



HAL
open science

Étude de la réponse T CD4 vis-à-vis du récepteur au N-méthyl-D-aspartate : implications pour l'immunothérapie dans l'encéphalite auto-immune

Gautier Petit-Bultez

► **To cite this version:**

Gautier Petit-Bultez. Étude de la réponse T CD4 vis-à-vis du récepteur au N-méthyl-D-aspartate : implications pour l'immunothérapie dans l'encéphalite auto-immune. Sciences pharmaceutiques. 2020. dumas-03109094

HAL Id: dumas-03109094

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-03109094>

Submitted on 13 Jan 2021

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.



MEMOIRE DU DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES

Préparé au sein de l'Université de Caen Normandie

Conformément aux dispositions de l'arrêté du 4 octobre 1988 tient lieu de

Thèse pour le diplôme d'état de Docteur en Pharmacie

**Etude de la réponse T CD4 vis-à-vis du récepteur
au N-méthyl-D-aspartate :
Implications pour l'immunothérapie
dans l'encéphalite auto-immune**

Présenté par
Gautier PETIT-BULTEZ

**Soutenu publiquement le 27 octobre 2020
devant le jury composé de**

Mr. Thomas FRERET	Professeur des Universités	Président du jury
Mme. Brigitte LE MAUFF	Professeur des Universités, Praticien Hospitalier	Examineur
Mme. Delphine MARIOTTE	Praticien Hospitalier	Examineur
Mr. Olivier TOUTIRAIS	Maître de Conférence des Universités, Praticien Hospitalier	Examineur



Mise à jour le 16/07/2019

LISTE DES ENSEIGNANTS-CHERCHEURS

Directeur de la Faculté des Sciences Pharmaceutiques
Professeur Michel BOULOUARD

Assesseurs

Professeur Pascale SCHUMANN-BARD
Professeur Anne-Sophie VOISIN-CHIRET

Directrice administrative
Madame Sarah CHEMTOB

PROFESSEURS DES UNIVERSITES

BOULOUARD Michel	Physiologie, Pharmacologie
BUREAU Ronan	Biophysique, Chémoinformatique
COLLOT Valérie	Pharmacognosie
DALLEMAGNE Patrick	Chimie médicinale
DAUPHIN François	Physiologie, Pharmacologie
DELEPEE Raphaël	Chimie analytique
FABIS Frédéric	Chimie organique
FRERET Thomas	Physiologie, Pharmacologie
GARON David	Botanique, Mycologie, Biotechnologies
GAUDUCHON Pascal Eméritat jusqu'au 31/08/2019	Biologie cellulaire
GIARD Jean-Christophe	Bactériologie, Virologie
MALZERT-FREON Aurélie	Pharmacie galénique
RAULT Sylvain Eméritat jusqu'au 31/08/2019	Chimie thérapeutique
ROCHAIS Christophe	Chimie organique
SCHUMANN-BARD Pascale	Physiologie, Pharmacologie
SICHEL François	Toxicologie
SOPKOVA Jana	Biophysique, Drug design
VOISIN-CHIRET Anne-Sophie	Chimie médicinale



MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES

ANDRE Véronique - HDR

Biochimie, Toxicologie

BOUET Valentine - HDR

Physiologie, Pharmacologie

CAILLY Thomas - HDR

Chimie bio-inorganique, Chimie organique

DENOYELLE Christophe - HDR

Biologie cellulaire et moléculaire,

Biochimie, Cancérologie

DHALLUIN Anne

Bactériologie, Virologie, Immunologie

ELDIN de PECOULAS Philippe - HDR

Parasitologie, Mycologie médicale

GROO Anne-Claire

Pharmacie galénique

KIEFFER Charline

Chimie médicinale

KRIEGER Sophie (Praticien hospitalier) - HDR

Biologie clinique

LAPORTE-WOJCIK Catherine

Chimie bio-inorganique

LEBAILLY Pierre - HDR

Santé publique

LECHEVREL Mathilde - HDR

Toxicologie

LEGER Marianne

Physiologie, Pharmacologie

LEPAILLEUR Alban - HDR

Modélisation moléculaire

N'DIAYE Monique

Parasitologie, Mycologie médicale,

Biochimie clinique

PAIZANIS Eleni

Physiologie, Pharmacologie

PEREIRA-ROSENFELD Maria de Fatima

Chimie organique et thérapeutique

POTTIER Ivannah

Chimie et toxicologie analytiques

PREVOST Virginie - HDR

Chimie analytique, Nutrition, Education

thérapeutique du patient

QUINTIN Jérôme

Pharmacognosie

RIOULT Jean-Philippe

Botanique, Mycologie, Biotechnologies

SINCE Marc

Chimie analytique

VILLEDIEU Marie - HDR

Biologie et thérapies innovantes des

cancers

PROFESSEUR AGREGE (PRAG)

PRICOT Sophie

Anglais



PERSONNEL ASSOCIE A TEMPS PARTIEL (PAST)

