épinière (18).

La formation de ces plaques est précédée de plusieurs étapes. Tout d'abord une inflammation est engendrée par les lymphocytes : c'est la rupture de la barrière hémato-encéphalique, on observe un œdème et une infiltration cellulaire massive de lymphocytes T et de macrophages dans le parenchyme du SNC. Des molécules pro-inflammatoires comme l'IFN γ ou le TNF α sont sécrétées. Ensuite, se produit le phénomène de démyélinisation et les débris sont phagocytés par les cellules microgliales, cellules immunitaires du SNC au rôle d'épuration des déchets. Il y a ensuite une remyélinisation partielle par les oligodendrocytes, déjà chargés à l'état physiologique de synthétiser la gaine de myéline. Mais, la limite de la fonction réparatrice des oligodendrocytes se situe à la toxicité qu'exerce les molécules pro-inflammatoires sur ceux-ci. Ainsi, avec le temps la remyélinisation ne pourra plus se faire, ce qui aboutira à la perte axonale, irréversible. Pour compenser l'espace vide, il se mettra donc en place la gliose astrocytaire c'est-à-dire la prolifération des astrocytes, cellules nerveuses aux fonctions de soutien et de protection des neurones. Grâce à leurs récepteurs aux composés neuroactifs, ils élaborent une réponse cellulaire adaptée à tout type de situation d'altération de l'homéostasie tissulaire. Ainsi toute lésion tissulaire du SNC induit une réponse nommée astrogliose où les astrocytes prolifèrent, s'hypertrophient, s'allongent et s'interconnectent (18). La transmission nerveuse ne s'effectue plus.

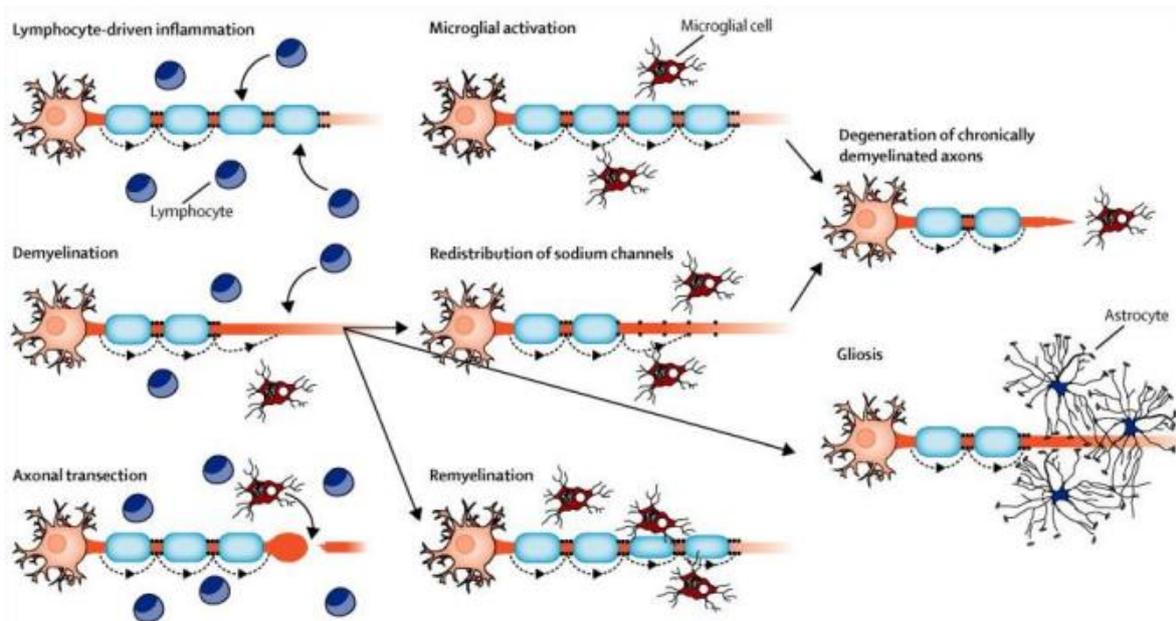


Figure 4 Pathogénèse de la SEP, D'après Compston et al 2008.

1.5 Diagnostic

Le diagnostic de la SEP est en pleine évolution. Aujourd'hui, on a une simplification des critères diagnostic avec surtout l'IRM qui s'est positionné au centre du diagnostic en cas d'apparition d'un symptôme ou d'un évènement mettant en évidence une inflammation du SNC, celui-ci permettant de visualiser directement les foyers inflammatoires.

Les symptômes probabilistes pouvant survenir sont variables :

- Une grande fatigue et des difficultés de concentration,
- Des faiblesses ou des raideurs musculaires,
- Une baisse de la vue d'un œil, une vision double,
- Une anesthésie ou des sensations anormales,
- Des troubles de l'équilibre, des gestes imprécis,
- Une constipation et des troubles urinaires.

Le diagnostic actuel repose donc sur la présence de l'un de ces symptômes ou évènement suspicieux conjugué à la réalisation de différents IRM (d'après les critères de MacDonald de 2010 révisés en 2017). En parallèle, il est possible d'analyser le liquide céphalo rachidien en recherchant les bandes oligoclonales spécifiques.

Dans le passé, il fallait deux de ces symptômes additionnés à deux évènements différents pour poser le diagnostic.

Dans tous les cas, il s'agit d'un diagnostic d'exclusion évoqué lorsqu'il n'y a pas de meilleure explication. Sa composante évolutive d'atteintes en foyers multiples fait que le temps constitue un acteur majeur du diagnostic. L'IRM reste à la base de la surveillance qui se doit donc d'être renforcée en cas de suspicion (19).

1.6 Evolution et complications

Tout d'abord au niveau des plaques on distingue :

- Des plaques actives ou récentes où le processus de démyélinisation est en cours. On retrouve des infiltrats de LT CD4 et CD8 activés, des macrophages, des astrocytes acteurs de la gliose réactionnelle et un œdème signant la rupture de la BHE.
- Et des plaques non actives ou chroniques : ici le processus de démyélinisation est terminé, on note la perte des oligodendrocytes myélinoformateurs, une gliose cicatricielle et une perte axonale (20).

Ensuite, sur l'observation clinique on distingue trois formes évolutives de SEP qui se définissent selon des phases de poussées ou de progression (19). Une phase de poussées est une phase d'apparition rapide de symptômes qui persistent plusieurs jours puis s'améliorent, tandis qu'une phase de progression concerne une aggravation insidieuse des symptômes sur au moins 1 an.

On définit alors :

La SEP récurrente-rémittente (SEP RR) est la forme la plus courante (80 % des patients). Elle se caractérise par une alternance de successions de phases de poussées et de périodes de rémission de durées variables. Ces dernières permettent la récupération partielle ou totale des dommages neurologiques causés par les poussées (21), (22).

La SEP secondairement progressive (SEP SP) est l'évolution classique des patients atteints initialement de la forme récurrente-rémittente, après une période de 10 à 20 ans. On note une aggravation continue du handicap, avec ou sans poussées, sur une période de 6 à 12 mois (21), (22).

Et la SEP progressive primaire (SEP PP), la plus rare (15 % des cas), avec une aggravation continue de la maladie dès sa déclaration. Ainsi, dès le début de la maladie les fonctions neurologiques deviennent déficitaires et le handicap s'installe. Les périodes de stabilité, peu nombreuses, ne permettent pas d'améliorations significatives et les poussées sont difficiles à individualiser. Cette forme est prépondérante dans les SEP à débuts tardifs (après 40 ans) (21), (22), (23).

Les complications sont liées à l'installation du handicap. Elles ont pour causes soit l'accumulation de séquelles des poussées, soit la progression de la maladie ou les deux associées. Ces séquelles neurologiques sont responsables de handicaps de divers ordres : locomoteurs, cognitifs, des troubles de la vision, une grande fatigabilité, des troubles urinaires, des douleurs...Ceux-ci sont très variables selon les patients. Ils sont évalués et cotés par le médecin neurologue grâce l'échelle EDSS (Expanded Disability Status Scale) (19).

Cette échelle, établie par Kurtzke en 1983, est la plus utilisée aujourd'hui. Son score permet de suivre l'évolution du handicap généré par la SEP et est compris entre 0 (aucun déficit dû à la SEP) et 10 (décès lié à la SEP) après un examen neurologique standardisé.

SCORE	CRITERES
0.0	Examen neurologique normal (tous systèmes fonctionnels (SF) à 0; SF 1 mental acceptable).
1.0	Absence de handicap fonctionnel, signes minimes d'atteinte d'une des fonctions (SF 1, à l'exclusion du SF mental).
1.5	Absence de handicap fonctionnel, signes minimes dans plus d'un SF (plus d'un SF 1, à l'exclusion du SF mental).
2.0	Handicap minime d'un des SF (1 SF 2, les autres 0 ou 1).
2.5	Handicap minime dans 2 SF (2 SF 2, les autres 0 ou 1).
3.0	Handicap modéré dans un SF (1 SF score 3, les autres 0 ou 1) ; ou atteinte minime de 3 ou 4 fonctions (3 ou 4 SF 2 : les autres 0 ou 1), mais malade totalement ambulatoire.
3.5	Totalement ambulatoire, mais atteinte modérée dans un SF (SF 3) et 1 ou 2 SF 2; ou 2 SF 3 ; ou 5 SF 2 (les autres 0 ou 1).
4.0	Malade totalement autonome pour la marche, vaquant à ses occupations 12h par jour malgré une gêne fonctionnelle relativement importante : 1 SF à 4 (les autres 0 ou 1), ou association de niveaux inférieurs dépassant les limites des degrés précédents. Capable de marcher 500 m environ sans aide ni repos.
4.5	Malade autonome pour la marche, vaquant à ses occupations la majeure partie de la journée, capable de travailler une journée entière, mais pouvant parfois être limité dans ses activités ou avoir besoin d'une aide minime, handicap relativement sévère : un SF 4 (les autres 0 ou 1), ou association de niveaux inférieurs dépassant les limites des degrés précédents. Capable de marcher 300m environ sans aide ni repos.
5.0	Capable de marcher environ 200 m sans aide ni repos, handicap suffisamment sévère pour entraver l'activité d'une journée normale. (En général un SF 5, les autres 0 ou 1, ou association de niveaux plus faibles dépassant ceux du grade 4.0).
5.5	Capable de marcher environ 100 m sans aide ni repos ; handicap suffisamment sévère pour empêcher l'activité d'une journée normale. (En général un SF 5, les autres 0 ou 1, ou association de niveaux plus faibles dépassant ceux du grade 4.0).
6.0	Aide unilatérale (cane, canne anglaise, béquille) constante ou intermittente nécessaire pour parcourir environ 100 m avec ou sans repos intermédiaire. (En général association de SF comprenant plus de 2 SF 3+).
6.5	Aide permanente bilatérale (cannes, cannes anglaises, béquilles) nécessaire pour marcher 20 m sans s'arrêter. (En général association de SF comprenant plus de 2 SF 3+).
7.0	Incapable de marcher plus de 5 m même avec aide ; essentiellement confiné au fauteuil roulant; fait avancer lui-même son fauteuil et effectue le transfert; est au fauteuil roulant au moins 12 h par jour. (En général association de SF comprenant plus d'un SF 4+; très rarement, SF 5 pyramidal seulement).
7.5	Incapable de faire plus de quelques pas; strictement confiné au fauteuil roulant; a parfois besoin d'une aide pour le transfert; peut faire avancer lui-même son fauteuil mais ne peut y rester toute la journée; peut avoir besoin d'un fauteuil électrique. (En général association de SF comprenant plus d'un SF 4+).
8.0	Essentiellement confiné au lit ou au fauteuil, ou promené en fauteuil par une autre personne; peut rester hors du lit la majeure partie de la journée; conserve la plupart des fonctions élémentaires; conserve en général l'usage effectif des bras. (En général SF 4+ dans plusieurs systèmes).
8.5	Confiné au lit la majeure partie de la journée ; garde un usage partiel des bras ; conserve quelques fonctions élémentaires. (En général SF 4+ dans plusieurs systèmes).
9.0	Patient grabataire ; peut communiquer et manger. (En général SF 4+ dans plusieurs systèmes).
9.5	Patient totalement impotent, ne peut plus manger ou avaler, ni communiquer. (En général SF 4+ dans presque tous les systèmes).
10.0	Décès lié à la SEP.

Figure 5 Echelle EDSS, d'après Kurtzke 1983.

1.7 Thérapeutiques

Il n'existe pas de traitement curatif de la SEP. La thérapeutique repose ainsi sur 3 axes : le traitement des poussées (pour réduire leur durée et intensité), le traitement de fond (ayant pour objectif d'être adapté à la forme clinique) et le traitement des symptômes (pour améliorer la qualité de vie).

1.7.1 Le traitement des poussées

Le traitement classique de la poussée, ponctuel, repose sur l'administration intraveineuse (IV) d'un bolus de méthylprednisolone, le Solumédrol. Cette perfusion se fait à forte dose (de 500 mg à 1g par jour) sur trois heures pendant 3 à 5 jours. Une hospitalisation s'impose, elle peut être traditionnelle, de jour ou à domicile. Pendant cette période, une supplémentation en potassium est nécessaire pour contrer les effets minéralocorticoïdes de classe du Solumédrol et donc l'hypokaliémie. La courte durée du traitement ne justifie pas de régime sans sel strict pour l'hypernatrémie. Un protecteur gastrique est cependant nécessaire (19).

Une alternative à la perfusion existe il s'agit du Médrol, de la méthylprednisolone par voie orale, toujours à forte dose entre 500 mg et 1g par jour. Ceci correspond à 5 à 10 comprimés par jour pour une cure de 3 à 5 jours. L'avantage est que la surveillance peut se faire en hôpital de jour ou à domicile par une infirmière. Une adjonction concomitante de potassium et d'un protecteur gastrique est également nécessaire (19).

1.7.2 Les traitements de fond

Les traitements de fond reposent sur plusieurs principes. Tout d'abord leur indication est propre à chaque patient et dépend du moment de l'histoire de sa maladie. Ensuite, il est primordial de traiter tôt et enfin de traiter efficacement.

Parmi les molécules disponibles, certaines sont plus ou moins récentes et ont marquées une avancée majeure dans la prise en charge de la SEP comme le natalizumab, un anticorps monoclonal. Nous allons donc voir dans cette partie, ce que ce médicament a apporté à la thérapeutique de la SEP.

1.7.2.1 Classiques (avant le natalizumab)

Avant l'arrivée du natalizumab (AMM en 2006 en France), les traitements de fond reposaient sur deux lignes. La première ligne, constituée d'immunomodulateurs avec les interférons β et l'acétate de glatiramère, des médicaments d'exception et la deuxième ligne comportant un immunosuppresseur : la mitoxantrone, réservé à l'usage hospitalier. Il s'agit toutes de biothérapies injectables.

a. 1^{ère} ligne : les immunomodulateurs :

➤ Les interférons β :

Les interférons appartiennent à la famille des cytokines, de petites glycoprotéines de signalisation intercellulaire, sécrétées en très petite quantité en réponse à divers stimuli. Les interférons du type β sont particulièrement actifs dans la diminution des phénomènes inflammatoires, c'est donc ceux-ci qui ont un intérêt dans le traitement de la SEP.

Disponibles en France depuis les années 1995, il s'agit des molécules les plus anciennes disposant d'une AMM pour la SEP. Toutes les spécialités sont recombinantes et produites par génie génétique. On distingue les interférons β 1a glycosylés avec l'Avonex® et le Rebif® et les interférons β 1b non glycosylés avec le Bétaféron® (24), (25).

Ils sont indiqués au premier plan dans la SEP de type récurrente-rémittente évoluant par poussées en réduisant d'environ 30 % leur fréquence (25).

Leur mécanisme d'action repose sur une régulation de l'expression du gène sensible à l'IFN, après fixation sur les récepteurs de type 1 aux IFN se traduisant par :

- Une diminution de la synthèse des cytokines pro-inflammatoire (IL-2, IL-12, TNF α et IFN γ),
- Une augmentation de la synthèse des cytokines anti-inflammatoire (IL-4, IL-10 et IL-27),
- Et une inhibition du passage des lymphocytes T activés au travers de la BHE par une modulation de sa perméabilité (26).

Ils s'administrent en voie intramusculaire (Avonex®) ou sous cutanée (Rebif® et Bétaféron®) à raison d'une administration par semaine pour la voie intramusculaire et de 3 administrations par semaine pour la voie sous cutanée (25).

Les effets indésirables sont fréquents notamment les syndromes pseudo-grippaux, les réactions locales au point d'injection, les réactions d'hypersensibilité et les syndromes dépressifs (25). Après 1 à 2 ans de traitement il peut aussi apparaître des anticorps neutralisants anti-interférons corrélés à une annulation de l'efficacité clinique (27).

Il existe certaines contre-indications à la mise en place d'un traitement par interférons β :

- L'hypersensibilité aux interférons β ou à l'albumine humaine présente dans les solvants,
- Les formes secondairement progressives de SEP évoluant sans poussées,
- Les idées suicidaires ou les troubles dépressifs majeurs à l'instauration du traitement,
- La grossesse et l'allaitement,
- Les patients épileptiques avec une épilepsie non contrôlée (25).

➤ L'acétate de glatiramère (Copaxone®) :

Commercialisé depuis son obtention d'AMM en 2004, il s'agit d'un immunomodulateur synthétique composé de 4 acides aminés : la L-alanine, la L-lysine, la L-tyrosine et l'acide L-glutamique (28). Cette structure polypeptidique présente une similitude avec celle de la protéine basique de la myéline (potentiel antigène impliqué dans la physiopathologie de la SEP) déterminant ainsi son mécanisme d'action par une réaction de tolérance immunitaire (24).

Il est indiqué, comme les interférons β , dans les formes rémittentes de SEP et a une efficacité comparable (réduction de 30 % de la fréquence des poussées) (29).

Ils s'administrent en voie sous cutanée à raison de 3 administrations par semaine.

Les effets indésirables les plus fréquents sont des réactions au site d'injection (érythème, induration...), des réactions immédiates mais transitoires (bouffées vasomotrices, oppression thoracique...) mais également des nausées, une asthénie et des céphalées. Il existe également une possible immunogénicité avec la formation d'anticorps neutralisants sur le long terme (28).

La seule contre-indication est l'hypersensibilité au produit ou à l'un des composants.

b. 2^{ème} ligne : les immunosuppresseurs :

➤ La Mitoxantrone (Elsép®) :

Indiquée dans la SEP depuis 2003, c'est une molécule de la famille des anthracyclines antérieurement déjà connue et utilisée en cancérologie sous un autre nom de spécialité, le Novantrone® pour ses propriétés cytotoxiques. Ses propriétés immunosuppressives sur les LT, les LB et les macrophages ont été démontrées par L'EAE, puis mises en évidence dans les différents stades et sur les différentes lignées cellulaires de la démyélinisation auto-immune, via l'inhibition des cytokines inflammatoires comme le TNF α , l'IL-2 et l'IFN γ (30).

Elle est indiquée en 2^{ème} intention dans les formes hautement agressives de SEP de types récurrentes-rémittentes ou secondairement progressives. Son efficacité est très significative sur la fréquence des poussées (-70 %), le risque de progression du handicap (-83 %) et sur les lésions actives visibles sur l'IRM. Ces effets s'observent jusqu'à cinq ans sur les poussées et quatre ans sur le handicap (27), (24).

Cependant, la limite de son utilisation réside dans sa toxicité cardiaque de classe avec une dose totale cumulée de 120 mg maximum. Ceci correspond à 6 perfusions intraveineuses réparties en une injection intraveineuse par mois pendant 6 mois. Au-delà de cette dose, le traitement ne pourra plus être réadministré (31).

Les effets indésirables sont rares mais graves avec une leuconéutropénie, une leucémie aiguë ou encore une défaillance cardiaque.

Les contre-indications sont nombreuses :

- Allergie à l'un des composants,
- Insuffisance cardiaque,

- Troubles de l'hémogramme,
- Patients ayant déjà reçu un traitement à base de mitoxantrone ou d'anthracyclines,
- Grossesse et allaitement (31).

1.7.2.2 Introduction du Natalizumab (Tysabri®)

Le natalizumab a obtenu son AMM le 27 juin 2006 en France et auparavant en 2004 aux Etats-Unis (32). Il vient agrandir la 2^{ème} ligne de traitements de la SEP en se plaçant comme un nouveau représentant chez les immunosuppresseurs.

Il s'agit d'un anticorps monoclonal, le premier utilisé dans le traitement de la SEP. Son suffixe « -zumab » indique qu'il s'agit d'un anticorps monoclonal humanisé, c'est-à-dire qu'on a fixé sur une immunoglobuline humaine, les parties hypervariables d'un anticorps murin.