SAINT-LORANT Guillaume

Pharmacie clinique

SEDILLO Patrick

Pharmacie officinale

RICHARD Estelle

Pharmacie officinale

Enseignants titulaires du Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie

REMERCIEMENTS

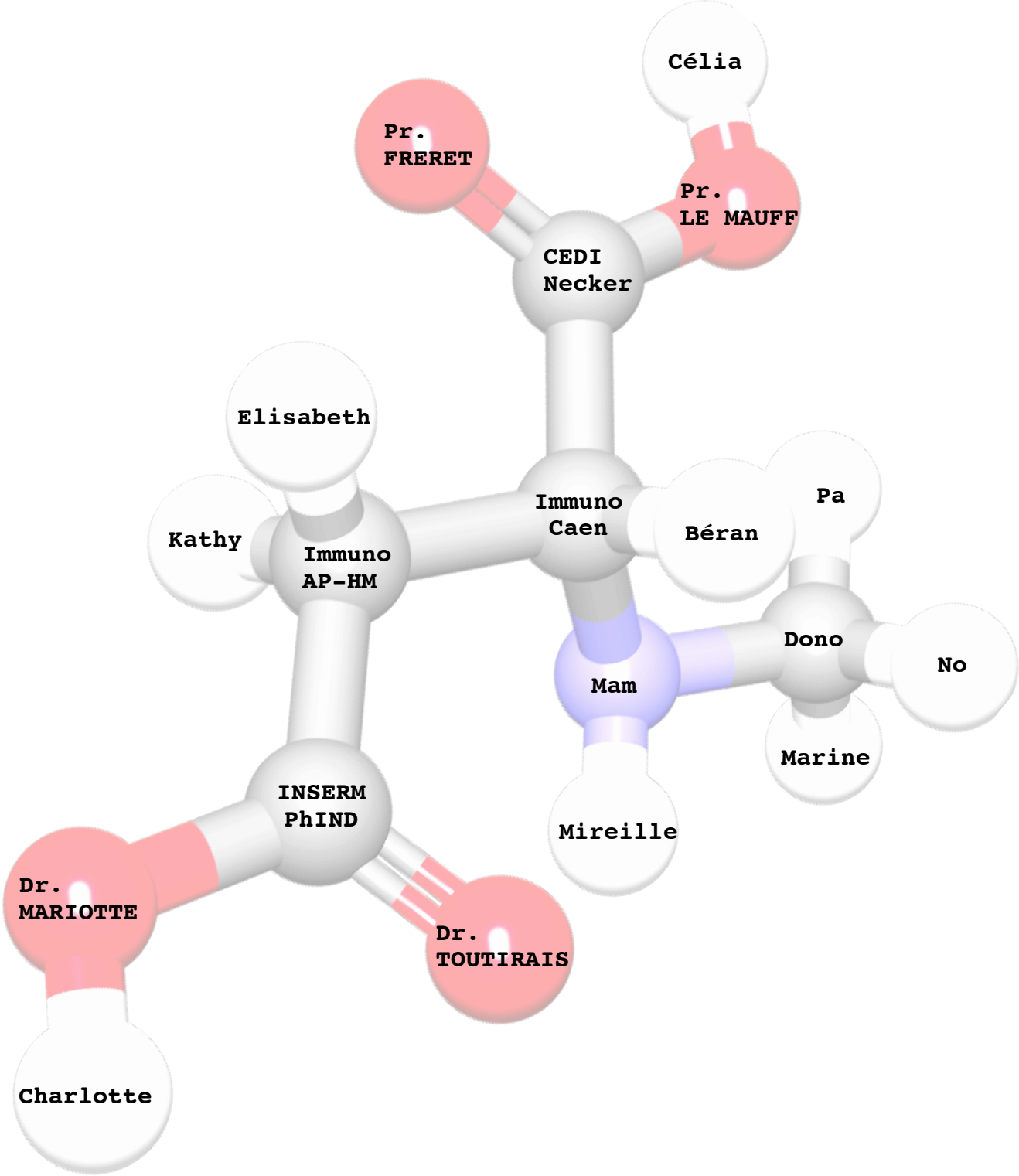


TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS

TABLE DES MATIERES

LISTE DES ABREVIATIONS	1
LISTES DES TABLES ET FIGURES	5
INTRODUCTION	7
1. Contexte de l'étude	9
2. Encéphalite à anticorps anti-récepteur au NMDA : les principales caractéristiques	12
2-1. Description épidémiologique	12
2-2. Caractéristiques cliniques	14
2-2-1. Phase prodromique	14
2-2-2. Phase d'état	14
2-2-3. Cas pédiatriques	15
2-3. Diagnostic biologique : les examens d'intérêt	16
2-3-1. Analyses du LCR	16
2-3-2. Recherche d'une synthèse intrathécale d'immunoglobulines	16
2-3-3. Identification des auto-anticorps	17
2-4. Prise en charge thérapeutique	19
2-5. Pronostic et évolution	20
3. Physiopathologie	21
3-1. Récepteur au NMDA	21
3-1-1. Structure du récepteur	21
3-1-2. Distribution et fonction du récepteur	23
3-2. Auto-anticorps anti-NMDAR	25
3-2-1. Cible des auto-anticorps	25
3-2-2. Mécanismes médiés par les auto-anticorps	27
a. Internalisation des NMDAR	27
b. Perturbation de l'interaction avec le récepteur à l'Ephrin-B2	29
c. Implication du complément	30
3-3. Origines de la réponse immune	32
3-3-1. Tératomes ovariens	32
3-3-2. Encéphalites virales	34
3-3-3. Susceptibilité génétique	36
4. Epitopes des NMDAR	37