Son mécanisme d'action est le blocage sélectif de l'intégrine $\alpha 4\beta 1$ connue aussi sous le nom de VLA-4 (Very Late Antigen 4) et très fortement exprimée à la surface de certains sous-types de lymphocytes T. La liaison avec ses ligands, des molécules d'adhérence présentes sur les cellules endothéliales ne peut donc plus se faire, ayant pour effet un blocage de l'adhésion lymphocytaire et empêchant ainsi leur passage au travers de la BHE (33).

Le natalizumab est indiqué en monothérapie dans les formes très actives de SEP rémittentes-récurrentes malgré un traitement par interféron β ou acétate de glatiramère, mais aussi dans les SEP rémittentes-récurrentes sévères d'évolution rapide (34). Son efficacité est très bonne avec une réduction des poussées à 2 ans de 68% et une diminution de 42% de la progression de la maladie selon une étude anglaise (35). Une autre étude française, sortie en Avril 2019 et menée sur une période de 10 ans semble confirmer la très bonne efficacité du natalizumab allant jusqu'à la conclusion d'une inflexion de la maladie sur le long cours (36).

Réservé à l'usage hospitalier, il s'administre en voie intraveineuse à une dose mensuelle de 300 mg (34).

Ses effets indésirables sont rares mais graves avec un risque de réactivation du virus JC pouvant conduire à une leuco-encéphalite multifocale progressive (LEMP) potentiellement fatale (34), (37).

Ses contre-indications concernent notamment ce dernier effet indésirable avec :

- Les patients à risque de développer une LEMP ou présentant déjà cette affection,
- Les sujets immunodéprimés,
- Les pathologies cancéreuses évolutives,
- Et la grossesse et l'allaitement (34).

1.7.2.3 Après le natalizumab :

Après le natalizumab c'est l'arsenal thérapeutique des immunosuppresseurs qui s'est élargi en premier avec de nouveaux anticorps monoclonaux comme l'alemtuzumab ou l'ocrelizumab. Il y a eu également l'apparition des premières thérapies orales avec le fingolimod chez les immunosuppresseurs mais également le tériflunomide et le diméthylfumarate chez les immunomodulateurs.

a. 1ère ligne : du côté des immunomodulateurs :

Le tériflunomide (Aubagio®) et le diméthylfumarate (Tecfidera®) ont obtenus leur AMM en 2014. Il s'agit de deux thérapies orales, 1 prise par jour pour l'Aubagio® et 2 prises par jour pour le Tecfidera®, représentant ainsi une option très attractive aux immunomodulateurs injectables, ceux-ci étant disponibles pour la même indication : les formes rémittentes de SEP.

Par leur action anti-inflammatoire et immunomodulatrice, ils ont tous les deux montrés leur efficacité sur la réduction du taux annuel de poussées et l'apparition de nouvelles lésions à l'IRM. Des effets indésirables non graves sont attendus à l'induction du traitement comme des troubles gastro-intestinaux ou des bouffées vasomotrices (38).

On note deux contre-indications : l'hypersensibilité et la grossesse (tératogénicité de l'Aubagio®) (39) .

b. 2^{ème} ligne : du côté des immunosuppresseurs :

Le fingolimod (Gilenya®) a obtenu son AMM en 2011. Il s'agit d'un médicament d'exception, la 1^{ère} thérapie orale à émerger dans le cadre de la SEP. Modulateur des récepteurs à la sphingosine-1-phosphate, il engendre une immunodépression périphérique en empêchant la sortie des lymphocytes des ganglions lymphatiques (40). Il est indiqué dans les SEP très actives, au même titre que le natalizumab.

Il peut provoquer des effets indésirables sérieux comme des cancers cutanés ou mammaires. Il est contre-indiqué en cas d'immunodéficience, d'infections sévères actives, de cancers diagnostiqués et de grossesse et d'allaitement (41).

Deux anticorps monoclonaux humanisés ont aussi vu le jour :

L'alemtuzumab (Lemtrada®), un anticorps monoclonal anti-CD52, a obtenu son AMM en 2013. Il est indiqué dans les formes sévères de SEP rémittentes-récurrentes. Le CD52 est un antigène fortement exprimé à la surface des LT, LB, NK, monocytes et macrophages. Un anticorps dirigé contre cet antigène induit donc une déplétion lymphocytaire périphérique profonde et prolongée. Ses propriétés sont de diminuer les poussées annuelles et de stabiliser la maladie.

On note la possibilité d'effets indésirables graves de type auto-immuns par formation d'anticorps : Purpura thrombopénique immunologique, néphropathies à anticorps... La contre-indication est la SEP sans activité ou stabilisée (42).

L'ocrelizumab (Ocrevus®), le dernier sorti avec l'obtention de son AMM en 2018, est un anticorps monoclonal anti-CD20 et a donc comme cible spécifique les lymphocytes B (puisque'ils expriment fortement le CD20). Il est réservé au traitement des SEP progressives primaires.

Les premières études réalisées montrent une efficacité significative versus placebo, mais étant donné sa nouveauté, un plus grand recul est nécessaire pour montrer son efficacité et sa sécurité à long terme (43). Par ailleurs, des cas de neutropénies (44) et de pancréatites aiguës (45) ont été rapportés.

c. L'Avenir... La neuroprotection et la remyélinisation :

Des essais de remyélinisation sont en cours portant notamment sur les lignées oligodendrocytaires et leur voie de recrutement, de différenciation et de multiplication.

Les greffes de cellules souches mésenchymateuses apparaissent également comme une voie prometteuse.

Au sujet de la neuroprotection, elle est réalisée aujourd'hui mais de manière indirecte via les immunosuppresseurs, qui en modifiant les populations lymphocytaires favorisent le processus de réparation. Des travaux sont en cours pour de la neuroprotection directe, par blocage à l'aide d'un anticorps spécifique, de molécules contrecarrant la remyélinisation (46).

En résumé de ces deux lignes de stratégie thérapeutiques et selon les indications, il faudra évaluer le rapport bénéfice/risque entre :

- ✓ Les immunomodulateurs possédant une efficacité modeste et une tolérance moyenne, avec des effets indésirables existants mais non graves mais surtout un excellent profil de sécurité à long terme. Il ne faut cependant pas exclure la possibilité de non répondeurs et d'acquisition d'une immunogénicité.
- ✓ Et les immunosuppresseurs bien tolérés, avec une meilleure efficacité sur les poussées et une réduction du handicap à plus ou moins long terme. Mais, ils sont toutefois associés à des effets indésirables spécifiques très sérieux, potentiellement mortels (29).

1.7.3 Les traitements symptomatiques

Les traitements symptomatiques permettent d'améliorer la qualité de vie des patients. Ils nécessitent avec la conjonction des autres traitements, un accompagnement multidisciplinaire adapté à chaque patient. Ils sont variés, de nature médicamenteuse ou non médicamenteuse et dans ce dernier cas, basés sur l'hygiène de vie des patients. Le rôle d'accompagnement du pharmacien est essentiel. Nous allons en voir quelques exemples pour les symptômes les plus fréquemment rencontrés :

- Fatigue : Mantadix® (Amantadine), temps de repos, éviter le surmenage.
- Douleurs : anti-épileptiques, antidépresseurs, massages et relaxation.
- Spasticité : utilisation de myorelaxants comme le Zentiva® (Baclofène), étirements.

- Constipation : marche, hydratation, consommation de fibres, laxatifs doux.
- Troubles urinaires : famille des α -bloquants comme le Xatral® (Alfuzosine) ou anticholinergiques comme le Ditropan® (Oxybutinine).
- Dépression : rompre l'isolement, psychothérapie, antidépresseurs (19), (26).

2. Le recrutement leucocytaire et l'adhésion dans l'inflammation

Lorsqu'un agent étranger est reconnu dans l'organisme, la réaction inflammatoire se déclenche. Celle-ci active directement la réponse immunitaire innée, de première ligne, avant de laisser place à la réponse immunitaire adaptative, plus tardive mais plus spécifique. Cette dernière permet l'activation des lymphocytes et circulants dans le sang avec les polynucléaires neutrophiles et les monocytes sont attirés vers les sites inflammatoires. Ils vont devoir traverser l'endothélium vasculaire afin de rejoindre ces sites concernés. Ce passage se décompose en plusieurs étapes mettant en jeu des phénomènes d'adhésion.

Nous allons donc voir dans cette partie, premièrement ce qui se passe dans un phénomène inflammatoire de façon classique, avant de s'intéresser aux spécificités du SNC pour ensuite parler de ces mêmes événements dans le cas de la SEP.

2.1 Général

2.1.1 L'immunité innée et l'immunité adaptative

L'efficacité de la réponse immunitaire nécessite l'étroite collaboration entre nos deux types d'immunités : l'immunité innée et l'immunité adaptative. L'immunité innée ou immunité naturelle, constitue notre 1^{ère} ligne de défense face aux agents étrangers. De mise en place très rapide mais manquant de spécificité et donc vite dépassée, elle est le pilier de la cascade d'évènements immunitaires qui permettra l'élimination de l'agent étranger par la mise en marche de l'immunité adaptative. De nombreuses cellules en sont actrices toutes équipées de récepteurs spécifiques : les PRR (Pattern Recognition Receptor) capables de reconnaître des PAMPs (Pathogen Associated Molecular Patterns), des motifs moléculaires exprimés sélectivement par les pathogènes. Il existe différentes sortes de PRR de localisation membranaires ou cytoplasmiques. Ces cellules de l'immunité innée qui en sont équipées, sont les polynucléaires, les cellules endothéliales, les cellules NK, les cellules dendritiques et les macrophages. À la suite de l'activation d'un PRR il y a production de cytokines pro-inflammatoires (47). Après avoir reconnu, dégradé et apprêté un antigène, les cellules dendritiques et les macrophages, cellules présentatrice d'antigène (CPA) professionnelles, migrent vers les organes lymphoïdes secondaires pour initier la réponse immunitaire adaptative, représentée par les LT (CD4 et CD8) et les LB.

L'activation des LT naïfs dans les ganglions lymphatiques se fait à l'aide de 3 signaux simultanés :

- Un signal d'activation par présentation des peptides antigéniques, associés aux molécules du CMH de classe II pour les lymphocytes T CD4 (lymphocytes effecteurs) et aux molécules du CMH de classe I pour les lymphocytes T CD8 (lymphocytes cytotoxiques),
- Un signal de costimulation par interaction de B7 (sur la CPA) et de CD28 (sur le LT),
- Et un signal de différenciation selon les cytokines sécrétées par les CPA pour orienter le type de réponse immune.

Selon la réponse immunitaire à initier, on compte plusieurs voies de différenciation pour les LT CD4 :

- Le profil Th1 : pour une immunité à médiation cellulaire avec activation des macrophages, des NK et des LT CD8 (les lymphocytes cytotoxiques) à l'aide de l'interleukine 12 et favorisant ainsi la réponse inflammatoire.
- Le profil Th2 : médié par l'interleukine 4, pour une immunité à médiation humorale avec activation des LB qui se différencient en plasmocytes et produisent des anticorps.

- Le profil Th17 : de découverte récente, une voie de différenciation sous l'effet de l'interleukine 17.

Une fois les lymphocytes matures, ils rejoignent le pool de lymphocytes activés déjà matures et circulants dans le sang. De-là, il ne leur reste plus qu'à rejoindre les sites inflammatoires. Pour cela, ils vont devoir migrer au travers de l'endothélium vasculaire, le recrutement lymphocytaire commence (48).

2.1.2 L'endothélium vasculaire

L'endothélium vasculaire tapisse l'ensemble des vaisseaux et constitue une interface dynamique entre la circulation sanguine et l'espace périvasculaire. L'unité de base de l'endothélium est la cellule endothéliale, polarisée, avec son pôle apical du côté de la circulation sanguine et son pôle basolatéral en contact avec une membrane basale. Son contact direct avec les éléments circulants du flux sanguin à l'état physiologique, impose une régulation contrôlée de sa perméabilité qui peut être modulée. Ceci est en partie assuré par la présence de différents types de jonctions. On distingue alors :

- Les jonctions adhérentes qui permettent le lien entre les cellules endothéliales voisines mais également l'ancrage de ces cellules à la matrice extracellulaire. Elles sont donc prépondérantes en position basale et formées par l'interaction des domaines extracellulaires de deux VE – cadhérines (Vascular Endothelial Cadherin) et reliées au cytosquelette de la cellule par des caténines. La participation à la formation de ces jonctions peut également se faire de manière similaire via une autre protéine nommée PECAM (Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule).
- Les jonctions serrées, en forte concentration au niveau du pôle apical des cellules permettant l'imperméabilité directe vis-à-vis de la circulation sanguine. Elles sont formées par l'interaction entre des cadhérines et des occludines ou des cadhérines et des claudines. Les occludines et les claudines sont reliées au cytosquelette de la cellule par les protéines ZO 1, 2 et 3. Citons aussi la protéine JAM (Junctional Adhesion Molecule) permettant le maintien de la structure de ces jonctions mais jouant également un rôle dans la transmigration des leucocytes (49), (50).

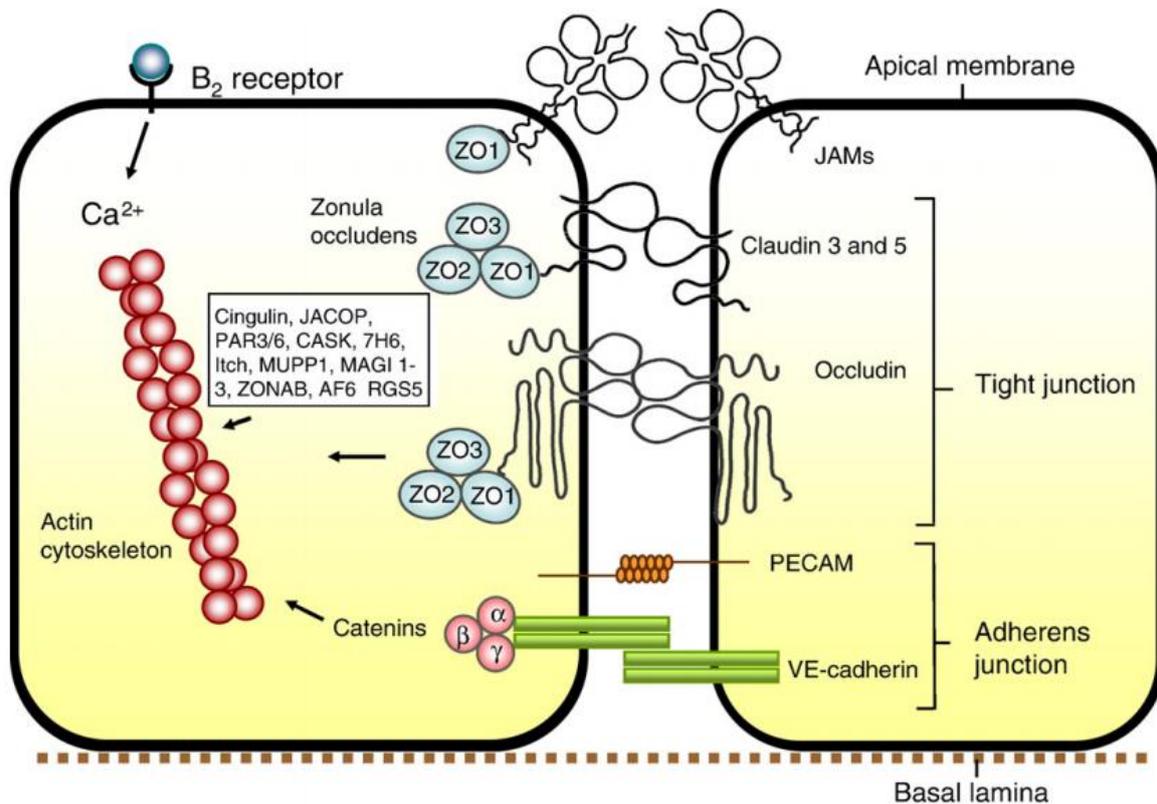


Figure 6 Les différentes molécules impliquées dans les jonctions serrées et adhérentes, d'après Abbott et Al, *Neurobiology of disease*, 2007.

Ensuite l'imperméabilité mais surtout l'action antiadhésive de l'endothélium à l'état physiologique est assurée par le glycocalyx du versant luminal des cellules endothéliales (51). Le glycocalyx est l'ensemble des molécules portant des résidus de sucre et présentes à la surface de l'endothélium. Il est composé essentiellement de glycosaminoglycanes et de protéoglycanes, des molécules très hydratées qui forment une couche épaisse à l'image d'un gel. Chargées négativement au pH physiologique, elles ont la capacité de s'assembler avec des composants plasmatiques, notamment l'albumine pour former un assemblage fonctionnel gagnant en densité. Cette structure est très impliquée dans le trafic leucocytaire (50).

Ses caractéristiques antiadhésives et anti-coagulantes bien que très contrôlées en situation physiologique se modifient lors de l'inflammation et fait de la cellule endothéliale une cellule de l'immunité innée à part entière. Les cellules endothéliales possèdent de nombreux PRR à leur surface et dans leur cytoplasme qui leur confèrent la capacité de détecter les PAMPs, agents pathogènes circulants dans le sang. En cas de reconnaissance d'un PAMP par un PRR de la cellule endothéliale, il y a production de cytokines pour déclencher la réponse inflammatoire, via l'activation de la voie NF-κB entraînant la synthèse d'IL-8 et d'IL-18, d'IFN-β et de TNF-

α (52). Le glycocalyx perd très rapidement ses fonctions et subit des dommages (51). Les jonctions adhérentes sont altérées par l'endocytose des VE-cadhérines. Il y a expression des molécules d'adhésion endothéliales avec les sélectines P et E, ICAM -1 et 2 mais aussi VCAM-1, présentes dans des vésicules d'exocytose. A ce stade-là, l'endothélium est hyper-perméable, il se produit une infiltration cellulaire et un œdème (50).

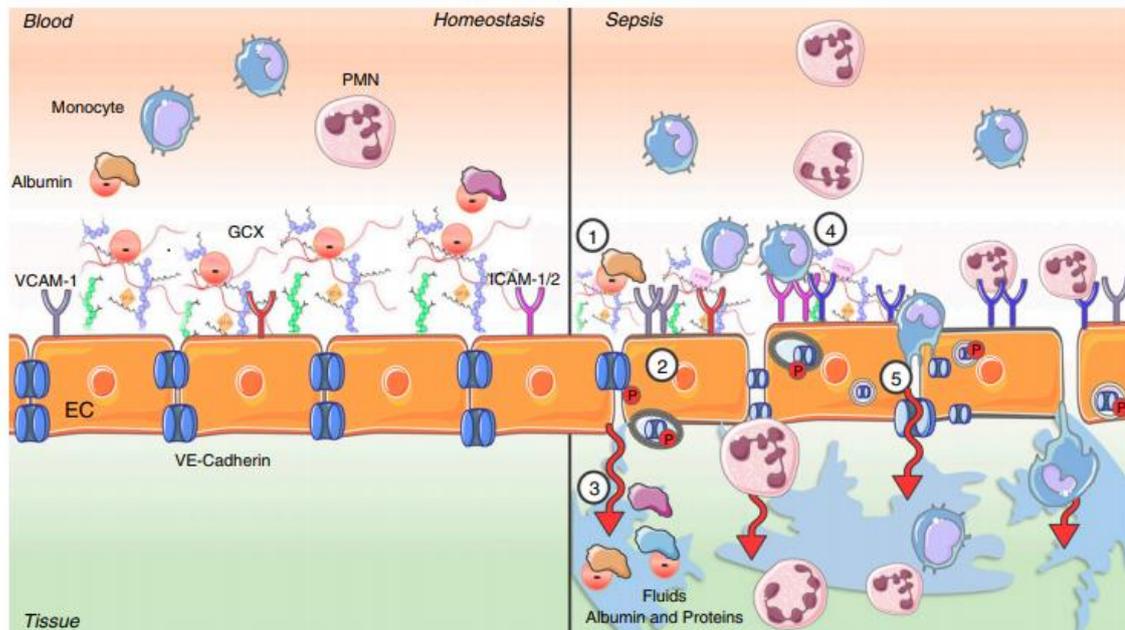


Figure 1. Sepsis worsens endothelial permeability and the proadhesive phenotype. Left: during homeostasis, the glycocalyx (GCX), a heparan sulfate-rich layer of glycosaminoglycans and proteoglycans, maintains local selective permeability and high reflection capability for albumin and leukocytes. Right: during sepsis, the GCX undergoes qualitative and quantitative alterations (1). Adherens junctions are impaired because of VE-cadherin endocytosis (2), causing exudation and capillary leak syndrome (3). Local chemokine production (4) and adhesion molecule expression (5) enhance leukocyte recruitment within inflamed tissues. EC = endothelial cell; ICAM-1/2 = intercellular cell adhesion molecule-1/2; PMN = polymorphonuclear neutrophil; VCAM-1 = vascular cell adhesion molecule-1; VE = vascular endothelial.

Figure 7 Homéostasie versus inflammation, d'après l'American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, Volume 202 numéro 3, 2020.

Ces changements de conformation proviennent de la nécessité du recrutement des leucocytes présents dans la circulation sanguine, le nombre de cellules directement présentes dans les tissus étant très limité. Les cellules concernées par le recrutement leucocytaire sont les polynucléaires neutrophiles, les monocytes et les lymphocytes T activés (53). En traversant l'endothélium vasculaire au niveau d'un site inflammatoire, ils se rendent ainsi dans l'espace périvasculaire pour rejoindre l'endroit où l'agent étranger a été détecté.

2.1.3 Les étapes du recrutement leucocytaire

Le recrutement leucocytaire est la résultante de divers mécanismes effecteurs décrits en général de manière séquentielle, mais qui en réalité se recouvrent dans le temps et dans l'espace.

La première étape du recrutement, est l'adhésion initiale entre les leucocytes et l'endothélium. Le stimulus inflammatoire déclenche à la surface de l'endothélium l'expression de sélectines : les sélectines P et E. Les P sélectines préformées, apparaissent rapidement en premier en étant libérées des grains de Wiebel Palade dans lesquels elles sont stockées. Les E sélectines, étant synthétisées de novo, apparaissent plus tardivement. Ces sélectines se lient à un motif sialyl-Lewis X de la molécule PSGL-1, présente sur les microvillosités leucocytaires. Cette adhésion est transitoire et met en jeu des liaisons faibles, mais produit un ralentissement des cellules qui se retrouvent à proximité de la paroi endothéliale.

Ce ralentissement est appelé le « rolling », la deuxième étape, où les leucocytes roulent le long des cellules endothéliales à vitesse lente, ce qui leur permet la détection des chimiokines sur la paroi vasculaire. Les intégrines leucocytaires sont alors à la portée de leurs ligands endothéliaux mais sont inactives pour le moment et les récepteurs aux chimiokines leucocytaires sont en contact avec les chimiokines inflammatoires sécrétées. Ce dernier contact entre les chimiokines et leurs récepteurs présents à la surface des leucocytes permet l'activation des intégrines leucocytaires telles que LFA-1 et VLA-4. Celles-ci se lient avec une forte affinité à leurs ligands endothéliaux respectivement ICAM-1/ICAM-2 et VCAM-1, eux aussi exprimés à la suite des stimuli inflammatoires à la surface de l'endothélium.

La résultante de ces liaisons est l'arrêt total des leucocytes sur l'endothélium. Une fois les cellules arrêtées, l'étape final a lieu avec la traversée de l'endothélium par diapédèse à l'aide, entre autre, de PECAM-1 aussi appelée CD31, par une interaction homodimérique (54), (55).

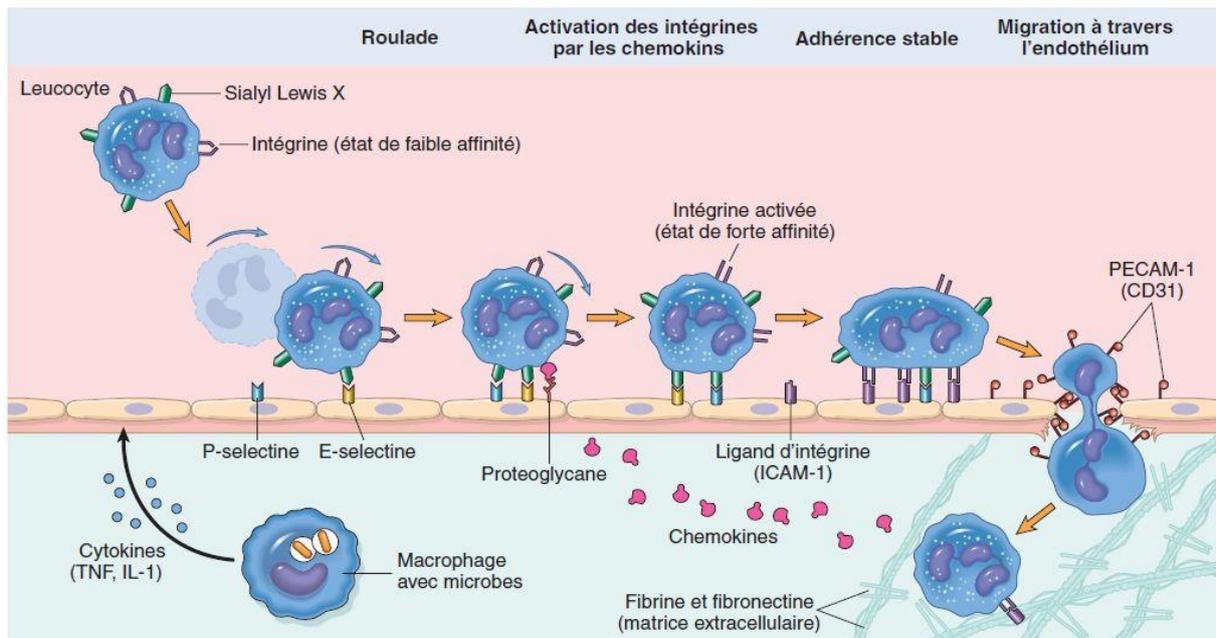


Figure 8 Les étapes du recrutement leucocytaire, d'après l'Université Médicale Virtuelle Francophone, l'inflammation 2012.

2.2 Spécificités du SNC

La transmission de l'influx nerveux dépend des neurones enveloppés de myéline. La myéline est formée par les oligodendrocytes dans le SNC, qui entourent et isolent les axones des neurones. Elle est composée d'une bicouche lipidique dans laquelle s'insère des protéines spécifiques comme MOG (Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein) ou PLP (Proteo Lipid Protein) (56). Entre deux zones de myélinisation, se trouve des segments amyéliniques appelés nœuds de Ranvier où se concentrent les canaux ioniques voltage-dépendants. La conduction de l'influx nerveux via la myéline est ainsi saltatoire et la vitesse de transmission est accélérée.

Pour assurer ses fonctions, le SNC doit s'assurer d'un microenvironnement hautement contrôlé. Richement vascularisé, le cerveau perçoit presque un quart du débit sanguin cardiaque total et chaque neurone possède son propre capillaire sanguin. Une vasculature spécialisée est à l'interface entre le sang et le SNC : la barrière hémato-encéphalique, qui permet le maintien de l'homéostasie du SNC. Elle assure des échanges et contrôles stricts entre le SNC et le compartiment sanguin via des systèmes de transports spécialisés pour les apports énergétiques et nutritifs, participe à l'évacuation des déchets et modère la transmigration des leucocytes vers

le SNC. Cette barrière étanche isole le SNC du reste de l'organisme, par un endothélium spécifique (57).

Cette spécificité endothéliale résulte tout d'abord de l'établissement d'un nombre très important de jonctions entre les cellules endothéliales. Les jonctions serrées sont prépondérantes au niveau de la BHE et permettent avec les jonctions adhérentes une étanchéité importante, plus restrictive que dans les autres organes, ne permettant même pas la simple diffusion passive de petites molécules (49). Cette imperméabilité est quantifiable électriquement par une mesure de la différence de potentiel entre deux électrodes. La valeur mesurée représente la résistance électrique trans-endothéliale ou TEER pour Trans Endothelial Electrical Resistance et plus les jonctions sont serrées, plus la valeur obtenue est importante. La caractéristique de la BHE est que cette valeur est beaucoup plus élevée que pour n'importe quel autre endothélium présent dans l'organisme (58). Elle confère ainsi au SNC un rôle primordial dans la régulation des phénomènes inflammatoires, puisqu'à l'état physiologique on ne retrouve qu'un tout petit nombre de cellules immunitaires dans le milieu extra-vasculaire du cerveau. Le système immunitaire du SNC se limite aux cellules microgliales, au rôle de macrophages.

Ensuite, une autre spécificité réside dans la localisation unique des cellules endothéliales entre le sang et les cellules du SNC. Il en découle des interactions complexes entre les cellules endothéliales, les neurones et les cellules gliales qui participent à l'étanchéité de la BHE. Les cellules endothéliales sont entourées d'une double membrane basale façonnant une matrice extra-cellulaire composée de fibronectine, de collagène et de protéoglycanes sur laquelle viennent se poser les pieds astrocytaires, prolongements des astrocytes, afin de stabiliser la structure de la BHE. Les astrocytes sont des cellules gliales aux multiples fonctions allant de la régulation neuronale au recyclage des neurotransmetteurs et aux phénomènes de réparations (59). Leur fonction dans le maintien de la BHE est capitale et connue depuis de nombreuses années, depuis qu'il a été montré, chez les souris transgéniques, que leur ablation provoquait une rupture de la BHE (60). Enfin, entre les astrocytes et les cellules endothéliales se retrouve des cellules contractiles, les péricytes, jouant un rôle dans le contrôle du débit sanguin. Ils ont également une fonction de macrophages secondaires dans le SNC en pouvant exercer l'endocytose. Ils participent également à la formation des jonctions serrées des cellules endothéliales et jouent donc un rôle majeur dans les propriétés restrictives de la BHE (61).

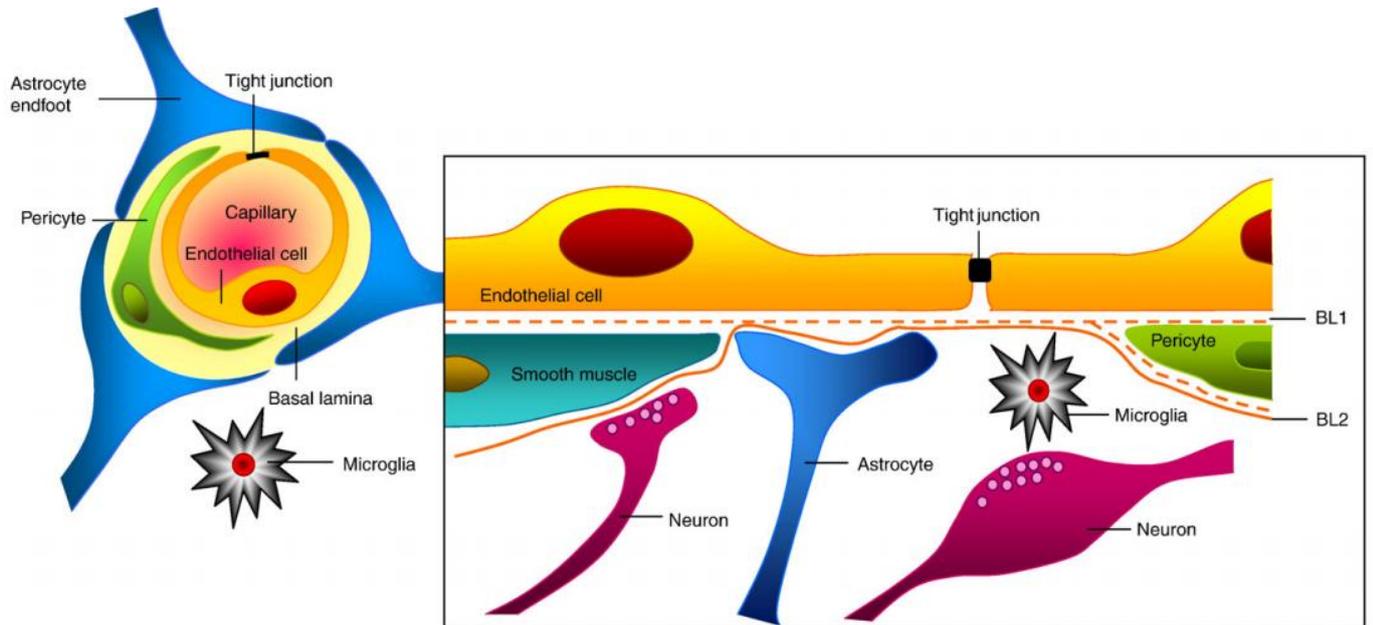


Figure 9 Structure de la BHE, d'après Abbott et al, *Neurobiology of disease* 2010.

2.3 Le cas de la SEP

Dans la SEP, les lymphocytes T CD4 autoréactifs migrent à travers la BHE pour atteindre le SNC. Il y a création et maintien d'un environnement inflammatoire qui attirerait les autres cellules immunitaires. La transmigration à travers la BHE ne peut se faire que par une activation préalable de ces lymphocytes en périphérie. L'acquisition de cette autoréactivité est un phénomène qui suscite de nombreuses questions aujourd'hui.

Plusieurs hypothèses perdurent et concernent les sous populations Th1 et Th17 des LT CD4. Une, prédominante, est celle du mimétisme moléculaire par présentation d'épitopes antigéniques proche de la myéline. Ces épitopes ressemblant à la myéline seraient la conséquence d'infection par des pathogènes notamment par l'EBV. Ceci aurait pour conséquence l'activation en périphérie des LT Th1 autoréactifs, qui migrent vers le SNC et induisent un environnement inflammatoire créant secondairement un afflux des autres cellules immunitaires (16).

Une deuxième hypothèse est également celle d'un mimétisme moléculaire, mais mettrait en jeu les LT Th17 qui, par un défaut de régulation inhérents aux patients atteints de SEP, migreraient

dans le SNC par les plexus choroïdes via le CCR6 (C-C Chemokine Receptor 6) puis activeraient les cellules endothéliales afin de permettre l'entrée d'autres LT Th17 et des LT Th1 (62).

Le recrutement lymphocytaire T CD4 pathologique dans le SNC dans le cas de la SEP peut se décomposer en deux étapes, la première correspond au passage de l'endothélium de la BHE par les LT par les mêmes mécanismes que ceux décrit plus haut pour le recrutement leucocytaire. Les molécules d'adhésions mises en jeu entre l'endothélium cérébral et les LT pour l'étape de capture, sont spécifiques de ces derniers et mettent en jeu des interactions fortes entre le VLA-4, aussi appelée l'intégrine $\alpha 4\beta 1$ et VCAM-1 exprimée à la surface de l'endothélium dans des conditions inflammatoires (63).

La deuxième étape plus spécifique correspond au passage de la glia limitans formée par les pieds astrocytaires et la membrane basale. Cette étape nécessite l'intervention des métalloprotéinases MMP2 et MMP9 (Matrix MetalloProteinases 2 et 9) qui dégradent la membrane basale et les jonctions intercellulaires (63).

Une fois dans le cerveau, les LT CD4 rencontrent les CPA qui leur présentent des fragments de la myéline par le CMH de classe II. Ceci aboutit à la sécrétion de cytokines par les LT CD4 et les CPA telles que l'IL-23 et l'IFN γ et entretient la réaction inflammatoire locale. La conséquence est l'endommagement des cellules gliales, des neurones et des oligodendrocytes qui produisent à leur tour des médiateurs inflammatoires. L'inflammation est ainsi entretenue dans un véritable cercle vicieux et se traduit, en plus des dommages aux constituants du SNC, par une accumulation pathologique des LT CD4 dans l'espace périvasculaire (64).

Sous l'effet de l'inflammation chronique, la BHE subit également d'importants dommages la rendant perméable, on parle alors d'une véritable rupture de celle-ci.

On note premièrement à sa surface, une dégradation du glycocalyx conjuguée à une expression des molécules d'adhésion sous l'effet du TNF α et des interleukines (65).

Il se produit également une perte de la quiescence des cellules endothéliales avec des anomalies au niveau des jonctions serrées qui ne jouent plus leur rôle et se laisse infiltrer. Une explication de cette perte de fonction se trouve au niveau moléculaire où l'on observe une

diminution voire une perte sélective de l'expression des protéines ZO-1 et de l'occludine, normalement présentes dans les jonctions serrées (66), (67).

La synthèse des molécules composants la membrane basale est également diminuée, ce qui l'amincit et la fragilise (57). L'addition de tous ces événements concourent à l'infiltration anormale des cellules immunitaires dans l'espace péri-vasculaire du SNC.

3. Le natalizumab, les intégrines et leurs ligands

3.1 Structure du natalizumab

Le natalizumab a été le premier anticorps monoclonal utilisé en thérapeutique en neurologie. Produit par génie génétique, il s'agit d'un anticorps monoclonal humanisé, c'est-à-dire qu'on a fixé sur une immunoglobuline humaine de classe G, les parties hypervariables d'un anticorps murin. Il est donc à 90-95 % humain (68).

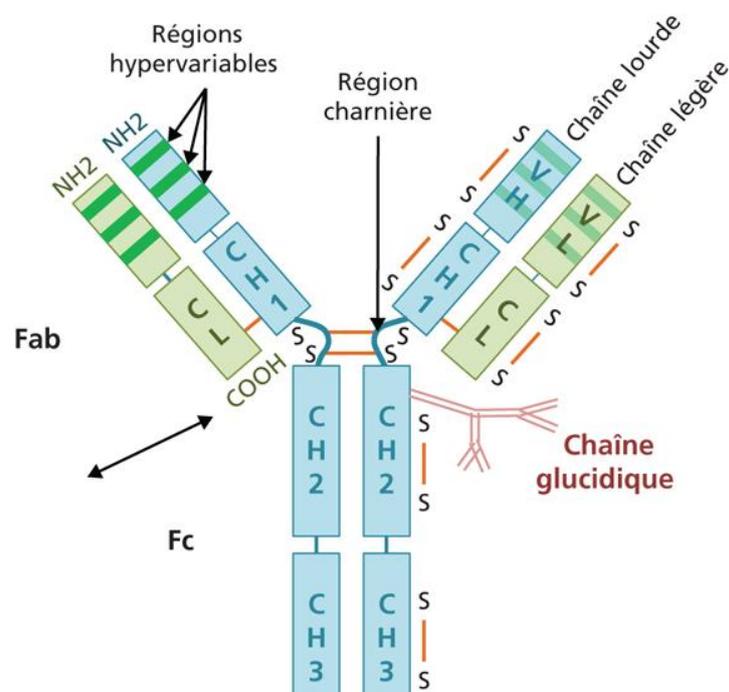


Figure 10 Structure d'une immunoglobuline de classe G, d'après Salaün et al 2019.

Les immunoglobulines de classe G sont des glycoprotéines formées de deux chaînes lourdes (H) et de deux chaînes légères (L), elles présentent donc une structure divalente.

Au sein de chaque chaîne se trouvent un domaine variable, servant à la reconnaissance de l'antigène et des domaines constants, au rôle d'interaction avec d'autres éléments cellulaires.

Les chaînes légères comportent ainsi deux domaines dont un variable (VL) et un constant (CL).

Les chaînes lourdes sont, elles, formées par un domaine N-terminal variable (VH) et 3 ou 4 domaines constants : CH1, CH2 et CH3 (et CH4).

L'association d'un VH et d'un VL constitue le site de reconnaissance et de liaison de l'antigène, appelé le paratope. La divalence des anticorps confère donc deux sites de liaison antigénique par anticorps.

Un anticorps se divise donc schématiquement en deux parties fonctionnellement différentes :

- Le fragment Fab (fragment antigen binding), variable, pour la fixation de l'antigène.
- Le fragment Fc (fragment crystallizable), constant et cristallisable qui interagit avec ses récepteurs présents à la surface de certaines cellules ou le complément.

Il est possible, par clivage enzymatique, d'isoler ces deux fragments.

Comme les autres anticorps monoclonaux, le natalizumab a la particularité d'être produits par un clone unique de LB. Il a donc la propriété d'être homogène et monospécifique, c'est-à-dire qu'il ne reconnaît et n'est dirigé contre un seul type unique de site antigénique : l'intégrine $\alpha 4\beta 1$ (68).

3.2 L'intégrine $\alpha 4\beta 1$

3.2.1 Structure

L'intégrine $\alpha 4\beta 1$, aussi appelée VLA-4 est une molécule impliquée dans les phénomènes d'adhésion cellulaire. Les intégrines sont des molécules ubiquitaires, elles appartiennent à la famille des molécules d'adhésion avec les cadhérines, les sélectines et les molécules de la superfamille des immunoglobulines (69).

Les intégrines sont des hétérodimères constitués d'une chaîne α et d'une chaîne β reliées entre elles de manière non covalente. Ces deux sous-unités sont des protéines transmembranaires de type I avec une partie cytoplasmique courte et une partie extracellulaire de grande taille (70).

Elles sont classées par chaîne β commune et c'est la combinaison des chaînes α et β qui détermine la spécificité de l'intégrine au ligand.

L'intégrine $\alpha 4\beta 1$ appartient donc à la sous famille $\beta 1$ des intégrines qui ont toutes en commun la chaîne $\beta 1$, une chaîne de 150 kDa, désignée aussi par CD29. Cette famille est également appelée VLA pour Very Late Antigen due à leur apparition retardée après activation (71). Ceci confère, en combinaison avec la chaîne $\alpha 4$, la nomination de VLA-4.