4-1. Epitopes B des NMDAR-----	37
4-2. Epitopes T des NMDAR-----	38
4-2-1. Définition d'un épitopes T -----	38
4-2-2. Complexe majeur d'histocompatibilité de classe II -----	39
4-2-3. Apprêtement des antigènes et production des épitopes T CD4 -	40
4-2-4. Implication des lymphocytes T CD4 -----	42
a) Lymphocytes T CD4 dans les modèles d'immunisation active -----	42
b) Lymphocytes T CD4 dans l'encéphalite à anticorps anti-NMDAR --	43
MATERIELS ET METHODES -----	47
1. Cellules de sujets sains et isolement cellulaire -----	49
2. Protéine et peptides -----	49
2-1. Protéine-----	49
2-2. Peptides-----	50
3. Stimulation de CMSP en culture primaire -----	51
4. Détermination de la fréquence des lymphocytes T spécifiques -	51
4-1. Marquage avec un tétramère-----	51
4-2. Cellules présentatrices d'antigènes-----	52
4-2-1. Cellules B-EBV ^{DR1} -----	52
4-2-2 Cellules présentatrices d'antigènes artificielles -----	52
4-3. Marquage intracytoplasmique de l'IFN γ -----	53
4-4. ELISpot-----	54
RESULTATS -----	55
1. Sélection des peptides « candidats » GluN1 par analyse	
bioinformatique -----	57
2. Stimulation de CMSP en culture primaire -----	60
2-1. Mise au point des conditions de culture-----	60
2-2. Validation de la quantification des lymphocytes T	
spécifiques d'antigène par dosage de l'IFN γ -----	62
2-2-1. Marquage intracytoplasmique de l'IFN γ -----	62
2-2-2. ELISpot -----	63
2-3. Stimulation de CMSP par les peptides « candidats » GluN1-	63
2-4. Stimulation de CMSP par la protéine GluN1-----	67
2-4-1. Détermination de la fréquence des effecteurs spécifiques de la	
protéine GluN1 par marquage intracytoplasmique de l'IFN γ -----	68
2-4-2. Détermination de la fréquence des effecteurs spécifiques de la	
protéine GluN1 par ELISpot -----	69
DISCUSSION -----	71
CONCLUSION ET PERSPECTIVES -----	79
BIBLIOGRAPHIE -----	85

LISTE DES ABREVIATIONS

AA : Acide Aminé

ADN : Acide Désoxyribonucléique

ALB : Albumine

AMPA : Récepteur à l'acide α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionique

ATD : Domaine Amino-Terminal

BHE : Barrière Hémato-Encéphalique

BHM : Barrière Hémato-Méningée

BCR : *B Cell Receptor*

BSA : Albumine de sérum bovin

CBA : *Cell Based Assay*

CD : Cluster de Différenciation

CMSP : Cellules Mononucléées du Sang Périphérique

CMH-II : Complexe Majeur d'Histocompatibilité de classe II

CPA : Cellules Présentatrices d'Antigènes

CPAA : Cellules Présentatrices d'Antigènes Artificielles

DCS : *Donor Calf Sera*

DMEM : *Dulbecco's Modified Eagles Medium*

DMSO : Diméthylsulfoxyde

EBV : Epstein-Barr Virus

EFS : Etablissement Français du Sang

EPHB2R : Récepteur à l'Ephrin-B2

FITC : Fluorescéine-5-isothiocyanate

GABA : γ -aminobutyric acid

HA : Hémagglutinine

HEK : *Human Embryonic Kidney*

HLA : *Human Leukocyte Antigen*

HSV : Herpes Simplex Virus

IEDB : *Immune Epitope DataBase*

IFN γ : Interféron γ

Ig : Immunoglobuline

IgIV : Immunoglobulines Intraveineuses

IgLON5 : *Immunoglobulin LAMP-OBCAM-Neurotrimin 5*

IL : Interleukine

Iono : Ionomycine

LCR : Liquide Céphalo-Rachidien

LGI1 : *Leucine-rich Glioma Inactivated 1*

MBP : Protéine Basique de la Myéline

NMDA : N-méthyl-D-aspartate

NMDAR : Récepteur au N-méthyl-D-aspartate

PBS : *Phosphate Buffer Saline*

PE : Phycoérythrine

PE-Cy7 : Phycoérythrine Cyanine 7

PMA : Phorbol Myristate Acetate

PSD95 : *PostSynaptic Density Protein 95*

RPMI : *Roswell Park Memorial Institute*

SAB : Sérum humain AB

SNC : Système Nerveux Central

SVF : Sérum de Veau Fœtal

TCR : *T Cell Receptor*

T_{FH} : *T helper folliculaires*

Th : *T helper*

T_{REG} : T Régulateurs

LISTES DES TABLES ET FIGURES

Table 1 | Anticorps responsables d'encéphalites et ciblant des protéines synaptiques ou des récepteurs de la surface neuronale.----- 11

Table 2 | Liste des 10 peptides dérivés de la protéine GluN1 sélectionnés par analyse bioinformatique pour leur affinité vis-à-vis de la molécule HLA-DRB1*01:01.----- 59

Figure 1 | Représentation d'une sous-unité du récepteur au N-méthyl-D-aspartate (NMDAR).----- 23

Figure 2 | Identification de la cible des auto-anticorps anti-NMDAR chez les patients atteints d'encéphalite.----- 27

Figure 3 | Diminution de la densité en NMDAR à la surface des post-synapses neuronales.----- 29

Figure 4 | Mécanisme pathogénique et effet des anticorps anti-NMDAR.----- 32

Figure 5 | Epitope des auto-anticorps de patients atteints d'encéphalite à anticorps anti-NMDAR.----- 39

Figure 6 | Sillon de présentation d'une molécule de CMH-II. - 40

Figure 7 | Apprêtement des antigènes et production des épitopes T CD4.----- 42

Figure 8 | Représentation de la coopération entre lymphocytes B et lymphocytes T CD4.----- 45

Figure 9 | Résultats pour le logiciel Tepitope, de la
prédiction de l'affinité des peptides issus de la protéine
GluN1-1a pour la molécule HLA-DRB1*01:01.----- 59