La chaîne $\alpha 4$ ou CD49d a un poids moléculaire de 155 kDa. Cette chaîne se décompose en plusieurs parties allant de la membrane plasmique où elle présente une structure allongée jusqu'à son extrémité distale où elle adopte une forme globulaire. En partant de la membrane plasmique on compte trois domaines dénommés « mollet 2 » (« calf 2 »), « mollet 1 » (« calf 1 ») et « cuisse » (« thigh »). Entre le « mollet 1 » et la « cuisse » se trouve une zone, flexible, appelée « genou » (« genu »). Le domaine globulaire est lui, formé d'une hélice β (« β propeller »), constituée par l'assemblage de sept domaines répétés de résidus d'acides aminés se superposant en feuillets β . Le troisième domaine répété s'individualise par la présence ou non d'un I-domaine. La chaîne $\alpha 4$ de VLA-4 est caractérisée par une absence de I-domaine, un composant critique pour d'autres intégrines en constituant le site de liaison du ligand via le site MIDAS (Metal Ion Dependent Adhesion Site) qui fixe les cations divalents. A la place, c'est le « I-like » domaine de la chaîne $\beta 1$, structurellement semblable au I-domaine de la chaîne α , qui compense le déficit et va prendre place dans la fixation du ligand, via son site MIDAS. Ce « I-like » domaine forme la partie globulaire à l'extrémité distale de la sous-unité β .

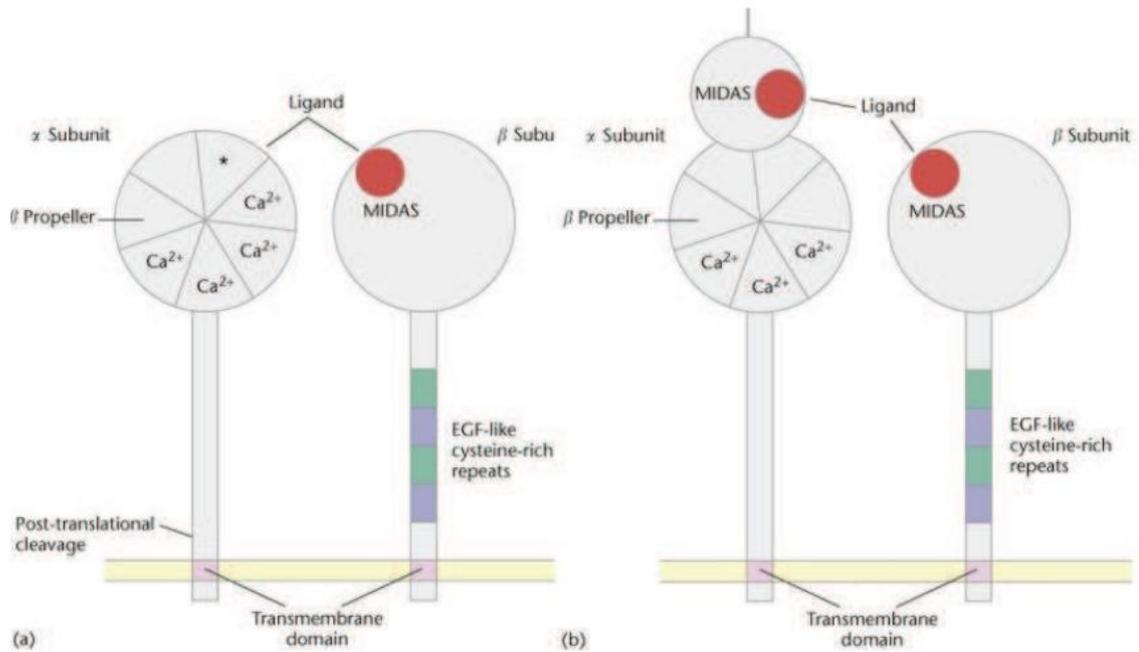


Figure 11 Structure des intégrines, d'après G. Krissansen et E. Danen, Encyclopedia of Life Science, John Wiley and Sons 2007. a) Intégrine ne possédant pas de I-domaine sur sa chaîne α . b) Intégrine possédant un I-domaine sur sa chaîne α .

Entre la partie globulaire et la membrane plasmique, la sous-unité β présente une partie allongée qui se compose d'un assemblage sophistiqué de domaines. Ainsi, le domaine « I-like » est inséré sur un domaine hybride présentant des similitudes avec un domaine immunoglobuline, lui-même inséré sur le domaine PSI pour plexine-sémaphorine-intégrine. On retrouve également quatre domaines de type facteur de croissance épidermique et le domaine β TD (beta-Tail Domain) en bout de chaîne. Cet assemblage précis est capital pour l'intégration et la transmission du signal reçu du milieu extracellulaire vers le cytosquelette des cellules exprimant le VLA-4 (69),(72).

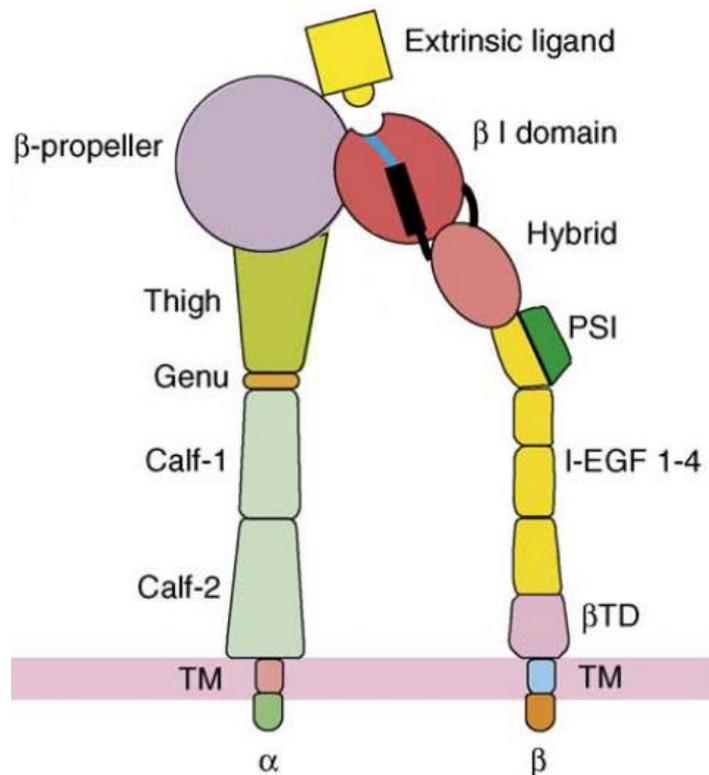


Figure 12 Structure de VLA-4 en conformation dépliée, d'après Springer A et Bing-Hao L, *Current Opinion in Cell Biology* 2006.

3.2.2 Expression

L'intégrine $\alpha 4\beta 1$ est exprimée principalement sur les lymphocytes T et B mémoires des tissus périphériques. Elle joue un rôle aussi bien dans leur différenciation et leur homing, que dans leur migration à travers les tissus lors de l'inflammation. Contrairement aux autres intégrines, celle-ci n'est pas surexprimée lors de l'activation des lymphocytes et est déjà exprimée sur les cellules au repos. On la retrouve également exprimée de façon modérée sur les éosinophiles et les monocytes, mais aussi sur les neutrophiles après leur extravasation leur servant d'aide dans leur migration au sein de la matrice extra-cellulaire (73).

D'autre part, elle est également impliquée dès l'embryogénèse dans le développement et la différenciation de certains types cellulaires et tissus. En effet, on la retrouve exprimée par les cellules musculaires et elle participe à la formation des myotubules et à leur différenciation. Elle est également détectée dans les cellules épithéliales thymiques où elle prend part au développement du thymus. Enfin, elle est exprimée au sein de la moelle osseuse sur les cellules souches hématopoïétiques où elle participe à leur adhésion sur les cellules stromales (74).

3.2.3 Les différentes conformations et l'affinité pour le ligand

Dans les années 2000, des données de cristallographie ont montrées que les intégrines pouvaient exister dans une conformation compacte repliée en plus de la forme dépliée, déjà connue. D'autres études ont été menées et il en a été conclu que cet état replié représentait une conformation inactive tandis que la forme dépliée était active. Cette hypothèse a ensuite été réfutée par la découverte de la capacité des intégrines en forme repliée de lier des ligands de petite taille. Par la suite, on a donc défini des états de faible et de forte affinité de l'intégrine pour le ligand qui dépend de la conformation de celle-ci. Ainsi, la forme compacte repliée représente un état de faible affinité pour le ligand et la forme dépliée, un état de forte affinité (69).

Une des caractéristiques du VLA-4 est qu'il ne subit pas de surexpression en réponse à des stimuli inflammatoires, celui-ci étant déjà exprimé sur les cellules immunitaires au repos. En revanche, un changement de sa conformation va se produire lors de l'activation des lymphocytes, pour qu'il passe d'un état de faible affinité à un état de forte affinité pour le ligand.

Les intégrines peuvent elles-mêmes moduler leur affinité au ligand par divers mécanismes et il semblerait que les cations divalents augmentent l'affinité des intégrines en déclenchant un changement de conformation. En effet, il existe sur la chaîne β des intégrines un site adjacent au MIDAS, le site ADMIDAS qui fixe les cations divalents et est capable de moduler l'état d'affinité de l'intégrine au ligand. En état de faible affinité, ce site est occupé par du calcium et à un effet inhibiteur. En état de forte affinité, ce site est lié au manganèse (69), (72).

Ces changements de conformation requièrent un dépliement et une séparation des chaînes $\alpha 4$ et $\beta 1$.

L'initiation du mouvement est un changement d'orientation de l'hélice β qui est couplé à un mouvement du domaine hybride. Ce mouvement entraîne avec lui les domaines EGF et le PSI qui sont raccordés au domaine hybride et qui s'activent. La séparation des domaines cytoplasmiques des chaînes α et β permet les phénomènes de signalisation cellulaire et la liaison de protéines cytosoliques sur ceux-ci (75).

Tous ces changements donnent lieu à des équilibres réversibles et peuvent s'opérer dans les deux directions.

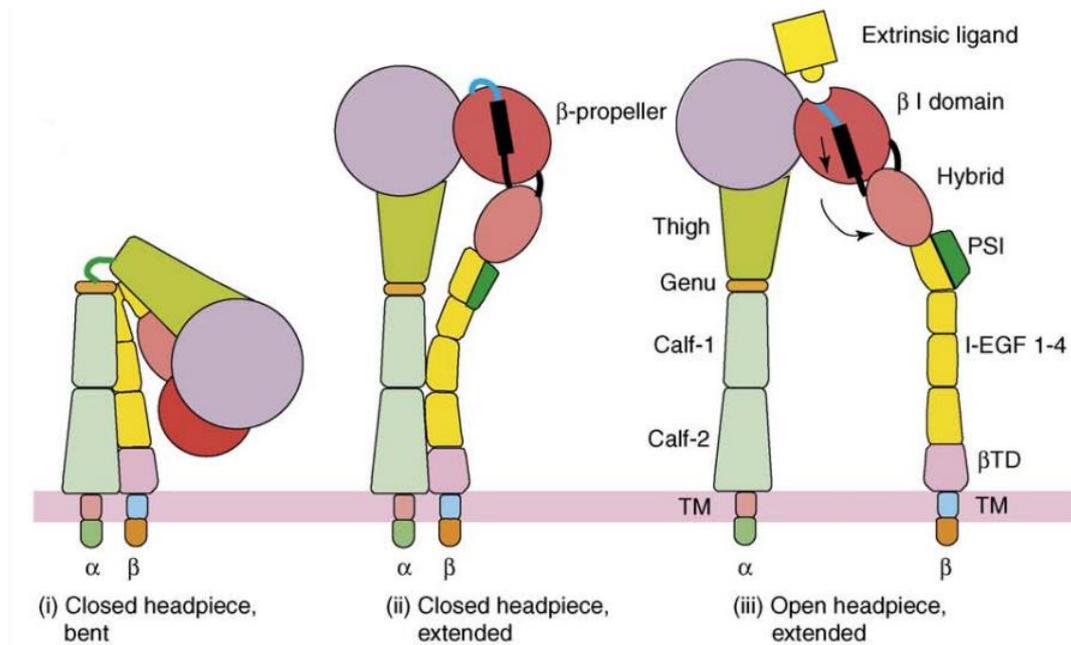


Figure 13 Changement de conformation des intégrines associé à leur état d'affinité, d'après Springer A. et Bing-Hao. L, *Current Opinion in Cell Biology* 2006.

3.3 Les ligands de l'intégrine $\alpha 4\beta 1$

L'intégrine $\alpha 4\beta 1$ interagit avec différents ligands aux localisations diverses.

Ainsi, son ligand primaire est la molécule VCAM-1 exprimée sur l'endothélium activé. Elle est également capable de se lier avec un composant de la matrice extracellulaire, la fibronectine, sur un fragment spécifique appelé le fragment CS-1. Enfin elle possède un ligand constitutif des jonctions serrées des cellules endothéliales, la molécule JAM- 2 (74).

3.3.1 VCAM-1

VCAM-1 est une glycoprotéine appartenant à la superfamille des immunoglobulines. Il s'agit d'une glycoprotéine transmembranaire de 110 kDa avec une région intracellulaire courte, un segment transmembranaire classique de type I et une grande partie extracellulaire composée de domaines immunoglobulines. Ces domaines sont formés de deux feuillets β reliés entre eux par

un pont disulfure interne ce qui leur confère une structure similaire à celle des domaines globulaires des anticorps.

Il existe deux formes de VCAM-1, dépendant du nombre de domaines aux immunoglobulines sur son fragment extracellulaire. La première forme, la plus abondante, comporte 7 domaines de type immunoglobuline avec deux domaines de fixation pour l'intégrine $\alpha_4\beta_1$ portés par les domaines 1 et 4. La deuxième forme est, quant à elle, moins abondante et ne comporte que 6 domaines aux immunoglobulines du fait de l'absence du domaine 4 retrouvé dans la forme à 7 domaines. Cette deuxième forme ne comporte donc qu'un seul site de liaison avec l'intégrine $\alpha_4\beta_1$ sur le domaine 2 (76).

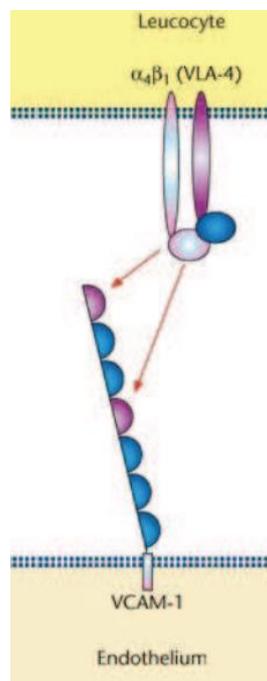


Figure 14 Structure de VCAM-1, ligand de VLA-4 d'après S. Jalkanen et M. Salmi, Encyclopedia of Life Science, John Wiley and Sons 2007. Représentation de VCAM-1 dans sa forme à 7 domaines de types immunoglobulines, les domaines 1 et 4 de fixation à VLA-4 sont représentés en violet.

VCAM-1 est exprimé lors de phénomènes inflammatoires à la surface de l'endothélium activé. Sa régulation par les cellules endothéliales est sous un contrôle transcriptionnel dépendant de la voie NF κ B. Cette voie de transcription génique est activée par le TNF α , l'IL-1 et l'IL-4 sécrétés par les LT activés et les monocytes résidents de l'endothélium lors de l'inflammation (77).

3.3.2 La fibronectine

La fibronectine est une glycoprotéine présente dans la matrice extracellulaire sous forme fibrillaire. Elle a un haut poids moléculaire de 500 kDa environ. Elle est impliquée dans la communication cellulaire par l'intermédiaire d'un complexe formé avec les intégrines et module ainsi les interactions entre la matrice extra-cellulaire et les cellules (78).

Elle est composée de deux brins identiques et flexibles liés entre eux de manière covalente par deux ponts disulfures du côté de leurs extrémités C-terminales. Chaque chaîne est organisée par une répétition de modules de type I, II ou III. On compte ainsi, sur chaque brin, 12 répétitions de modules de type I (nommées FN1), 2 répétitions de modules de type II (nommées FN2) et 15 à 17 répétitions de modules de type III (nommées FN3). Ces répétitions de modules occupent 90 % de l'espace sur un brin de fibronectine. Les composants restants sont des connecteurs entre certains modules de fibronectine, mais également une partie variable (V) qui ne présente aucune homologie avec les autres motifs répétitifs et est une région d'épissage alternatif. Au sein de cette région variable, se trouve une séquence particulière de trois acides aminés : leucine - acide aspartique - valine (séquence LDV) qui détient l'activité de liaison pour l'intégrine $\alpha 4\beta 1$. L'acide aspartique (D) occupe notamment un rôle central, puisqu'en étant chargé négativement, il se lie avec les cations du site MIDAS de l'intégrine (79).

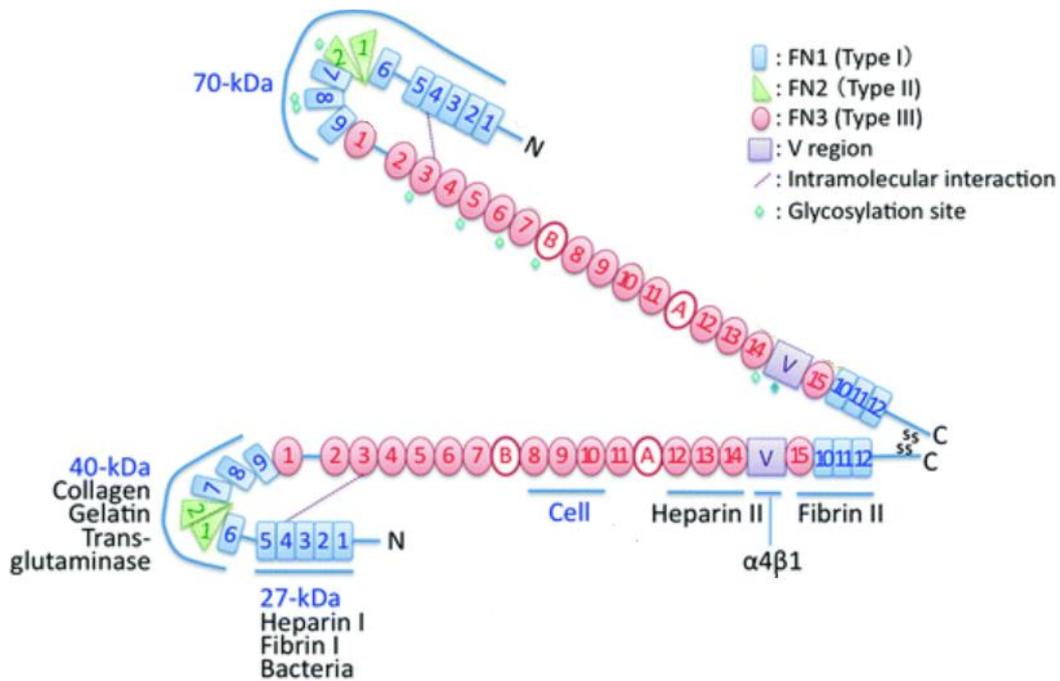


Figure 15 Structure de la fibronectine, d'après Xu. J et Mosher. D, *The Extracellular Matrix : an Overview* 2011.

3.3.3 JAM-2 (ou JAM-B)

La molécule JAM-2, aussi nommée JAM-B, fait partie de la famille des JAMs (Junctional Adhesion Molecules), des molécules appartenant à la superfamille des immunoglobulines.

Elle est composée de deux domaines types immunoglobulines sur sa portion extracellulaire : un domaine V type variable et un domaine C2 type constant avec respectivement un et deux ponts disulfures l'intérieur de ces domaines.

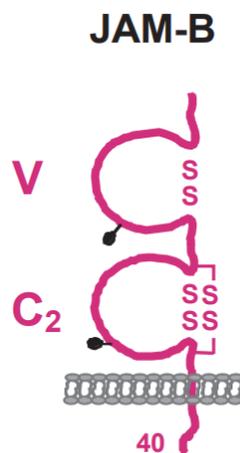


Figure 16 La molécule JAM-2, d'après Ebenet. K, *Journal of Cell Science* 117, 2004.

Elle est exprimée de façon prépondérante au niveau des jonctions serrées des cellules endothéliales. Sa partie cytoplasmique est directement associée avec les protéines de jonctions telles que ZO-1, ZO-2 ou ZO-3, qui sont les médiatrices de l'ancrage de la jonction cellulaire au cytosquelette de la cellule. Ainsi, la molécule JAM-2 contribue à la formation et au maintien de la structure des jonctions cellulaire et à l'acquisition d'une polarité cellulaire (80). De plus, elle est impliquée par sa partie extracellulaire, dans les interactions et la transmigration des leucocytes lors de la réaction inflammatoire. Les phénomènes d'adhésions lors de la transmigration sont en partie dû à l'interaction de l'intégrine $\alpha4\beta1$ leucocytaire avec la molécule endothéliale JAM-2. Cette interaction nécessite cependant la co-expression de la molécule JAM-3 (ou JAM-C) à la surface du leucocyte. Cette interaction hétérophilique à la particularité, chez les molécules de la famille des JAMs, de se dérouler en configuration trans en impliquant deux domaines extracellulaires de deux molécules différentes, elles-mêmes exprimées par deux types cellulaires distincts. Les interactions trans sont spécifiques des phénomènes inflammatoires au sein de cette classe de molécules (81).