Figure 10 | Détermination de la fréquence des lymphocytes T
CD4 spécifiques du peptide HA par marquage avec tétramère.
----- 62

Figure 11 | Détermination de la fréquence des lymphocytes T
CD4 spécifiques du peptide HA par marquage de l'IFN γ
intracytoplasmique.----- 65

Figure 12 | Quantification des lymphocytes T spécifiques
d'antigène, recueillis après stimulation de CMSP par le
peptide HA.----- 66

Figure 13 | Etude par dilution en cascade des effecteurs issus
de la stimulation des CMSP par le peptide HA, en ELISpot. 66

Figure 14 | Détermination de la fréquence des lymphocytes T
spécifiques des peptides « candidats » en ELISpot.----- 68

Figure 15 | Détermination de la fréquence des lymphocytes T
CD4 spécifiques de la protéine GluN1 par marquage de l'IFN γ
intracytoplasmique.----- 70

Figure 16 | Détermination en ELISpot de la fréquence des
lymphocytes T spécifiques de la protéine GluN1 par ELISpot.
----- 71

INTRODUCTION

1. Contexte de l'étude

Les encéphalites sont des inflammations rares et sévères du système nerveux central (SNC) et plus précisément du cerveau. Leur incidence, bien que difficilement mesurable, est estimée entre 4 à 9 cas pour 100 000 habitants et par an (*Granerod et al., 2013*). Elles affectent des sujets de tous âges et sont associées à une morbidité et mortalité élevées. Quand la pathologie n'est pas fatale, les individus conservent fréquemment des séquelles physiques, cognitives ou comportementales (*Venkatesan, 2015*).

Chez les individus immunocompétents, les encéphalites ont deux étiologies principales : infectieuses ou dysimmunitaires. Cependant dans un tiers des cas, l'encéphalite reste encore idiopathique (*Granerod et al., 2010*).

Ces dernières années le spectre des encéphalites auto-immunes s'est considérablement élargi avec l'identification de multiples auto-anticorps dirigés contre des protéines ou récepteurs impliqués dans la transmission synaptique. Actuellement plus d'une dizaine d'antigènes de la surface neuronale sont connus comme étant la cible d'auto-anticorps (**Table 1**) (*Dalmau and Graus, 2018*). Les anticorps anti-récepteur au NMDA (N-méthyl-D-aspartate), anti-LGI1 (leucine-rich glioma inactivated 1), ou encore, anti-récepteur à l'AMPA (acide α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionique) peuvent être cités en exemple. Ces auto-anticorps récemment caractérisés ciblent des épitopes extracellulaires, et pour certains leur effet pathogénique direct a été démontré. Ils induisent, le plus souvent, des symptômes neuropsychiatriques et peuvent survenir en présence, comme en l'absence, d'un contexte tumoral (*Dalmau et al., 2011*).

Ces nouvelles entités doivent donc être distinguées des syndromes paranéoplasiques du SNC dits « classiques » qui sont associés à des auto-anticorps (appelés onconeuronaux) ciblant des protéines intra-neuronales, et qui précèdent quasi systématiquement le diagnostic de cancers (*Dalmau and Graus, 2018*).

L'encéphalite à anticorps anti-récepteur au NMDA (NMDAR) est certainement la plus connue et la mieux caractérisée des pathologies du SNC médiée par des auto-anticorps. Selon une cohorte américaine, cette encéphalite serait même plus fréquente que les encéphalites infectieuses à entérovirus, ou à Herpès Simplex Virus (HSV) et Varicelle Zona Virus réunies (*Gable et al., 2012*).

Cible des Anticorps	Syndrome	Principales caractéristiques cliniques	Age médian	Sexe Ratio M/F	Fréquence des cancers	Type de cancer	Classe des Immunoglobulines
Récepteur NMDA	Encéphalite à anticorps anti récepteur NMDA	Trouble psychiatrique et du comportement, Epilepsie, Dyskinésie	21 ans	1 : 4	50% des femmes, rares chez les enfants et les hommes adultes	Tératome	IgG1
Recepteur AMPA	Encéphalite limbique	Confusion, Perte de mémoire	56 ans	1 : 2	56%	Thymome	IgG1
IGI1	Encéphalite limbique	Perte de mémoire, Epilepsies facio-brachiale	64 ans	2 : 1	5%	Thymome	IgG4
CASPR2	Encéphalite limbique et syndrome de Morvan	Perte de mémoire, ataxie, dysautonomie	66 ans	9 : 1	20%	Thymome	IgG4
Récepteur GABA _A	Encéphalite	Epilepsie	40 ans	1 : 1	25%	Thymome	IgG1
Récepteur GABA _B	Encéphalite limbique	Epilepsie, Perte de mémoire	61 ans	1,5 : 1	50%	Cancer du poumon à petites cellules	IgG1
DPPX	Encéphalite	Myoclonie, Confusion, Diarrhée, Perte de poids	52 ans	2 : 1	< 10%	Lymphome	IgG4
IGLON5	Encéphalite associée à une tauopathie	Trouble du sommeil	60 ans	1 : 1	0%		IgG1/IgG4
mGluR5	Encéphalite	Confusion, Trouble psychiatrique	29 ans	1,5 : 1	50%	Lymphome de Hodgkin	IgG1
Récepteur à la dopamine D2	Encéphalite des noyaux gris centraux	Symptômes Parkinsonien, Trouble psychiatrique	6 ans	1 : 1	0%		Non connue
Neurexin-30	Encéphalite	Confusion, Epilepsie	44 ans	1 : 2	0%		Non connue

Table 1 | Anticorps responsables d'encéphalites et ciblant des protéines synaptiques ou des récepteurs de la surface neuronale.