3.3.4 Le cas de Madcam-1

Madcam-1 (Mucosal Addressin Cell Adhesion Molecule 1) est une glycoprotéine de la superfamille des immunoglobulines exprimée de façon prépondérante au niveau intestinal dans les venules postcapillaires à endothélium épais des tissus lymphoïdes associés aux muqueuses. Elle permet le « homing » des lymphocytes dans les plaques de Peyer et dans la lamina propria de l'intestin et participe au recrutement sélectif des lymphocytes dans les sites inflammatoires intestinaux. Elle représente ainsi un élément central dans les maladies inflammatoires intestinales telles que la maladie de Crohn (82).

Elle est le ligand primaire de l'intégrine $\alpha4\beta7$ retrouvée majoritairement chez les leucocytes du tube digestif. L'intégrine $\alpha4\beta1$ est également capable de la lier, du fait de sa chaîne $\alpha4$ en commun avec l'intégrine $\alpha4\beta7$. L'intégrine $\alpha4\beta1$ la lie cependant avec beaucoup moins d'affinité et la liaison établie est plus faible que pour ses autres ligands (74).

3.4 Liaison du natalizumab à l'intégrine $\alpha4\beta1$

Des études de cristallographie réalisées avec un Fab de natalizumab ont mis en évidence son site de fixation sur l'intégrine $\alpha4\beta1$. Celui-ci se situe donc au niveau du feuillet β de l'extrémité globulaire de la sous-unité $\alpha4$ de l'intégrine, entre les lames 2 et 4. Il s'agit d'un site différent et opposé au site de fixation de VCAM-1, son ligand primaire. Le natalizumab exerce donc un antagonisme non compétitif sur VCAM-1 pour la liaison à l'intégrine. L'action du natalizumab se décrit ainsi par un changement d'orientation des domaines D1 et D2 de VCAM-1, ce qui limite son nombre de conformations accessibles à la liaison. L'interaction par le biais du domaine D2 de VCAM-1 est particulièrement perturbée par la fixation du natalizumab sur l'intégrine, il y a modification de l'espace accessible à la liaison pour le domaine 2 ce qui concoure à une baisse de l'affinité de VCAM-1 pour l'intégrine $\alpha4\beta1$, par le natalizumab (83).

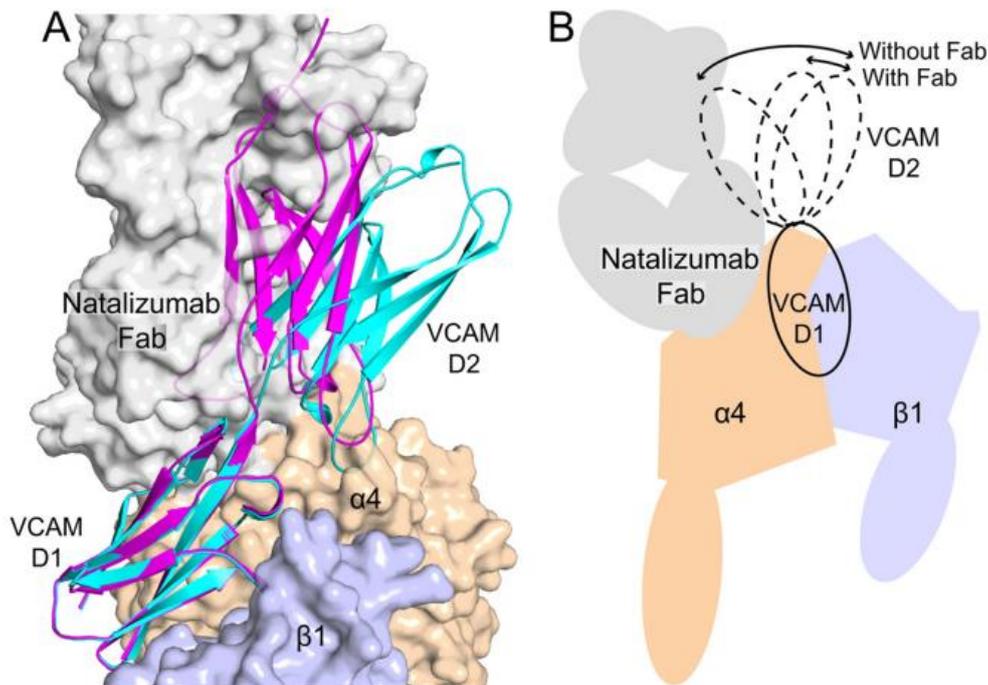


Figure 17 Représentation de la fixation de VCAM-1 en présence d'un Fab de natalizumab sur l'intégrine $\alpha4\beta1$, d'après Yu et al, *Journal of Biological Chemistry* volume 288 n°45, 2008. En orange est représenté le feuillet β de la chaîne $\alpha4$ et en bleu le domaine « I-like » de la chaîne $\beta1$. Le Fab de natalizumab est schématisé en gris. Enfin, les domaines D1 et D2 de VCAM-1 correspondent aux structures en rubans bleus et violets.

Le Fab de natalizumab, souvent utilisé pour les études, a une affinité beaucoup plus faible pour l'intégrine $\alpha 4\beta 1$ que l'immunoglobuline complète (de type IgG4) que constitue le natalizumab thérapeutique. Le Fab, monovalent ne lie qu'un site à la fois tandis que l'IgG4 est divalente et lierait donc 2 sites à la fois.

Cependant, après administration chez les patients, les IgG4 subissent dans l'organisme une réduction des cystines de la région charnière qui deviennent des cystéines. La majorité d'entre elles deviennent monovalentes et il se produit alors le « shuffling » des IgG4, où les demi-molécules constituées d'une paire de chaînes lourdes et légères se réassemblent avec d'autres demi-molécules d'IgG4. La fraction monovalente restante est supposée se lier à son intégrine avec une affinité égale à celle du Fab (83).

D'autre part, le natalizumab affecte également les fonctions de l'intégrine $\alpha 4\beta 7$, du fait de sa chaîne $\alpha 4$ en commun avec l'intégrine $\alpha 4\beta 1$. Le site de liaison de son ligand primaire, l'adressine Madcam-1, se situe à l'interface entre le feuillet β de sa chaîne $\alpha 4$ et le I-domaine de sa chaîne $\beta 7$. Le natalizumab exerce son action en se fixant sur la chaîne $\alpha 4$, en dessous du site de liaison du ligand. Ainsi, le natalizumab peut également être employé dans le traitement de la maladie de Crohn mais ne dispose pas d'AMM pour cette indication (74), (83).

4. Méthodes d'exploration de l'adhésion cellulaire

Il existe différents types de méthodes d'exploration de l'adhésion cellulaire. On distingue les méthodes statiques, classiques, qui quantifient l'adhésion des cellules sur des surfaces données après sédimentation et les méthodes dynamiques qui quantifient l'adhésion des cellules sur des surfaces modèles ou sur d'autres cellules sur lesquelles sont appliquées différentes forces. Ces dernières permettent également la quantification de la formation et de la rupture de liaison entre des molécules d'intérêts. Nous verrons dans cette partie, tout d'abord un exemple d'une méthode statique avant de s'intéresser plus particulièrement à la chambre à flux laminaire, une méthode dynamique, pour son utilisation fréquente dans les publications et puisqu'elle est utilisée au sein du laboratoire et constitue le pilier des études de la partie expérimentale de cette thèse.

4.1 La méthode classique

Cette méthode repose sur l'utilisation de plaques spécifiques à puits et permet d'évaluer l'adhésion cellulaire sur une surface donnée. Au fond de ces puits est d'abord mise en place la surface adhérente d'essai, conçue par le dépôt de molécules adhérentes ou d'une monocouche de cellules spécifiques. Les cellules à tester sont ensuite déposées en suspension dans les puits sur cette surface adhérente et sont mises à incuber le temps que celles-ci sédimentent. Les puits sont ensuite lavés afin de pouvoir retirer les cellules non adhérentes à l'aide d'une pipette et le nombre de cellules adhérentes est quantifié par un marquage et un comptage au microscope. Le marquage peut se faire de différentes façons en utilisant par exemple la fluorescence, la radioactivité ou encore la biotinylation (84).

Cette méthode se dit statique puisqu'aucune force modulable n'est appliquée sur les liaisons formées. Elle repose donc entièrement sur un grand temps de sédimentation et d'interaction entre les cellules à étudier et la surface adhérente.

4.2 La chambre à flux laminaire

La chambre à flux laminaire est une méthode dynamique à force constante par l'intermédiaire de laquelle on peut mesurer la fréquence de survenue de l'adhésion cellulaire ainsi que la durée de vie des liaisons.

Une chambre à flux laminaire est une cavité, de forme rectangulaire le plus souvent, au sein de laquelle s'écoule un fluide à un flux donné. Dès lors que ce flux devient suffisamment faible, l'écoulement du fluide se fait de façon laminaire et la vitesse v du fluide est parallèle à l'axe des parois de la chambre. La vitesse au contact des parois est nulle et est maximale au niveau de l'axe centrale. Une approximation de la valeur de la vitesse à proximité des parois, peut être donnée par la formule (85) :

$$v(z) = Gz$$

Où z représente la distance à la paroi exprimée en mètres et G le taux de cisaillement, une constante exprimée en s^{-1} .

La force exercée par le flux par unité de surface peut être calculée à l'aide de la contrainte de cisaillement T , généralement exprimée en dynes/cm² par la formule :

$$T = \mu \times G$$

Où G représente le taux de cisaillement et μ représente la viscosité exprimée en Poise.

Dans une chambre à flux, on peut déterminer approximativement le taux de cisaillement ($G = dv/dz$) pour un débit Q donné par la formule :

$$G = \frac{6Q}{lH^2}$$

Où l représente la largeur de la chambre et H sa hauteur.

Le mouvement d'une cellule dans le flux de la chambre peut être représenté avec un modèle de microsphère. On peut ainsi déterminer une estimation de la vitesse de cette microsphère selon son emplacement par rapport aux parois de la chambre. En effet, lorsque celle-ci se trouve éloignée des parois, sa vitesse peut être calculée par le produit du taux de cisaillement et de la

distance entre la paroi et le centre de la microsphère. Lorsque celle-ci se trouve proche de la paroi, son mouvement dans le flux laminaire est complexe et celle-ci se trouve ralentie par la fine couche de fluide résistante à la déformation se situant à l'interface de la paroi et de la microsphère (86).

Le modèle de la microsphère pour représenter les cellules reste imparfait. Au niveau de leur forme tout d'abord, les cellules ne sont pas parfaitement sphériques et leur membrane plasmique présente des irrégularités. Cela se traduit par la mise en jeu de frottements qui s'appliquent sur les cellules dans le flux. Une force de friction doit donc être ajoutée au modèle des microsphères pour se rapprocher du mouvement des cellules dans le flux (87).

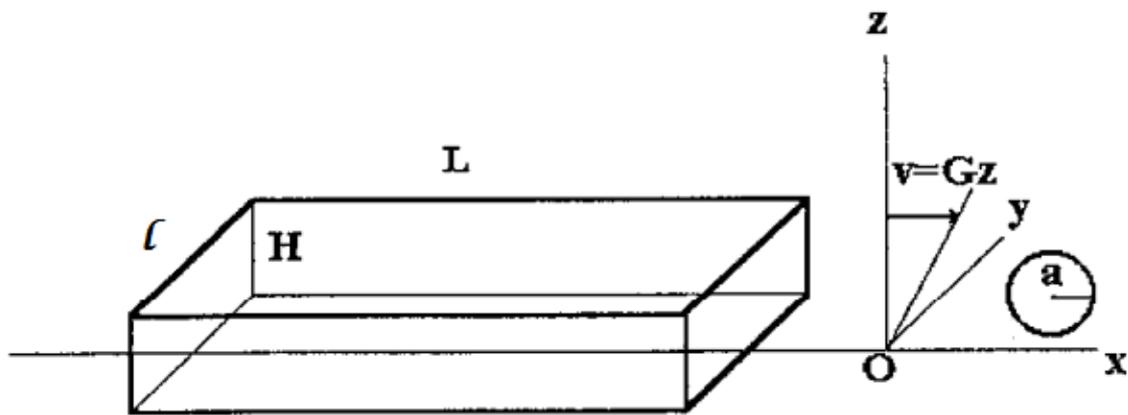


Figure 18 Principe de la chambre à flux laminaire, d'après Pierres et Al, *Journal of Immunological Methods* 1996. Une microsphère de rayon a est représentée. La vitesse v du fluide s'écoulant est parallèle à l'axe central (Ox) de la chambre. Le taux de cisaillement est représenté par la dérivée dv/dz où v est une fonction linéaire de la coordonnée z , à proximité de la paroi.

5. Principe de l'étude

La sclérose en plaque est une maladie du système nerveux central dont la prévalence est en constante augmentation. Un traitement efficace récent est le natalizumab, un anticorps monoclonal inhibiteur de l'adhésion lymphocytaire par le biais du blocage de l'intégrine VLA-4 et donc du blocage de l'interaction avec ses ligands VCAM-1 et fibronectine. Le laboratoire a cherché initialement à quantifier les fonctions du natalizumab par des méthodes in-vitro pour mesurer l'efficacité chez le patient dans le but à terme d'espacer les cures. Cette étude montre une diminution attendue de l'adhésion initiale des lymphocytes T sur surfaces modèles recouvertes de VCAM-1 sous flux, mais une augmentation paradoxale de la résistance au détachement des cellules adhérentes qui deviennent incapables de migrer. L'objectif est donc d'élucider cet effet paradoxal qui pourrait amener à revoir son mécanisme d'action supposé. La question est de savoir si cette augmentation paradoxale de l'adhésion a une importance pharmacologique. Pour cela, des expériences similaires d'adhésion et de migration sous flux sont réalisées sur un tapis de cellules endothéliales cultivé, afin de se rapprocher des conditions in-vivo.

II. Matériel et méthodes

1. Préparation des cellules T

L'isolation des lymphocytes T se fait à partir d'une poche de sang et comprends plusieurs étapes.

Il faut dans un premier temps séparer les cellules immunitaires des éléments du sang de la poche de sang. Cette séparation se fait par des gradients de densité à l'aide d'une solution de type Ficoll-Paque qui contient du Ficoll. Le Ficoll est un polysaccharide hydrophile capable de dissocier le sang en différentes couches qui s'organisent selon leur densité. Ainsi, le plasma avec la densité la plus faible se retrouve dans la couche supérieure, suivi des PBMC qui sont les cellules mononuclées du sang périphérique. Les cellules les plus denses comprenant les granulocytes et les érythrocytes sédimentent au fond du tube. Il est ensuite aisé de récupérer manuellement la couche d'intérêt.

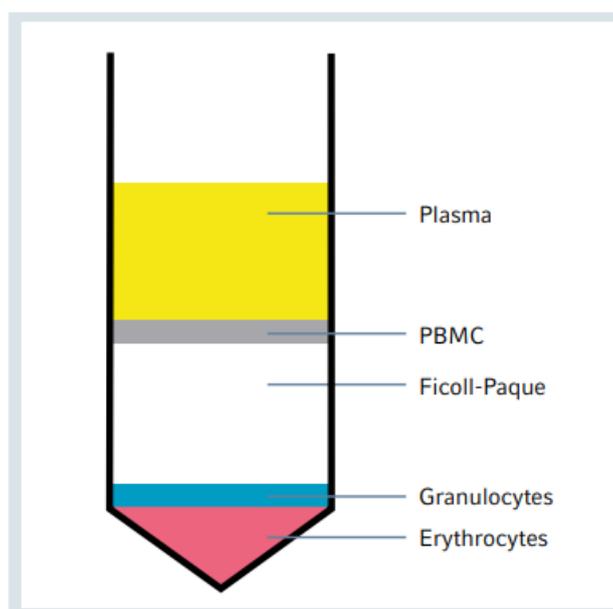


Figure 19 Le gradient de densité obtenu à l'aide de Ficoll, d'après Eppendorf, Application Note n°372.

Les lymphocytes T se trouvent donc parmi les PBMC avec les monocytes, les cellules NK et les lymphocytes B. On récupère donc la couche de PBMC à la pipette que l'on va ensuite laver par centrifugations et resuspensions successives. La centrifugation permet de concentrer les PBMC purifiés au fond du tube par l'obtention d'un culot blanc. Ce culot est ensuite récupéré

et mis en conservation dans des ampoules, congelées à -70°C avec un milieu de SVF (Sérum de Veau Fœtal) et de DMSO (DiMéthylSulfOxide). Le SVF et le DMSO sont deux solvants, le SVF est par ailleurs un additif très utilisé en culture cellulaire. Il permet la survie, la croissance et la multiplication des cellules grâce à sa composition très riche en protéines, dont des facteurs de croissance.

Lors de la décongélation des ampoules de PBMC, les cellules sont lavées et centrifugées plusieurs fois pour éliminer le DMSO puis mise dans un milieu de RPMI (additionné de SVF, de glutamine et de pénicilline/streptomycine) dans une boîte de culture cellulaire que l'on dépose ensuite à l'étuve pendant 24h. Les cellules vont ainsi pouvoir croître.

C'est avec les PBMC en culture que l'on va pouvoir procéder, dans un second temps, à l'isolation des lymphocytes T du restant des cellules mononuclées dans la boîte de culture.

Cette isolation est une sélection négative effectuée par un tri magnétique. Le but est de recueillir les lymphocytes T CD45 RA négatifs, c'est-à-dire les lymphocytes T non naïfs (les LT naïfs expriment le CD45RA) comprenant les lymphocytes T mémoires (LTM) et les LT activés. La proportion de LT activés étant très faible par rapport aux LTM, nous désignerons ainsi les LT CD45 RA négatifs par LTM dans la suite de cette thèse.

Le sélection négative des LTM consiste à cibler toutes les cellules présentes dans les PBMC qui n'en sont pas, pour ensuite éliminer ces cellules et ne récupérer que les LTM. Ceci est possible par un tri magnétique. Pour cela, on applique un cocktail d'anticorps dirigés contre des déterminants antigéniques spécifiques de toutes ces cellules à éliminer. Ce cocktail est donc composé d'anticorps monoclonaux conjugués à la biotine et dirigés contre les CD14, CD15, CD16, CD19, CD34, CD36, CD56, CD123 et CD235a (glycophorine A). Après un certain temps d'incubation avec le premier cocktail, on va ensuite mettre en présence les cellules avec un deuxième cocktail, ayant pour rôle de former des complexes magnétiques à l'aide d'anticorps anti-biotine conjugués à des microbilles magnétiques. Ces anticorps anti-biotine se fixent sur la biotine des anticorps des cellules ciblées. A cette étape, on rajoute également des microbilles magnétiques déjà conjuguées aux anticorps anti-CD45 RA, pour cibler les lymphocytes T naïfs que l'on cherche également à éliminer. On obtient donc des complexes magnétiques cellules/anticorps/microbilles. Après un deuxième temps d'incubation, on procède

à la séparation magnétique. Pour cela, on fait passer le mélange dans une colonne magnétique ; tous les complexes cellules/anticorps/microbilles magnétiques de la solution sont retenus par la colonne et les LT non naïfs, non ciblés donc non magnétisés, s'écoulent le long de la colonne. En récupérant le filtrat, on obtient ainsi une solution de LTM.

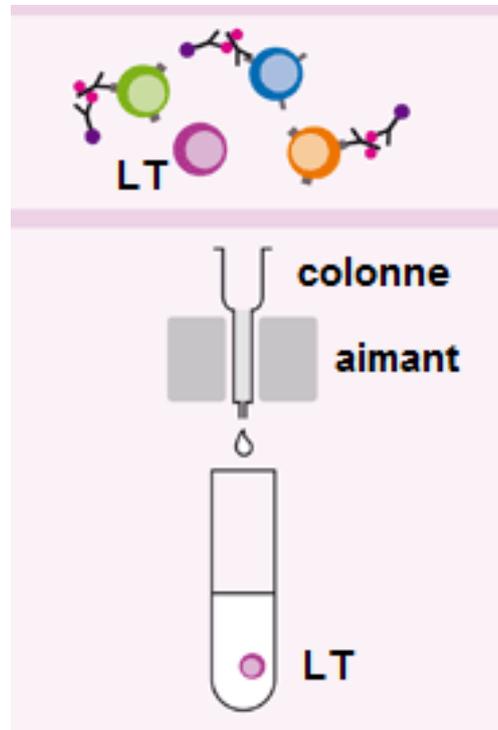


Figure 20 Sélection négative des LTM par tri magnétique, d'après Miltenyi Biotec, *Isolation of Untouched T Cell 2020*. Le LTM est représenté en violet. Les anticorps conjugués à la biotine sont dirigés contre des sites spécifiques sur la cellule verte, bleue et orange. Les anticorps anti-biotine conjugués à la microbille se fixe sur la biotine (représentée en pois rouges) des anticorps précédents, les cellules acquièrent ainsi un magnétisme et sont retenues dans la colonne. Seul le LTM est présent dans le filtrat.