Tableau récapitulatif des principales caractéristiques cliniques et épidémiologiques des encéphalites méditées par des auto-anticorps dirigés contre des épitopes extracellulaires de protéines neuronales. NMDA N-methyl-D-aspartate; AMPA α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid; IGI1 Leucine-rich glioma inactivated 1; CASP2 Contactin-associated protein like 2; GABA γ -aminobutyric acid; DPPX Dipeptidyl-peptidase-like protein-6; IGLON5 Immunoglobulin LAMP-OBCAM-Neurotrimin 5 (*D'après Dalmau and Graus, 2018 et Dalmau et al., 2017*)

2. Encéphalite à anticorps anti-récepteur au NMDA : les principales caractéristiques

2-1. Description épidémiologique

L'encéphalite à anticorps anti-NMDAR est une encéphalite dysimmunitaire médiée par des auto-anticorps. Elle se traduit par une combinaison de troubles psychiatriques et neurologiques, pouvant évoluer vers une dysautonomie avec hypoventilation, nécessitant une prise en charge prolongée en unité de soins intensifs.

La première étude d'une cohorte de patients atteints d'encéphalite à anticorps anti-NMDAR a été réalisée en 2005 ([Vitaliani et al., 2005](#)). Cette pathologie était initialement considérée comme un syndrome paranéoplasique. C'est à dire comme un ensemble d'anomalies clinico-biologiques induit par une tumeur, mais provoqué dans une région située à distance de celle-ci. En effet, dans cette cohorte sont décrits les cas de quatre jeunes femmes ayant développées une encéphalite associée à un tératome ovarien. Cependant de nombreux autres cas ont par la suite été publiés, notamment chez des hommes et des enfants, sans qu'aucune néoplasie sous-jacente ne soit retrouvée ([Armangue et al., 2013](#)).

Les données épidémiologiques sont parfois discordantes, voire même contradictoires, selon les études. Ces différences inter-cohortes peuvent s'expliquer par les modalités de recrutement des patients. Cependant selon Titulaer et al., qui rapportent à ce jour la plus large cohorte de patients atteints d'encéphalite à anticorps anti-NMDAR, plusieurs

observations sont possibles. L'âge médian au début de la maladie est de 21 ans, avec des extrêmes allant de 8 mois à 85 ans. Néanmoins, seulement 5% des sujets ont plus de 45 ans et 37% ont moins de 18 ans. La pathologie est donc prédominante chez l'adulte jeune et chez l'enfant.

Comme dans de nombreuses maladies auto-immunes, on retrouve un biais dans le ratio homme/femme. Dans 6 à 8 cas sur 10 les sujets sont de sexe féminin (*Irani et al., 2010*) (*Wang et al., 2019*). Il est à noter que la moitié des sujets masculins sont affectés, soit avant l'âge de 12 ans, soit après 45 ans (*Titulaer et al., 2013*).

L'encéphalite à anticorps anti-NMDAR apparaît dans 40% des cas comme une manifestation paranéoplasique (*Titulaer et al., 2013*). La recherche d'un cancer est absolument nécessaire, notamment chez les femmes, puisqu'une tumeur est retrouvée chez la moitié d'entre elles. Le tératome ovarien est de très loin la néoplasie la plus fréquente (85 à 95%), par rapport aux autres cancers décrits (carcinome du poumon à petites cellules, adénocarcinome utérin ou prostatique, cancer du pancréas, carcinome thymique...) (*Bost et al., 2018*). En revanche la présence d'une tumeur est inhabituelle chez les enfants de moins de 12 ans et les sujets masculins (*Titulaer et al., 2013*).

Plus récemment il a été proposé que les encéphalites auto-immunes, et en premier lieu celles à anticorps anti-NMDAR, pouvaient succéder à une encéphalite infectieuse. Une étude prospective a rapporté que 18% des patients atteints d'encéphalites à HSV, quelque soit leur âge et leur sexe, développaient dans les semaines qui suivent, des anticorps anti-NMDAR et des signes cliniques qui leur sont associés (*Armangue et al., 2018*).

2-2. Caractéristiques cliniques

2-2-1. Phase prodromique

L'encéphalite à anticorps anti-NMDAR évolue sur un mode aigu ou subaigu. Selon les cohortes, 70 à 90% des patients présentent des symptômes avant-coureurs précédents la survenue de la phase principale de la maladie (*Dalmau et al., 2008 et 2011*). Ces symptômes prodromaux, non spécifiques, de types pseudo-grippaux, peuvent faire envisager un processus infectieux. En effet parmi ces individus, 97% présentent des céphalées ou de la fièvre, ou une association de ces deux symptômes (*Irani et al., 2010 ; Wu et al., 2020*). D'autres manifestations ont aussi été rapportées durant cette phase comme les nausées, les vomissements, les diarrhées.

2-2-2. Phase d'état

Dans les deux semaines qui suivent, les sujets développent progressivement un large spectre de symptômes neuropsychiatriques où prédominent les épilepsies et les troubles comportementaux. Ces derniers regroupent divers symptômes parmi lesquels on trouve, psychoses, hallucinations, manies, agitation, agressivité, dépression, insomnies, anxiétés, pensées suicidaires (*Wang et al., 2019*). Chez l'adulte, il est habituel que les anomalies psychiatriques soient les premiers signes à être observés. Vient ensuite l'atteinte neurologique avec des épilepsies focales ou généralisées, des dyskinésies notamment oro-faciales, des troubles mnésiques et du langage pouvant aller jusqu'au mutisme (*Dalmau et al., 2008*).

Une dysautonomie est retrouvée chez plus de 50% des patients, dont les manifestations les plus fréquentes sont des troubles du rythme cardiaque, une hyperthermie, une hypertension artérielle et une hypersialorrhée. Le principal facteur de gravité de la maladie vient de l'hypoventilation centrale pouvant nécessiter une admission des patients en unité de soins intensifs, et la mise en place d'une ventilation mécanique (Dalmau et al., 2011).

L'ensemble des patients ne présente pas l'intégralité des symptômes mentionnés précédemment. Les personnes atteintes développent, au cours des premières semaines de la maladie, au minimum 4 symptômes différents (Titulaer et al., 2013). Cependant 4% des sujets, ont une symptomatologie exclusivement restreinte aux troubles psychiatriques (Kayser et al., 2013). Quoique rares, ces symptômes psychiatriques isolés ne doivent pas être méconnus afin de ne pas retarder le diagnostic et la prise en charge (Dalmau et al., 2011).

2-2-3. Cas pédiatriques

Bien qu'une majorité de cas soit observée chez l'adulte, la fréquence de la maladie chez les enfants est non négligeable. La présentation clinique est souvent différente entre ces 2 populations. Alors que chez les adultes les premiers symptômes sont souvent psychiatriques (Titulaer et al., 2013) ; chez l'enfant de moins de 12 ans, au début de la maladie, ce sont les troubles neurologiques qui sont au premier plan, notamment les épilepsies et les dyskinésies (Favier et al., 2018). Il a été suggéré que la maturation cérébrale, ainsi que les changements hormonaux observés au cours de la puberté, puissent être à l'origine des ces différences.

2-3. Diagnostic biologique : les examens d'intérêt

2-3-1. Analyses du LCR

Au début de la maladie il est fréquent d'observer une pléiocytose lymphocytaire (*Irani et al., 2010*). Contrairement aux encéphalites virales, la pléiocytose est ici modérée avec une numération des globules blancs dans le liquide céphalo-rachidien (LCR) située entre 5 et 50 cellules/mm³, plus rarement au-delà (*Dalmau et al., 2008 ; Titulaer et al., 2013*). Une augmentation de la protéinorachie est possible qui, quand elle est présente, est plus élevée au stade précoce de la maladie (*Wu et al., 2020*). Le quotient d'albumine (ALB) calculé selon la formule (concentration ALB du LCR / concentration ALB du sérum) permet d'évaluer l'intégrité de la barrière hémato-méningée (BHM) qui est altérée dans seulement 15% des cas (*Wu et al., 2020*).

2-3-2. Recherche d'une synthèse intrathécale d'immunoglobulines

L'analyse comparée du LCR et du sérum d'un même patient, prélevés au même moment, peut révéler la présence de bandes oligoclonales. De telles bandes, si elles sont spécifiquement retrouvées dans le LCR, traduisent une réaction humorale au sein du SNC et une synthèse intrathécale d'immunoglobulines (Ig). La fréquence avec laquelle ces bandes oligoclonales sont retrouvées, dans le LCR des malades, est très variable d'une étude à l'autre, allant de 15 à 60% (*Dalmau et al., 2008 ; Malter et al., 2013 ; Wu et al., 2020*). Plusieurs éléments peuvent expliquer ces discordances. Tout d'abord il a été

proposé que l'apparition de l'oligoclonalité spécifique du LCR soit décalée dans le temps par rapport aux premiers symptômes (*Irani et al., 2010*). Ainsi une ponction lombaire effectuée trop précocement au cours de la maladie donnerait un résultat faussement négatif. Cette observation n'a cependant pas été confirmée (*Wu et al., 2020*). D'autre part, il est nécessaire de s'assurer que les prélèvements ont été réalisés avant toute immunothérapie. Une synthèse intrathécale d'Ig peut être affirmée à tort après l'administration d'immunoglobulines intraveineuses (IgIV), ou une plasmaphérèse, qui vont respectivement diluer et filtrer les Ig sériques du patient. Enfin la technique mise en œuvre doit être prise en compte. Afin d'avoir une sensibilité suffisante, les recommandations internationales préconisent une migration simultanée du LCR et du sérum par isoélectrofocalisation sur gel d'agarose avant révélation par des anti-immunoglobulines (*Freedman et al., 2005*).

Cet examen n'est pas indispensable au diagnostic. Cependant il offre la possibilité de connaître l'origine de la synthèse des auto-anticorps : interne ou externe au SNC. Il faut également noter que la mise en évidence d'une synthèse intrathécale d'Ig n'est en rien spécifique de l'encéphalite à anticorps anti-NMDAR. Elle peut être observée dans l'ensemble des maladies inflammatoires du SNC, telle que la sclérose en plaques, où elle constitue un critère diagnostique (*Thompson et al., 2018*).

2-3-3. Identification des auto-anticorps

La détection des IgG anti-GluN1 est indispensable au diagnostic définitif d'encéphalite à anticorps anti-NMDAR (*Graus et al., 2016*). Seules les IgG spécifiques doivent être recherchées. Les IgA et les IgM, bien que parfois présentes, n'ont pas démontré leur pathogénicité, et sont de plus toujours associées aux IgG (*Hara et al., 2018*).