Avant le passage en chambre à flux laminaire, les LTM sont incubés dans un milieu de RPMI pendant une heure et sont traités, selon l'étude réalisée, avec du natalizumab ou avec son Fab à différentes concentrations, en réalisant une cascade de dilution.

2. Préparation des surfaces

Les surfaces employées pour les expériences sont des plaques IBIDI® μ -Slide VI 0,1 (voir figure 21). Le but est de constituer des surfaces modèles recouvertes de molécules d'intérêts. Les plaques IBIDI® μ -Slide VI 0,1 sont composées de six canaux d'une hauteur de 0,1 mm, d'une longueur de 17 mm et d'une largeur de 1 mm. Chaque canal a une contenance de 1,7 μ L. Aux extrémités de chaque canal se situe un puit par lequel on insère les molécules d'intérêts et à l'aide duquel on perfuse la chambre pour les expériences de flux par la suite. Ces puits ont des contenances de 60 μ L chacun.

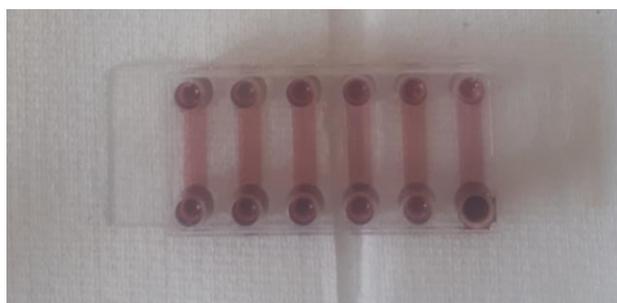


Figure 21 Chambre à flux IBIDI® μ -Slide VI 0,4 (les canaux ont une section supérieure à ceux de la μ -Slide VI 0,1).

Pour les expériences, on a donc fait deux modèles de surface de molécules endothéliales :

Le premier modèle pour étudier le VCAM-1, dans lequel on a mis le VCAM-1 en présence de protéine A, de BSA et de SDF-1 α . La protéine A fixe le fragment Fc des anticorps et permet la bonne orientation de VCAM-1 sur la surface. Le SDF-1 α sert à stimuler la migration des cellules. La BSA est de l'albumine de bœuf, c'est une petite protéine inerte et peu coûteuse qui sert à la saturation de la surface en protéine et vient combler tous les trous.

Le deuxième modèle est façonné pour étudier la fibronectine. On a donc mis la fibronectine avec du SDF-1 α en présence d'un milieu de culture.

Lorsque les molécules d'intérêts sont déposées, les surfaces sont mises à reposer au frigo pendant 24 heures. Le jour suivant, on crée des conditions inflammatoires dans certains canaux (afin de mimer les conditions de la SEP), en ajoutant un mélange de TNF- α et de SDF-1 α . Il y a cependant toujours deux canaux contrôles : le premier pour vérifier le comportement des LTM

injectés dans les canaux sur une surface non inflammatoire et le deuxième, pour le comportement de ces mêmes LTM sur une surface inflammatoire.

3. Culture des cellules endothéliales

Le but de la culture des cellules endothéliales est de reproduire un endothélium dans les canaux des chambres à flux IBIDI®, afin de se rapprocher des conditions in-vivo. La définition des conditions de culture a été un objectif à réaliser lors des expériences de cette thèse.

Les cellules endothéliales utilisées sont des HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cells) ; elles proviennent de veines ombilicales humaines.

Ces cellules sont cultivées en étuve, avec 5% de CO₂, en boîte de culture traitées (aux surfaces plus hydrophiles) dans un milieu ECG (Endothelial Cell Growth), un milieu riche en facteurs de croissance de cellules endothéliales et à faible teneur en sérum (25 mL de sérum bovin fœtale pour 500 mL de milieu, soit 2%).

Elles sont entretenues jusqu'à leur arrivée à confluence, c'est à dire jusqu'à ce que les cellules forment un tapis sur la face inférieure de la boîte de culture. Une fois arrivée à ce stade, on ajoute de la trypsine pour les décoller et les récupérer afin de les mettre dans une chambre à flux IBIDI μ-Slide VI 0,4, cette fois-ci. Cela signifie que la section de cette chambre est de 0,4 × 3,8 mm², donc plus grande que celles employées pour les surfaces modèles. On les cultive ensuite jusqu'à ce leur arrivée à confluence dans la chambre à flux. A ce stade-là, elles forment un tapis de cellules sans chevauchement. On ajoute alors du TNF-α et du SDF-1α dans les canaux de la plaque où l'on veut produire une inflammation pour activer l'endothélium. Les HUVEC sont ainsi prêtes pour la suite des expériences.

4. Systèmes complet matériel et microscopes

Une fois que les surfaces et les LTM sont prêts, on peut monter le système complet de la chambre à flux laminaire. Les surfaces constituent le support de l'expérience. Recouvertes de

molécules d'intérêts ou de cellules HUVEC, on veut observer le comportement des LTM préparés sur celles-ci, en les injectant dans les canaux de la chambre. Afin de mimer le flux vasculaire, la chambre à flux est perfusée par une tuyauterie dans laquelle circule un fluide (milieu RPMI complémenté en SVF et pénicilline/streptomycine). Cette tuyauterie est reliée à des pousses-seringues qui établissent et permettent de varier le flux. Le but est de visualiser les étapes du recrutement lymphocytaire. Pour cela, la chambre à flux est déposée sur la platine d'un microscope optique inversé. Le microscope est relié à une caméra pour filmer en direct le comportement des LTM. Les films sont ensuite stockés et analysés par un ordinateur.



Figure 22 Chambre à flux perfusée et déposée sur la platine du microscope inversé. La seringue permet d'injecter les LTM préparés. Le flux arrive par le puit inférieur, passe dans le canal et est évacué vers la poubelle par le puit supérieur de la chambre.

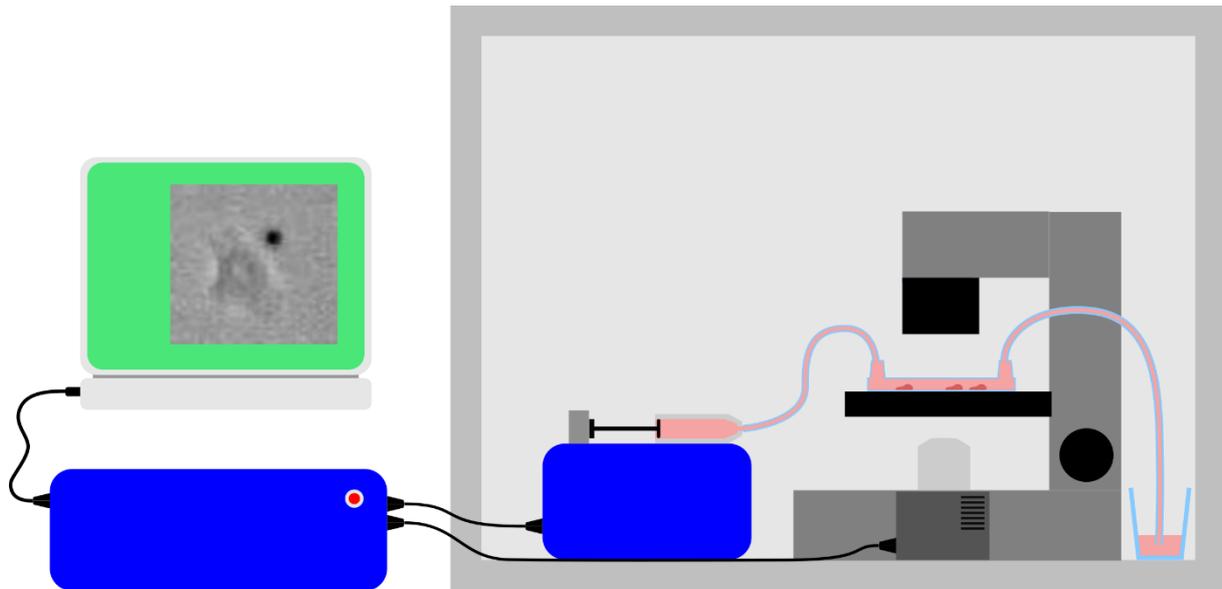


Figure 23 Représentation schématique du système complet de la chambre à flux laminaire. La chambre à flux est déposée sur la platine du microscope inversé. Elle est perfusée d'un côté par un tuyau dans lequel s'écoule un fluide (milieu RPMI) dont le débit est contrôlé par le pousse-seringue. Une fois que ce fluide est passé dans la chambre, il est évacué de l'autre côté par un tuyau vers la poubelle. Le microscope est branché à la caméra qui est reliée à l'écran d'ordinateur. Grâce à celle-ci, on va pouvoir filmer le comportement des LTM injectés dans la chambre avec le milieu RPMI. L'ordinateur permet ainsi l'acquisition des données sous forme de films.

En filmant les LTM injectés dans la chambre à flux, on réalise dans chaque canal de celle-ci deux expériences distinctes. La première est une expérience de capture. Elle se fait à flux faible pour des vitesses réglées sur le pousse-seringue à 0,13 ; 0,06 et 0,03 dynes.cm⁻². Le but est d'observer le nombre de LTM qui adhèrent alors qu'ils sont poussés par le flux.

La deuxième expérience est dite de migration. Elle se fait à flux fort, se rapprochant des valeurs physiologiques, dont les vitesses du pousse-seringue sont de 1, 2 et 4 dynes.cm⁻². Elle se fait à la suite de l'expérience de capture, puisque son but est d'observer le déplacement des LTM une fois que ceux-ci ont adhérents sur les molécules des surfaces modèles ou sur les HUVEC, selon la surface utilisée. Ce déplacement des LTM s'effectue par une polymérisation de l'actine à l'avant et une dépolymérisation de l'actine à l'arrière et une activité d'activation et de désactivation des intégrines selon qu'elles se situent à l'avant ou à l'arrière de la cellule.

On obtient donc un certain nombre de films représentant le comportement des LTM évoluant dans les différentes conditions. Les images obtenues sont de différents types, selon qu'il

s'agisse d'expérience sur surface modèles ou sur HUVEC (figure 25 et 26). Le réglage du contraste ne sera pas le même.



Figure 24 Image de LTM évoluant sur une surface modèle. Le contraste est réglé de sorte à ce que le fond soit effacé et qu'il ne reste plus que les LTM visibles à l'écran.

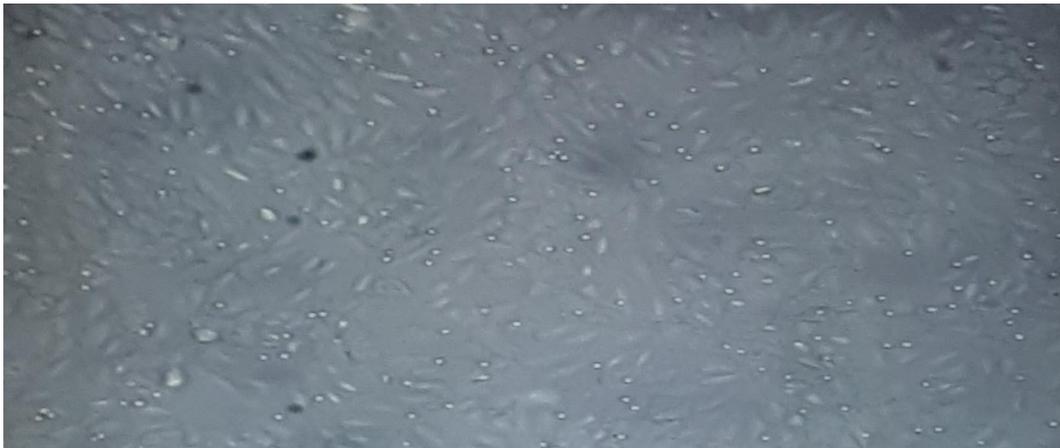


Figure 25 Image de LTM évoluant sur un tapis d'HUVEC. Le contraste est réglé de façon à ce que le fond d'HUVEC soit visible (cellules allongées). Les LTM apparaissent donc comme les petits ronds blancs.

Ces films doivent ensuite être analysés pour en exploiter des données interprétables.

5. Logiciels

Les films obtenus sont répartis en fichier correspondant chacun à une vitesse de flux. Ils sont traités manuellement et sont analysés distinctement par des logiciels différents selon s'il s'agit des expériences de capture ou des expériences de migration, les paramètres mesurés n'étant pas les mêmes.

Ainsi, pour l'expérience de capture, on mesure le nombre d'arrêts des LTM par unité de distance. Pour cela, on utilise un programme informatique du laboratoire intégré à ImageJ, qui après sélection des trajectoires et traitement, permet d'obtenir des films séparés pour chaque taux de cisaillement.

On peut ainsi détecter les arrêts des LTM et la durée de ces arrêts, qui dépendent de plusieurs critères : leur vitesse et la zone sélectionnée. Un LTM est considéré comme arrêté lorsque son déplacement est inférieur à $0,33 \mu\text{m}$ sur une durée de 200 millisecondes.

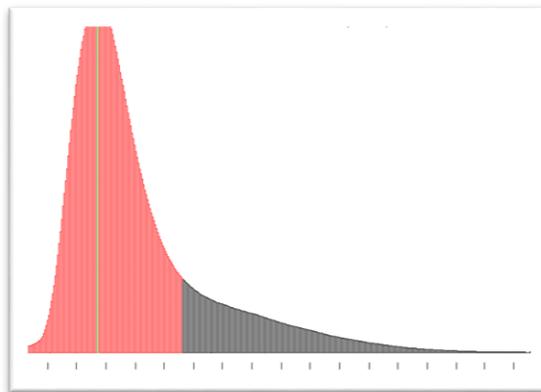


Figure 26 Histogramme du nombre de LTM en fonction de leur vitesse. Les LTM arrêtés correspondent à la région en rose.

Pour la suite du traitement informatique, on sélectionne la zone où l'on retrouve les LTM arrêtés (région en rose).

On obtient alors des représentations des distances traversées par les LTM en fonction du temps (figure 26).

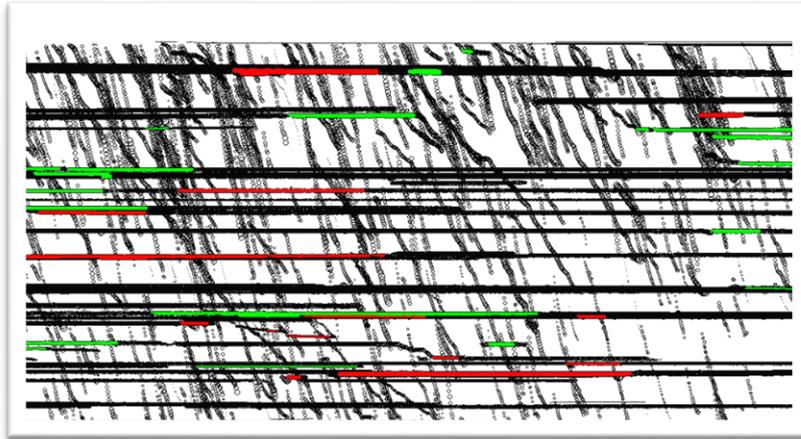


Figure 27 Traitement informatique des distances traversées par les LTM en fonction du temps. Les traits de couleur représentent les LTM arrêtés. Les traits verts représentent les LTM arrêtés pour lesquels la durée de l'arrêt est connue tandis que les traits rouges représentent les LTM arrêtés pour lesquels la durée de l'arrêt est inconnue.

La fréquence des arrêts est ensuite calculée par une formule mise au point par P. Robert et L. Limozin qui correspond à la distance parcourue par les LTM divisée par le nombre de LTM arrêtés. Les valeurs obtenues pour chaque taux de cisaillement sont reportées dans un fichier Excell pour constituer les graphiques, interprétables par la suite.

Pour l'expérience de migration, on utilise un programme informatique du laboratoire intégré à Matlab. Ce dernier mesure la proportion des LTM résistants au cisaillement, leur vitesse et la direction de leur migration vis-à-vis du flux.

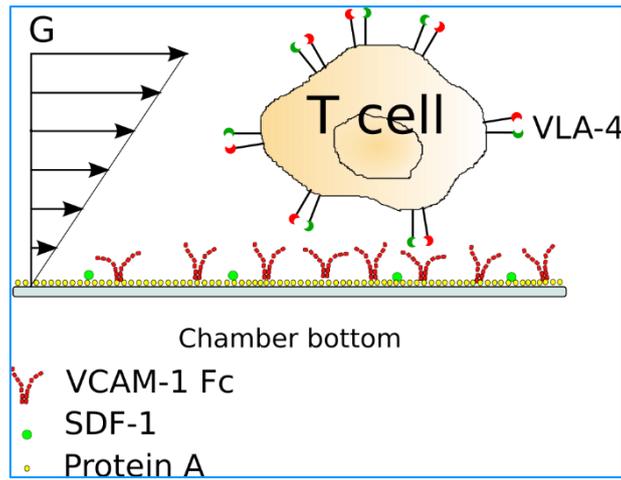


Figure 28 Représentation schématique d'un LTM en migration, sur une surface de VCAM-1 dans une chambre à flux, sous l'application d'une contrainte de cisaillement (G). D'après P. Robert.

III. Résultats

1. Sur surfaces modèles recouvertes de VCAM-1 (données préalables du laboratoire)

Les expériences de captures et de migrations sont réalisées en chambre à flux pour différents taux de cisaillements sur des surfaces modèles recouvertes de VCAM-1. Ces expériences ont été effectuées avec des LTM traités par du natalizumab dans un premier temps, puis ces mêmes expériences ont été opérées avec des LTM traités par un Fab de natalizumab dans un second temps.

1.1 Avec les LTM traités par natalizumab

Les LTM sont incubés avec du natalizumab hospitalier à différentes concentrations : 0,003 ; 0,03, 0,3 ; 3 et 30 $\mu\text{g/mL}$. Cette gamme permet de tester les concentrations en natalizumab présentes dans le sérum et dans le liquide céphalo-rachidien (LCR) des patients dans la vie réelle. En effet, il a été observé que la concentration en natalizumab présente, en moyenne, en début de cure dans le sérum des patients est de 80 $\mu\text{g/mL}$ et s'abaisse à 18 $\mu\text{g/mL}$ en fin de cure. De même, il a été noté, en moyenne, que cette concentration dans le LCR s'élevait à 40 ng/mL en début de cure et descendait à 20 ng/mL en fin de cure.

Dans chaque canal on procède donc, pour une valeur de concentration de natalizumab, à une expérience de capture des LTM à différents taux de cisaillements puis à une expérience de migration avec les LTM qui ont adhérents à la surface lors de la capture, à différentes vitesses de flux.

1.1.1 Expérience de capture

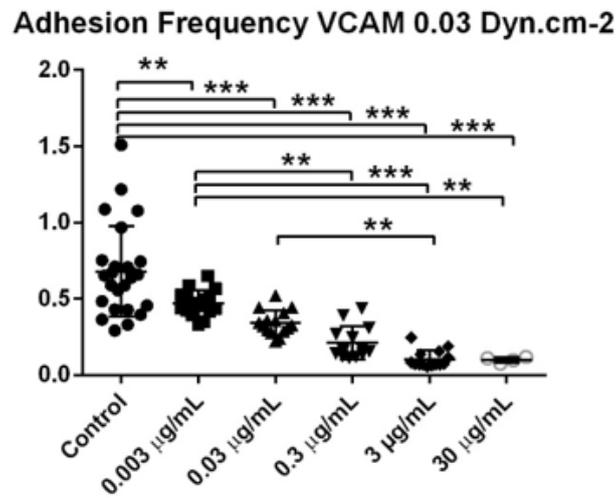


Figure 29 Fréquence d'adhésion des LTM sur VCAM-1 en fonction de la concentration en natalizumab.

On observe donc en capture, une diminution de l'adhésion initiale des LTM proportionnelle aux doses de natalizumab qu'ils ont reçus. Ce phénomène est responsable de l'effet thérapeutique du natalizumab.

1.1.2 Expérience de migration

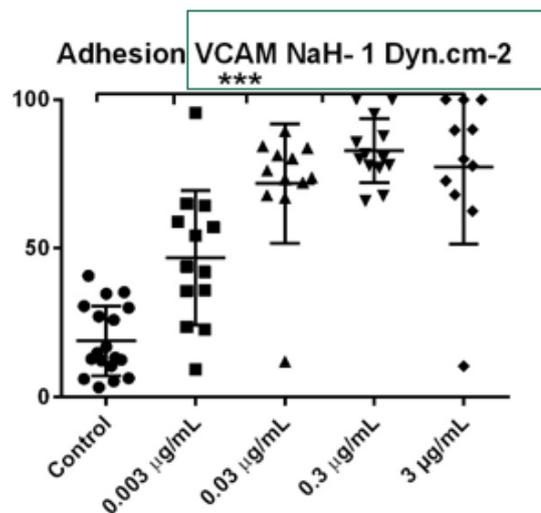


Figure 30 Résistance au flux des LTM adhérentes sur VCAM-1 en fonction de la concentration en natalizumab.