Cette recherche peut se faire en 2 temps (*Zuliani et al., 2012*). Un test préliminaire est d'abord réalisé par immunohistochimie ou immunofluorescence indirecte sur une coupe fixée de cerveau de rat. L'incubation d'un prélèvement positif avec le substrat permet d'observer un marquage intense du neuropile hippocampique (*Dalmau et al., 2017*). Dans un deuxième temps, la spécificité de l'auto-anticorps vis-à-vis de la sous-unité GluN1 doit être confirmée. Les tests de type *Cell-Based Assay* (CBA) employant des cellules HEK293 (*Human Embryonic Kidney 293*), vivantes ou fixées, préalablement transfectées avec la protéine cible sont à privilégier car jugés plus sensibles (*Graus et al., 2016*). Les tests de type *fluorescent immunoprecipitation assay* (FIPA) offrent cependant l'avantage d'être quantitatifs (*Irani et al., 2010*).

Au moment du diagnostic, et quand il n'existe pas de contre-indication, la recherche des IgG anti-GluN1 devrait systématiquement être effectuée dans le LCR (*Ehrenreich, 2018*). En effet la comparaison de couples sérum/LCR prélevés chez des patients montre une sensibilité oscillant entre 50 et 90% pour le sérum ; contre 100% pour le LCR (*Titulaer et al., 2013 ; Gresa-Arribas et al., 2014 ; Wu et al., 2020*). De la même façon, la spécificité de ces auto-anticorps dans le sérum est extrêmement médiocre et expose donc à un risque important de résultats faussement positifs. Ils sont retrouvés dans différents contextes pathologiques comme les accidents vasculaires cérébraux (*Kalev-Zylinska et al., 2013*), les neuro-lupus (*Ogawa et al., 2016*), les épilepsies (*Dubey et al., 2017*), certaines formes de schizophrénies, la maladie de Parkinson mais également chez des individus sains (*Dahm et al., 2014*). La pertinence clinique de ces anticorps sériques est encore très discutée (*Colijn and Ismail, 2019*). Ainsi une recherche d'anticorps anti-GluN1 uniquement réalisée dans du sérum n'est pas recommandée, car pouvant conduire à des erreurs diagnostiques, et à la mise en place abusive d'une immunothérapie.

2-4. Prise en charge thérapeutique

L'encéphalite à anticorps anti-NMDAR est une pathologie inflammatoire du SNC, pour laquelle la pathogénicité des auto-anticorps a été démontrée. De ce fait, les immunothérapies sont les traitements de référence dans la prise en charge des patients (*Dalmau and Graus, 2018*). Quand elle est applicable, la résection tumorale est indispensable. Il faut toutefois noter que les recommandations thérapeutiques sont actuellement très largement basées sur l'analyse d'études rétrospectives car, à ce jour, peu d'essais cliniques ont été réalisés.

Parmi les immunothérapies communément utilisées en première ligne on retrouve la corticothérapie intraveineuse fréquemment associée aux IgIV. La corticothérapie en monothérapie n'est que très exceptionnellement utilisée (*Wang et al., 2019*) et devrait être combinée avec une autre immunothérapie plutôt qu'administrée seule (*Irani et al., 2010*). Les plasmaphérèses ou échanges plasmatiques sont rarement utilisés en première ligne. Pourtant un essai clinique randomisé confirme que les plasmaphérèses offrent une amélioration clinique plus importante au cours des premiers mois de traitement, par rapport au groupe sans plasmaphérèse (*Zhang et al., 2019*). Cette thérapeutique nécessite cependant des équipements particuliers, et peut être difficile à mettre en place selon le service d'hospitalisation.

Ces traitements de première ligne permettent dans la moitié des cas une amélioration clinique au cours des quatre premières semaines de traitement (*Titulaer et al., 2013*). Chez les 50% de patients réfractaires aux traitements de première intention, une immunothérapie de seconde ligne est nécessaire. Elle inclut, soit une molécule déplaçant les lymphocytes B (rituximab), soit un immunosuppresseur comme le cyclophosphamide, ou une association des deux (*Nosadini et al., 2015*).

Plus récemment quelques cas isolés d'encéphalites réfractaires ont été traités avec succès par du bortezomid (*Turnbull et al., 2020*). Il s'agit d'un inhibiteur du protéasome, structure chargée de dégrader les protéines intracellulaires. Cette molécule est actuellement indiquée dans la prise en charge du myélome multiple pour ses propriétés à induire l'apoptose des plasmocytes clonaux. L'efficacité de ce traitement devra être prouvée sur une cohorte prospective, mais ces observations suggèrent que cibler les cellules sécrétrices d'anticorps est une alternative à la déplétion des cellules CD20+.

Afin de contrôler les symptômes psychiatriques, l'immunothérapie peut être administrée avec des psychotropes, tels que des anti-psychotiques de première ou de deuxième génération accompagnés d'anxiolytiques (*Wang et al., 2019*). Néanmoins le recours aux anti-psychotiques semble entraîner, chez certains patients atteints d'encéphalite à anticorps anti-NMDAR, une fréquence particulièrement élevée (47%) d'effets indésirables graves comme le syndrome malin des neuroleptiques (*Lejuste et al., 2016*). Dans ce contexte d'encéphalite, les neuroleptiques devraient donc être utilisés avec précaution.

2-5. Pronostic et évolution

Malgré la sévérité des symptômes, le pronostic de la pathologie est relativement bon. Environ 75% à 80% des patients répondent favorablement à l'immunothérapie et à l'exérèse tumorale quand elle est possible, avec une récupération quasi complète (*Dalmau et al., 2008 ; Titulaer et al., 2013*). Néanmoins dans 25% des cas, les patients conservent des séquelles neurologiques importantes ou décèdent.