L'expérience de migration se déroule sur les LTM ayant adhérents lors de l'expérience de capture. On observe alors, une augmentation de la résistance au flux des LTM adhérents sur VCAM-1 proportionnelle aux doses de natalizumab. Les LTM restent adhérents beaucoup plus longtemps et sont fixés d'autant plus fort que la concentration en natalizumab est croissante. Cet effet signe l'effet paradoxal du natalizumab. On a donc voulu savoir si ces LTM résistants au flux, étaient ensuite capables de se déplacer et de migrer. Pour cela, on a mesuré la fraction immobile des LTM résistants au flux.

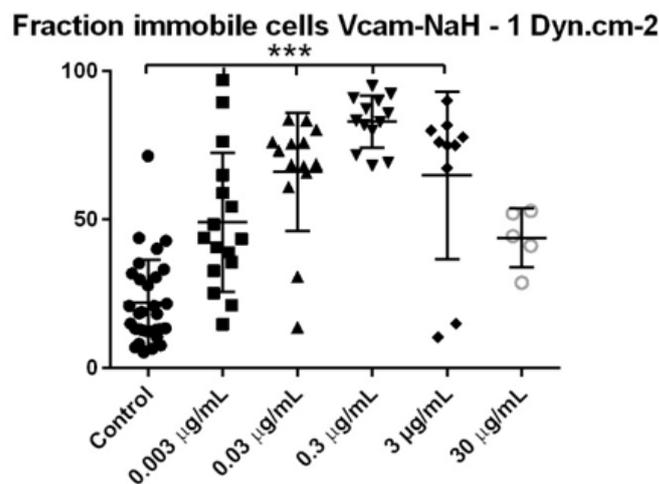


Figure 31 Fraction des LTM adhérents immobiles sur VCAM-1 en fonction de la concentration en natalizumab.

On observe donc une certaine superposition entre la figure 26 et 27. Ainsi, les LTM résistants au flux restent immobiles, proportionnellement aux doses de natalizumab.

De ces résultats, on a voulu comprendre le mécanisme de cet effet paradoxal. Il a été pensé que la structure divalente du natalizumab, caractéristique d'un anticorps, pouvait être une explication. On a alors réalisé les mêmes expériences avec une structure monovalente, un Fab de natalizumab.

1.2 Avec les LTM traités par un Fab de natalizumab

Une fois triés, on a donc mis en incubation les LTM avec un Fab de natalizumab à différentes concentrations : 0,03 ; 0,3 ; 3 et 12 $\mu\text{g/mL}$. Les mêmes expériences de capture et de migration en chambre à flux ont été réalisées.

1.2.1 Expérience de capture

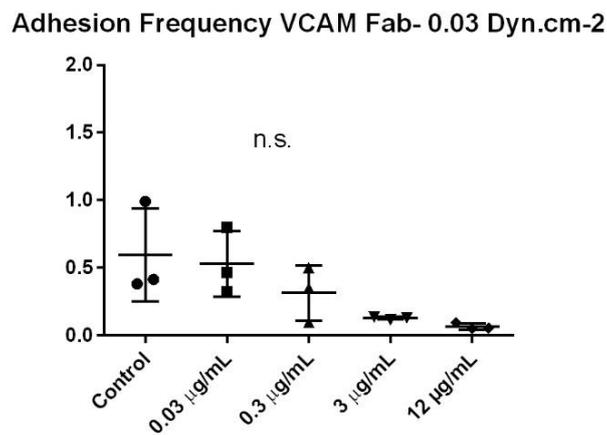


Figure 32 Fréquence d'adhésion des LTM sur VCAM-1 en fonction de la concentration en Fab de natalizumab.

On observe une diminution de la capture initiale des LTM proportionnelle aux doses de Fab de natalizumab. L'effet thérapeutique est donc également obtenu avec un simple fragment Fab.

1.2.2 Expérience de migration

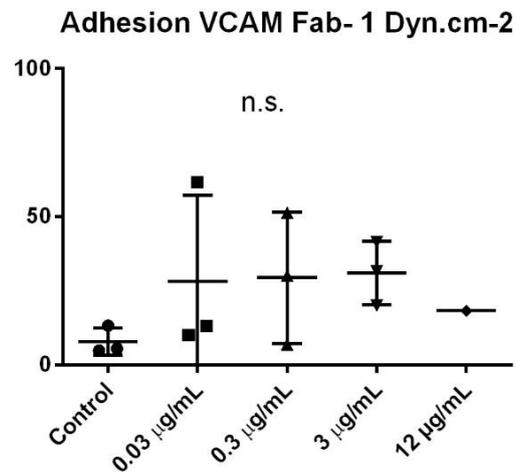


Figure 33 Résistance au flux des LTM initialement adhérents sur VCAM-1 en fonction des concentrations en Fab de natalizumab.

En migration en revanche, il n'y a pas d'augmentation de la résistance au flux de la fraction des LTM adhérents avec le Fab. L'effet paradoxal d'un anticorps complet de natalizumab disparaît donc en migration avec un Fab de natalizumab.

2. Sur surfaces modèles recouvertes de fibronectine (expériences réalisées en partie durant cette thèse)

Des interrogations sur deux inconnues que sont le rôle de la fibronectine dans la SEP d'une part, et l'effet du natalizumab sur la fibronectine d'autre part, on conduit à réaliser les mêmes expériences de capture et de migration en chambre à flux dont les canaux sont recouverts de fibronectine. Les LTM sont incubés avec du natalizumab aux concentrations de 0,003 ; 0,03 ; 0,3 ; 3 et 30 µg/mL.

Adhesion Frequency Fibronectin - 0.03 Dyn.cm⁻²

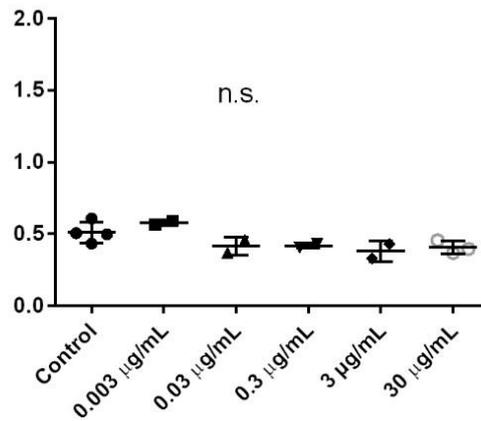


Figure 34 Fréquence d'adhésion des LTM sur la fibronectine en fonction de la concentration en natalizumab.

On remarque qu'il n'y a aucun effet observé en capture, la fréquence d'adhésion des LTM contrôles sur la fibronectine est la même que celle des LTM traités et ceci est valable quelle que soit la concentration en natalizumab.

En migration, on n'observe également aucun effet.

3. Culture des cellules endothéliales

La culture des cellules endothéliales a été une condition à définir au cours des expériences de cette thèse. En effet, après avoir constaté des résultats paradoxaux sur les surfaces modèles recouvertes de VCAM-1, l'objectif a été de voir si cet effet paradoxal était observable sur un tapis de cellules endothéliales, plus représentatif des endothéliums in-vivo.

Les HUVEC sont cultivées dans une boîte de culture contenant un milieu ECG et déposée à l'étuve. Le suivi de la croissance cellulaire est observé quotidiennement au microscope. Selon les débris cellulaires observés, le milieu de culture est renouvelé tous les 2 ou 3 jours.

La finalité de cette culture est la formation d'un tapis homogène de cellules endothéliales sur la face inférieure de la boîte, c'est-à-dire leur arrivée à confluence. On n'observe alors ni trous entre les cellules, ni chevauchement de cellules.

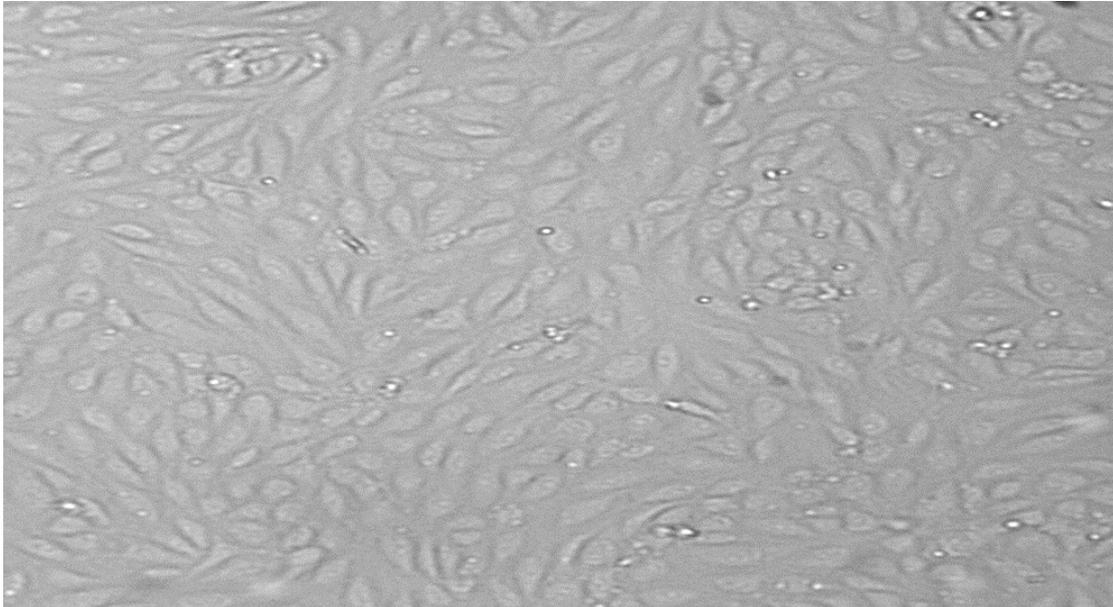


Figure 35 Observation microscopique de cellules endothéliales à confluence.

Pour assurer la pérennité de la lignée, les HUVEC doivent être trypsinisées lorsqu'elles sont à confluence. En effet, elles ne se conservent que deux jours à ce stade-là avant de dépérir. La trypsinisation consiste à ajouter de la trypsine qui a pour effet de cliver les protéines membranaires d'adhésion. Ceci produit une dissociation et un décollement des HUVEC de la boîte de culture, qui se retrouvent ainsi en suspension. On va par la suite les refaire croître dans d'autres boîtes, en les déposant à différentes concentrations pour qu'elles atteignent la confluence plus ou moins vite selon le jour auquel on en aura besoin à ce stade. Ceci permet également de multiplier le nombre de boîte de culture, on en garde en général trois, ce qui laisse une certaine sécurité si la culture ne prend pas dans les deux autres boîtes.

Une fois la culture en boîte maîtrisée, la difficulté se trouve dans l'obtention du même résultat mais dans une chambre à flux, c'est-à-dire dans des canaux de toute petite taille. Les différences de dimension sont représentées sur la figure 26. Par ailleurs, une lignée d'HUVEC ne peut pas être trypsinisée plus de 7 fois, il faut donc réaliser les expériences en chambre à flux dans ce délai-ci en prévoyant une certaine synchronisation avec l'arrivée à confluence des cellules et le jour de l'expérience.

Il faut donc trouver la bonne concentration en cellules pour qu'elles arrivent à confluence suffisamment rapidement au sein des canaux de la chambre et forment une surface homogène sans chevauchement de cellules.

Ces conditions ont été définies, de manière à ce qu'après trypsinisation des HUVEC de la boîte de culture, elles soient déposées dans les canaux de la chambre à flux à une concentration de 600 000 cellules. Elles arrivent ainsi à confluence en deux jours.

Les aspects techniques sont donc maîtrisés.



Figure 36 Différences de dimensions entre une boîte de culture cellulaire et les canaux d'une chambre à flux. Les canaux de la chambre à flux ont été colorés en rouge.

Les expériences en chambre à flux de capture et de migration sur les HUVEC ont été réalisées durant cette thèse pour différentes conditions. Deux concentrations en natalizumab ont été testées sur les LTM : 3 et 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Les LTM incubés à 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de natalizumab ont été testés sur un tapis d'HUVEC non inflammatoire et sur un tapis d'HUVEC inflammatoire. Les LTM incubés à 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ n'ont été testés que sur un tapis d'HUVEC inflammatoire. Un puit contrôle avec des LTM non traités a également été employé sur le tapis d'HUVEC non inflammatoire et sur le tapis inflammatoire. Dans chacune de ces conditions, les expériences de captures ont été

réalisées pour des valeurs de pousse-seringues de 0,13 ; 0,06 et 0,03 dynes.cm⁻² et les expériences de migration pour des valeurs de pousse-seringues de 1, 2 et 4 dynes.cm⁻².

Chacune de ces expériences a été effectuée 3 fois. Les résultats sont en cours d'analyse.

IV. Discussion

La chambre à flux laminaire est une très bonne méthode pour l'observation des phénomènes d'adhésion cellulaire. Assez facile d'utilisation, elle présente de nombreux avantages et les données acquises sont ensuite largement interprétables en routine à l'aide de logiciels spécifiques. C'est au sein même d'une chambre à flux, que le laboratoire a observé pour la première fois l'effet paradoxal du natalizumab lors des expériences de migration qui, malgré une diminution attendue de la capture sur VCAM-1, correspond à une augmentation de la résistance au flux de la fraction de cellules ayant adhérees lors des expériences de capture. Cet effet est donc qualifié de paradoxal par rapport à l'effet thérapeutique du natalizumab qui consiste en un blocage de l'adhésion lymphocytaire via l'inhibition sélective du VLA-4. De plus, cet effet paradoxal est observé in-vitro dès de très faibles concentrations en natalizumab (0,003 µg/mL), comme celles retrouvées dans le LCR des patients. La chambre à flux a également permis la suite des expériences pour élucider cet effet paradoxal. En effet, son mécanisme d'augmentation de l'adhésion des leucocytes sous certaines conditions, nous renvoie directement à une potentielle aggravation de la maladie.

Avec les expériences réalisées par le laboratoire, nous disposons dès à présent de certaines hypothèses, bien que cet effet paradoxal ne soit pas encore élucidé.

Ainsi, on a pu observer que la divalence de l'anticorps de natalizumab a un rôle central dans ce phénomène puisque cet effet n'est pas observable avec une structure monovalente qu'est un fragment Fab de natalizumab. Ceci est important car dans la circulation sanguine une grande proportion d'IgG4 est shufflée et on a donc un équivalent monovalent. La situation du Fab correspond en fait, à une réalité physiologique.

Une hypothèse pourrait être une dimérisation de VLA-4 par la fixation de l'anticorps complet de natalizumab. En effet, la dimérisation est une méthode fréquente de transmission du signal en immunologie (observée par exemple avec le récepteur des cytokines). Ce phénomène rassemble les domaines extracellulaires des récepteurs et par conséquent, les domaines intracellulaires. Ces domaines intracellulaires réagissent entre eux et produisent le déclenchement d'un signal. Des anticorps dirigés contre certaines molécules à la surface des lymphocytes T peuvent déclencher un signal, comme par exemple le CD3 qui déclenche la prolifération cellulaire. Dans le cas du natalizumab, l'idée était que la dimérisation de VLA-4 déclenchait peut-être un signal d'activation par le rassemblement de ses domaines

intracellulaires, s'opposant de cette façon à la perte d'affinité (qui n'est pas totale) due au médicament. Des expériences ont été entreprises au laboratoire avec un autre anticorps anti- $\alpha 4$ et il n'y a pas eu d'effet paradoxal observé. Un autre mécanisme est donc à évoquer. Il s'agirait peut-être d'un maintien du dimère en conformation étendue et donc activée. L'idée est que la dimérisation avec les anticorps forme des liaisons antigènes-anticorps assez rigides, donc le repliement des intégrines est peut-être gêné par cette rigidité. Cet effet serait tout à fait nouveau.

L'encombrement allostérique produit par l'anticorps complet altérerait l'interaction du VLA-4 avec le VCAM-1, ce qui rendrait ensuite la cellule incapable de migrer au travers de l'endothélium.

Les essais sur surfaces recouvertes de fibronectine n'ont montrés aucuns effets, que ça soit en capture ou en migration.

La suite des expériences a donné lieu à l'utilisation de cellules endothéliales. Ces cellules présentent de nombreux intérêts par rapport aux surfaces modèles. Tout d'abord, elles permettent la réalisation des expériences en conditions quasi-réelles pour tester l'effet paradoxal du natalizumab. L'idée finale étant d'employer de vraies surfaces avec de vrais cisaillements. De plus, elles offrent de nombreuses possibilités :

- De quantification, aussi bien pour la capture que pour la migration mais aussi pour la transmigration ;
- De variation des types endothéliaux (HUVEC, mais aussi cellules d'endothélium neurologique...);
- De tester la culture sans flux et la culture avec flux (la culture sans flux donne un signal pro-inflammatoire et le phénotype des cellules est donc plutôt inflammatoire).

Cependant, il existe certains problèmes de l'endothélium modèle qui sont à discuter. Des difficultés techniques tout d'abord, en étant long à mettre au point et donc long à mettre en œuvre. Des problèmes dans la différenciation sur plastique ensuite peuvent se poser par rapport au vrai environnement de ces cellules. Il est en effet difficile de savoir si cet état de culture sur plastique est vraiment représentatif de l'endothélium réel, en particulier si l'on cherche à différencier finement un endothélium neurologique d'un endothélium non neurologique.

La culture des HUVEC a été mise au point et est maîtrisée. La principale difficulté rencontrée pour la culture des HUVEC dans une chambre à flux a été de trouver la bonne concentration en

cellules à mettre dans les canaux de la chambre pour qu'elles forment un beau tapis à confluence.

Les expériences en chambre à flux sur les HUVEC ont été réalisées. Cependant, le contraste choisi pour l'acquisition des images où le fond formé par le tapis d'HUVEC est laissé visible, a donné lieu à des films plus lourds dont l'analyse est problématique en étant plus ardue et plus longue que celle des films obtenus lors de l'usage des surfaces modèles. Une mise au point optique devra être impérative pour les prochaines expériences afin que les films soient plus faciles à analyser, le but étant de ne pas avoir recours à une autre méthode telle que la fluorescence, permettant une analyse facile mais avec comme inconvénient de perturber les cellules.

Outre les expériences en chambre à flux, il est intéressant de maîtriser le protocole de culture des HUVEC au sein du laboratoire, car elle peut s'avérer très utile pour d'autres nombreuses expériences, dès lors que l'on recherche des conditions plus physiologiques, par la reconstitution d'un endothélium.

V. Conclusion

Le natalizumab a marqué une avancée majeure dans le traitement de la SEP. Nous disposons d'assez de recul aujourd'hui pour apprécier son efficacité clinique. L'effet paradoxal du natalizumab découvert lors d'expériences in-vitro n'a peut-être aucune importance clinique, ou participe peut-être au fonctionnement du médicament en bloquant les cellules sur la surface endothéliale. En revanche, si l'effet paradoxal est dû à une dimérisation induisant une conservation de la conformation dépliée du VLA-4 et non la transmission d'un signal par le rassemblement de ses récepteurs, ce serait le premier exemple de ce type de régulation.

Enfin, en ce qui concerne la culture des HUVEC, les aspects techniques sont maîtrisés. En effet, la culture endothéliale dans les boîtes de culture et les chambres à flux fonctionne bien. Les premières expériences complètes ont été réalisées et sont en cours d'analyse. La suite des expériences nécessitera cependant une mise au point différente de celle utilisée lors de ces premières expériences afin de faciliter l'analyse et ne pas avoir recours à une autre méthode.

VI. Liste des abréviations

AMM : Autorisation de Mise sur le Marché

BHE : Barrière Hémato-Encéphalique

BSA : Bovine Serum Albumin

β TD : beta Tail Domain

CCR6 : C-C Chemokine Receptor 6

CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité

CPA : Cellule Présentatrice d'Antigène

EAE : Encéphalomyélite Aiguë Expérimentale

EGF : Epidermal Growth Factor

HUVEC : Human Umbilical Vein Endothelial Cells

ICAM : Intercellular Cell Adhesion Molecule

IFN : Interféron

IFN γ : Interféron gamma

IL : Interleukine

IRM : Imagerie de Résonance Magnétique

IV : Intraveineuse

JAM : Junctional Adhesion Molecule

LB : Lymphocyte B

LCR : Liquide Céphalo-Rachidien

LFA-1 : Leukocyte Function Associated Antigen 1

LT : Lymphocyte T

LTM : Lymphocyte T Mémoire

Madcam 1 : Mucosal Adressin Cell Adhesion Molecule 1

MIDAS : Metal Ion Dependent Adhesion Site

NK : Natural Killer

PAMP : Pathogen Associated Molecular Pattern

PECAM-1 : Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule 1

PRR : Pattern Recognition Receptor

PSI : Plexine-Sémaphorine-Intégrine

SDF-1 α : Stroma cell-Derived Factor-1 α

SEP : Sclérose En Plaques

SEP PP : Sclérose En Plaques Progressive Primaire

SEP RR : Sclérose En Plaques Rémittente-Récurrente

SEP SP : Sclérose En Plaques Secondairement Progressive

SNC : Système Nerveux Central

TNF α : Tumor Necrosis Factor

VCAM-1 : Vascular Cell Adhesion Molecule 1

VII. Liste des figures

Figure 1 : Répartition de la SEP dans le monde

Figure 2 : Répartition de la SEP en France

Figure 3 : Physiopathologie de la SEP

Figure 4 : Pathogénèse de la SEP

Figure 5 : Echelle EDSS

Figure 6 : Les différentes molécules impliquées dans les jonctions serrées et adhérentes

Figure 7 : Homéostasie versus inflammation

Figure 8 : Les étapes du recrutement lymphocytaire

Figure 9 : Structure de la BHE

Figure 10 : Structure d'une immunoglobuline de classe G

Figure 11 : Structure des intégrines

Figure 12 : Structure de VLA-4 en conformation dépliée

Figure 13 : Changement de conformation des intégrines associé à leur état d'affinité

Figure 14 : Structure de VCAM-1, ligand de VLA-4

Figure 15 : Structure de la fibronectine

Figure 16 : La molécule JAM-2

Figure 17 : Représentation de la fixation de VCAM-1 en présence d'un Fab de natalizumab sur l'intégrine $\alpha4\beta1$

Figure 18 : Principe de la chambre à flux laminaire

Figure 20 : Sélection négative des LT par tri magnétique

Figure 21 : Chambre à flux IBIDI®

Figure 22 : Chambre à flux perfusée et déposée sur la platine du microscope inversé

Figure 23 : Représentation schématique du système complet de la chambre à flux laminaire

Figure 24 : Image de LTM évoluant sur une surface modèle

Figure 25 : Image de LTM évoluant sur un tapis d'HUVEC

Figure 26 : Histogramme du nombre de LTM en fonction de leur vitesse

Figure 27 : Traitement informatique des distances traversées par les LTM en fonction du temps

Figure 28 : Représentation schématique d'un LTM en migration, sur une surface de VCAM-1 dans une chambre à flux, sous l'application d'une contrainte de cisaillement (G)

Figure 29 : Fréquence d'adhésion des LTM sur VCAM-1 en fonction de la concentration en natalizumab

Figure 30 : Résistance au flux des LTM adhérees sur VCAM-1 en fonction de la concentration en natalizumab

Figure 31 : Fraction de LTM adhérents immobiles sur VCAM-1 en fonction de la concentration en natalizumab

Figure 32 : Fréquence d'adhésion des LTM sur VCAM-1 en fonction de la concentration en Fab de natalizumab

Figure 33 : Résistance au flux des LTM initialement adhéres sur VCAM-1 en fonction des concentrations en Fab de natalizumab

Figure 34 : Fréquence d'adhésion des LTM sur la fibronectine en fonction de la concentration en natalizumab

Figure 35 : Observation microscopique de cellules endothéliales à confluence

Figure 36 : Différence de dimensions entre une boîte de culture cellulaire et les canaux de la chambre à flux

VIII. Bibliographie

1. Meyniel C, Wiertlewski S. Névrites optiques. *Rev Médecine Interne*. juill 2010;31(7):481-5.
2. Bourneville DM (1840-1909) A du texte. Le Cas du Dr W. Pennock, ou Contribution à l'histoire de la sclérose en plaques disséminées, par Bourneville,... [Internet]. 1868 [cité 15 oct 2020]. Disponible sur: <https://gallica.bnf.fr/ark:/12148/bpt6k5612452f>
3. Définition et chiffres - Fondation Sclérose en plaques. 2020.
4. Milo R, Kahana E. Multiple sclerosis: Geoepidemiology, genetics and the environment. *Autoimmun Rev*. mars 2010;9(5):A387-94.
5. Kurtzke JF. A reassessment of the distribution of multiple sclerosis. Part one. *Acta Neurol Scand*. févr 1975;51(2):110-36.
6. Fromont A, Moreau T. Distribution de la sclérose en plaques en France métropolitaine – Distribution of multiple sclerosis in France metropolitan. *MISE AU POINT*. :4.
7. Sadovnick D. The place of environmental factors in multiple sclerosis: Genes, environment and the interactions thereof in the etiology of multiple sclerosis. *Rev Neurol (Paris)*. 1 déc 2019;175(10):593-6.
8. Brassat D. Physiopathologie de la sclérose en plaques. *Presse Médicale*. 1 mars 2010;39(3):341-8.
9. Compston A, Coles A. *Multiple Sclerosis*. 2008;372.
10. Gourraud P-A, Harbo HF, Hauser SL, Baranzini SE. The genetics of multiple sclerosis: an up-to-date review. *Immunol Rev*. 2012;248(1):87-103.
11. Goncalves-Mendes N, Talvas J, Dualé C, Guttman A, Marceau G, Laurichesse H, et al. Impact d'une supplémentation en vitamine D sur les fonctions immunitaires et la réponse vaccinale chez des sujets âgés carencés. *Nutr Clin Métabolisme*. sept 2017;31(3):235-6.
12. Allal S, Bedrane ZB, Benabadi S, Merad A, Reguig A, Saadi K, et al. Sclérose en plaques et Vitamine D—Étude prospective d'une cohorte de patients au CHU de Tlemcen. *Rev Neurol (Paris)*. mars 2017;173:S126.
13. Hawkes CH. Smoking is a risk factor for multiple sclerosis: a metanalysis. *Mult Scler J*. 1 juin 2007;13(5):610-5.
14. Bach J-F. The Effect of Infections on Susceptibility to Autoimmune and Allergic Diseases. *N Engl J Med*. 19 sept 2002;347(12):911-20.
15. CAYROL R. Régulation Moléculaire De La Barrière Hémato-Encéphalique. Université de Montréal (Canada); 2014.
16. Laplaud D. Mise au point sur la physiopathologie de la sclérose en plaques. *Ann Phys Rehabil Med*. 1 oct 2011;54:e290.

17. Babbe H, Roers A, Waisman A, Lassmann H, Goebels N, Hohlfeld R, et al. Clonal Expansions of CD82 T Cells Dominate the T Cell Infiltrate in Active Multiple Sclerosis Lesions as Shown by Micromanipulation and Single Cell Polymerase Chain Reaction. :12.
18. Rajhi MA. La sclérose en plaques : physiopathologie, thérapeutiques actuelles et futures. :198.
19. Rico A, Pelletier J, Audoin B. La sclérose en plaques. 2019.
19. Association des collèges des enseignants d'immunologie. La sclérose en plaques, 2011, http://campus.cerimes.fr/immunologie/enseignement/immuno_125/site/html/cours.pdf
21. Magy L. La sclérose en plaques. Actual Pharm Hosp. 2009;5(19):14-9.
22. Bertrand A, Epelbeaum S, Denier C. Sclérose en Plaque. Neurologie 2ème édition. MASSON; 2009. 85-100 p. (Cahier des ECN).
23. Leroy David C, Boinet T. Sclérose en plaques du jeune adulte. Actual Pharm. févr 2020;59(593):15-9.
24. Papeix C, Lubetzki C, Lyon-Caen O. Traitements actuels de la sclérose en plaques. Presse Médicale. mars 2010;39(3):381-8.
25. Vital Durand D, Le Jeune C. Dorosz - Médicaments de la SEP (I) : Interférons bêta. 37 ème. Maloine; 2018. 1332 p.
26. Petit É. Évolution et nouvelles perspectives dans la prise en charge thérapeutique de la sclérose en plaques. 2015;138.
27. Gout O, Bensa C, Assouad R. Actualités thérapeutiques de la sclérose en plaques. Rev Médecine Interne. août 2010;31(8):575-80.
28. Vital Durand D, Le Jeune C. Dorosz - Médicaments de la SEP (IV) : Immunomodulateur polypeptidique. 37 ème. Maloine; 2018. 1336 p.
29. Depaz R, Aboab J, Gout O. Actualités dans le diagnostic et la prise en charge thérapeutique de la sclérose en plaques. Rev Médecine Interne. oct 2013;34(10):628-35.
30. Watson CM, Davison AN, Baker D, O'Neill JK, Turk JL. Suppression of demyelination by mitoxantrone. Int J Immunopharmacol. janv 1991;13(7):923-30.
31. Vital Durand D, Le Jeune C. Dorosz - Médicaments de la SEP (II) : Anthracyclines. 37ème. Maloine; 2018. 1334 p.
32. Natalizumab (TYSABRI®) [Guide des anticorps monoclonaux à usage thérapeutique - Juillet 2020]. Disponible sur: https://acthera.univ-lille.fr/co/Natalizumab__TYSABRIJ_.html
33. Pérennes M, Ollivier C, Lorillon P. Place d'un nouvel anticorps monoclonal (natalizumab) dans la stratégie thérapeutique actuelle de la sclérose en plaques. Actual Pharm Hosp. févr 2008;4(13):17-22.

34. Vital Durand D, Le Jeune C. Dorosz - Médicaments de la SEP (V) : Immunosuppresseur (1). 37 ème. Maloine; 2018. 1337 p.
35. Hoepner R, Faissner S, Salmen A, Gold R, Chan A. Efficacy and Side Effects of Natalizumab Therapy in Patients with Multiple Sclerosis. *J Cent Nerv Syst Dis.* 1 janv 2014;6:JCNSD.S14049.
36. Bigaut K, Fabacher T, Outteryck O, Hélène Z, Ongagna J-C, Vermersch P, et al. Efficacité à 10 ans du natalizumab dans une cohorte Française de patients avec une sclérose en plaques récurrente-rémittente : cohorte TYSTEN. *Rev Neurol (Paris).* avr 2019;175:S84.
37. Jacquet C, Verclytte S, Toledano M, Hautecoeur P, Calais G, Mackowiak A, et al. LEMP ou EMP chez une patiente porteuse d'une sclérose en plaques traitée par natalizumab ? :1.
38. Lebrun C, de Seze J. Deux nouveaux traitements par voie orale dans la sclérose en plaques rémittente. *Rev Neurol (Paris).* déc 2014;170(12):721-2.
39. Vital Durand D, Le Jeune C. Dorosz - Médicaments de la SEP (VII) et (VIII). 37ème. Maloine; 2018. 1340-1341 p.
40. Lubetzki C. Traitement de la sclérose en plaques : progrès et nouveaux défis. *médecine/sciences.* déc 2013;29(12):1067-8.
41. Pelletier D, Hafler DA. Fingolimod for Multiple Sclerosis. *N Engl J Med.* 26 janv 2012;366(4):339-47.
42. Havrdova E, Cohen J, Horáková D, Kovarova I, Meluzinova E. Understanding the positive benefit:risk profile of alemtuzumab in relapsing multiple sclerosis: perspectives from the Alemtuzumab Clinical Development Program. *Ther Clin Risk Manag.* oct 2017;Volume 13:1423-37.
43. Montalban X, Hauser SL, Kappos L, Arnold DL, Bar-Or A, Comi G, et al. Ocrelizumab versus Placebo in Primary Progressive Multiple Sclerosis [Internet]. <http://dx.doi.org.lama.univ-amu.fr/10.1056/NEJMoa1606468>. Massachusetts Medical Society; 2016 [cité 29 août 2020]. Disponible sur: <https://www-nejm-org.lama.univ-amu.fr/doi/10.1056/NEJMoa1606468>
44. Auer M, Bsteh G, Hegen H, Wurth S, Zinganell A, Berger T, et al. Late-onset neutropenia in a multiple sclerosis patient after first dose ocrelizumab switched from rituximab. *Mult Scler Relat Disord.* août 2020;43:102155.
45. Adamec I, Reiner Ž, Pećin I, Šučur N, Godan Hauptman A, Barun B, et al. Acute pancreatitis after ocrelizumab treatment for relapsing remitting multiple sclerosis. *Mult Scler Relat Disord.* oct 2020;45:102381.
46. Stankoff B. Neuroprotection et sclérose en plaques : bases et évaluation. :1.
47. Jeannin P, Jaillon S, Delneste Y. Biologie des récepteurs de l'immunité innée : applications cliniques et thérapeutiques. *Rev Francoph Lab.* juill 2010;2010(424):41-51.
48. Leroyer A, Dignat-Georges F. Cours d'immunologie « L'immunité innée et l'immunité adaptative »- L2 Pharmacie. 2015;

49. Joffre J, Pirracchio R, Legrand M. Réponse de l'endothélium microvasculaire à l'inflammation aiguë. *Anesth Réanimation*. sept 2020;6(5):493-9.
50. Joffre J, Hellman J, Ince C, Ait-Oufella H. Endothelial Responses in Sepsis. *Am J Respir Crit Care Med*. 1 août 2020;202(3):361-70.
51. Kolářová H, Ambrůzová B, Švihálková Šindlerová L, Klinke A, Kubala L. Modulation of Endothelial Glycocalyx Structure under Inflammatory Conditions. *Mediators Inflamm* [Internet]. 2014 [cité 4 sept 2020];2014. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3997148/>
52. Opitz B, Hippenstiel S, Eitel J, Suttorp N. Extra- and intracellular innate immune recognition in endothelial cells. *Thromb Haemost*. 2007;98(08):319-26.
53. Danese S, Dejana E, Fiocchi C. Immune Regulation by Microvascular Endothelial Cells: Directing Innate and Adaptive Immunity, Coagulation, and Inflammation. *J Immunol*. 15 mai 2007;178(10):6017-22.
54. Zarbock A, Ley K. Neutrophil Adhesion and Activation under Flow. *Microcirculation*. 2009;16(1):31-42.
55. Melder RJ, Munn LL, Yamada S, Ohkubo C, Jain RK. Selectin- and integrin-mediated T-lymphocyte rolling and arrest on TNF-alpha-activated endothelium: augmentation by erythrocytes. *Biophys J*. nov 1995;69(5):2131-8.
56. Al-Omaishi J, Bashir R, Gendelman HE. The cellular immunology of multiple sclerosis. *J Leukoc Biol*. 1999;65(4):444-52.
57. Abbott NJ, Patabendige AAK, Dolman DEM, Yusof SR, Begley DJ. Structure and function of the blood–brain barrier. *Neurobiol Dis*. janv 2010;37(1):13-25.
58. Butt AM, Jones HC, Abbott NJ. Electrical resistance across the blood-brain barrier in anaesthetized rats: a developmental study. *J Physiol*. oct 1990;429:47-62.
59. Abbott NJ, Rönnbäck L, Hansson E. Astrocyte–endothelial interactions at the blood–brain barrier. *Nat Rev Neurosci*. janv 2006;7(1):41-53.
60. Bush TG, Puvanachandra N, Horner CH, Polito A, Ostefeld T, Svendsen CN, et al. Leukocyte Infiltration, Neuronal Degeneration, and Neurite Outgrowth after Ablation of Scar-Forming, Reactive Astrocytes in Adult Transgenic Mice. *Neuron*. juin 1999;23(2):297-308.
61. Armulik A, Genové G, Mäe M, Nisancioglu MH, Wallgard E, Niaudet C, et al. Pericytes regulate the blood–brain barrier. *Nature*. nov 2010;468(7323):557-61.
62. Reboldi A, Coisne C, Baumjohann D, Benvenuto F, Bottinelli D, Lira S, et al. C-C chemokine receptor 6–regulated entry of TH-17 cells into the CNS through the choroid plexus is required for the initiation of EAE. *Nat Immunol*. mai 2009;10(5):514-23.
63. Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol*. sept 2007;7(9):678-89.

64. Steinman L. A molecular trio in relapse and remission in multiple sclerosis. *Nat Rev Immunol.* juin 2009;9(6):440-7.
65. Holman DW, Klein RS, Ransohoff RM. The blood–brain barrier, chemokines and multiple sclerosis. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Basis Dis.* 1 févr 2011;1812(2):220-30.
66. Wosik K, Cayrol R, Dodelet-Devillers A, Berthelet F, Bernard M, Moundjian R, et al. Angiotensin II Controls Occludin Function and Is Required for Blood–Brain Barrier Maintenance: Relevance to Multiple Sclerosis. *J Neurosci.* 22 août 2007;27(34):9032-42.
67. Leech S, Kirk J, Plumb J, McQuaid S. Persistent endothelial abnormalities and blood–brain barrier leak in primary and secondary progressive multiple sclerosis. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2007;33(1):86-98.
68. Sabatier. *Les Anticorps Monoclonaux Thérapeutiques - M1 UE 4 Faculté de Pharmacie.* 2017.
69. Barczyk M, Carracedo S, Gullberg D. Integrins. *Cell Tissue Res.* 20 août 2009;339(1):269.
70. Calderwood DA, Shattil SJ, Ginsberg MH. Integrins and Actin Filaments: Reciprocal Regulation of Cell Adhesion and Signaling. *J Biol Chem.* 28 juill 2000;275(30):22607-10.
71. Yang GX, Hagmann WK. VLA-4 antagonists: Potent inhibitors of lymphocyte migration. *Med Res Rev.* 2003;23(3):369-92.
72. Luo B-H, Springer TA. Integrin structures and conformational signaling. *Curr Opin Cell Biol.* oct 2006;18(5):579-86.
73. Hyun Y-M, Lefort CT, Kim M. Leukocyte integrins and their ligand interactions. *Immunol Res [Internet].* 29 janv 2009 [cité 23 sept 2020]; Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2990789/>
74. González-Amaro R, Mittelbrunn M, Sánchez-Madrid F. Therapeutic anti-integrin ($\alpha 4$ and αL) monoclonal antibodies: two-edged swords? *Immunology.* nov 2005;116(3):289-96.
75. Hynes RO. Integrins: Bidirectional, Allosteric Signaling Machines. *Cell.* 20 sept 2002;110(6):673-87.
76. Carter RA, Wicks IP. Vascular cell adhesion molecule 1 (CD106): A multifaceted regulator of joint inflammation. *Arthritis Rheum.* 2001;44(5):985-94.
77. Iademarco M. Regulation of VCAM-1 Gene Expression in Inflammation. [cité 25 sept 2020]; Disponible sur: <https://grantome.com/grant/NIH/K08-HL003083-02>
78. Poulouin L, Gallet O, Imhoff J. La fibronectine : propriétés et fonctions de la molécule native et de ses fragments. *médecine/sciences.* 1997;13(5):657.
79. Xu J, Mosher D. Fibronectin and Other Adhesive Glycoproteins. In: Mecham RP, éditeur. *The Extracellular Matrix: an Overview [Internet].* Berlin, Heidelberg: Springer; 2011 [cité 26 sept 2020]. p. 41-75. (Biology of Extracellular Matrix). Disponible sur: https://doi.org/10.1007/978-3-642-16555-9_2

80. Ebnet K. Junctional adhesion molecules (JAMs): more molecules with dual functions? *J Cell Sci.* 1 janv 2004;117(1):19-29.
81. Kummer D, Ebnet K. Junctional Adhesion Molecules (JAMs): The JAM-Integrin Connection. *Cells.* avr 2018;7(4):25.
82. Ando T, Jordan P, Wang Y, Itoh M, Joh T, Sasaki M, et al. Madcam-1 Expression and Regulation in Murine Colonic Endothelial Cells in Vitro: Inflamm Bowel Dis. *mars* 2005;11(3):258-64.
83. Yu Y, Schürpf T, Springer TA. How Natalizumab Binds and Antagonizes α 4 Integrins. *J Biol Chem.* 8 nov 2013;288(45):32314-25.
84. Mendis D, Ginon I, Louis H, McGregor JL, Poston RN. Cell biotinylation provides a sensitive and effective detection technique for cellular adhesion assays: comparison with existing methods. *J Immunol Methods.* juill 2001;253(1-2):57-68.
85. Pierres A, Bongrand P. Measuring bonds between surface-associated molecules. :16.
86. Pierres A, Benoliel A-M, Bongrand P. Measuring the Lifetime of Bonds Made between Surface-linked Molecules. *J Biol Chem.* 3 nov 1995;270(44):26586-92.
87. Tissot O, Pierres A, Foa C, Delaage M, Bongrand P. Motion of cells sedimenting on a solid surface in a laminar shear flow. *Biophys J.* janv 1992;61(1):204-15.

SERMENT DE GALIEN

Je jure, en présence de mes maîtres de la Faculté, des conseillers de l'Ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

- ❖ D'honorer ceux qui m'ont instruit 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, de respecter le secret professionnel.*
- ❖ 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 d'opprobre, méprisé de mes confrères, si j'y manque.