Plusieurs facteurs associés à une évolution clinique favorable ont été identifiés. Par exemple, les patients avec une tumeur ont une meilleure issue clinique si la résection a lieu précocement (*Dalmau et al., 2008 ; Irani et al., 2010*). Une initiation rapide de l'immunothérapie apparaît être un critère d'évolution favorable chez les adultes (*Titulaer et al., 2013*) comme chez les enfants (*Byrne et al., 2015*). L'absence d'admission dans une unité de soins intensifs est également un facteur de bon pronostic.

La fréquence des rechutes, initialement estimée à 25% des patients (*Irani et al., 2010 ; Gabilondo et al., 2011 ; Dalmau et al., 2011*), tend à baisser à 10% dans des études plus récentes (*Titulaer et al., 2013*) possiblement liée à une meilleure connaissance de la pathologie et de sa prise en charge. Dans un tiers des cas, les rechutes sont moins sévères que l'épisode initial. Elles sont aussi moins fréquentes chez les patients avec tumeur.

3. Physiopathologie

3-1. Récepteur au NMDA

3-1-1. Structure du récepteur

Les NMDAR sont des récepteurs ionotropiques glutamatergiques. Leur structure est hétérotétramérique associant deux sous-unités GluN1 et deux sous-unités GluN2 et/ou GluN3 (*Stroebel et al., 2018*), lesquelles une fois assemblées délimitent un canal ionique central. Ils sont ainsi

nommés en raison de leur affinité pour l'agoniste synthétique, le N-méthyl-D-aspartate. Les ligands endogènes, le glutamate (neuromédiateur excitateur) et la glycine, se fixent à des sous-unités différentes du récepteur, respectivement GluN2 et GluN1. A l'état basal, le canal est bloqué par du Mg^{2+} extracellulaire (*Hansen et al., 2018*).

Sept sous-unités ont été identifiées : GluN1, GluN2 (A à D) et GluN3 (A et B), codées par sept gènes indépendants (un gène GRIN1, quatre gènes GRIN2 et deux gènes GRIN3). La sous-unité GluN1 est obligatoire à la fonction des NMDAR. Grâce aux épissages alternatifs, il en existe huit isoformes (GluN1-1a à GluN1-4a et GluN1-1b à GluN1-4b) (*Paoletti et al., 2013*).

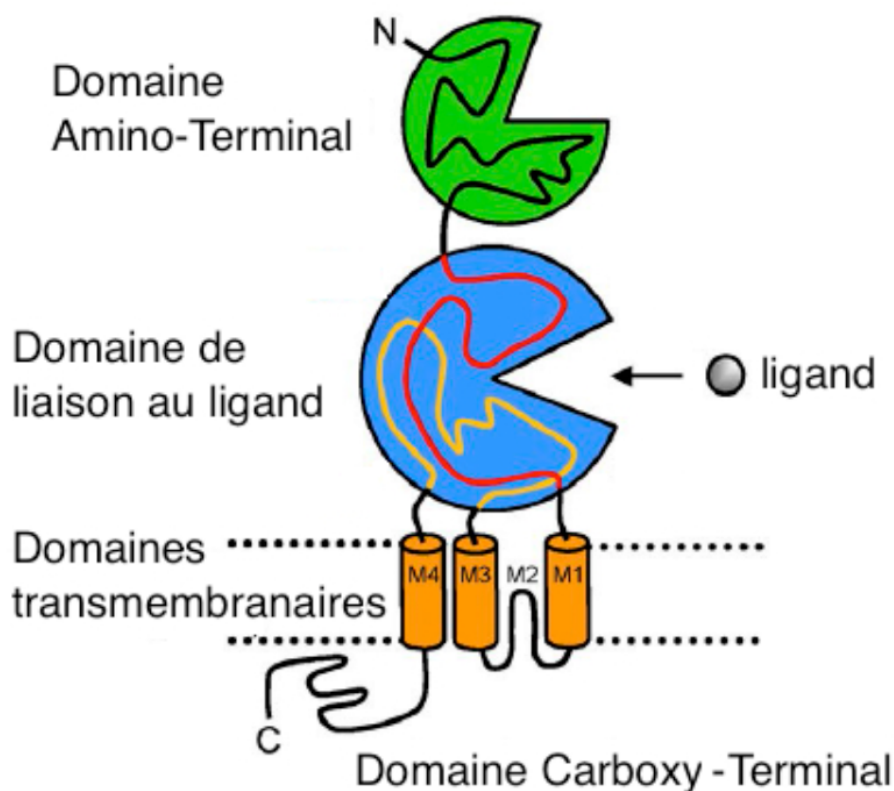


Figure 1 | Représentation d'une sous-unité du récepteur au N-méthyl-D-aspartate (NMDAR).

Une sous-unité est constituée d'un domaine amino-terminal (ATD), d'un domaine de liaison au ligand, de quatre domaines transmembranaires puis de la région intracytoplasmique (*d'après Hansen et al., 2018*). L'association de deux sous-unités GluN1 et de deux sous-unités GluN2 et/ou GluN3 constitue la structure hétérotétramérique des NMDAR.

Chaque sous-unité est constituée de quatre domaines différents: un domaine amino-terminal (ATD), un domaine de liaison au ligand, un domaine transmembranaire formé par quatre segments peptidiques, et enfin un domaine intracytoplasmique C-terminal (**Figure 1**) (*Hansen et al., 2018*). Selon la sous-unité ou l'isoforme considéré, le nombre d'acides aminés (AA) peut varier de 900 à 1480. Cette fluctuation de taille est presque toujours due à une variation dans la longueur du domaine intracytoplasmique (*Paoletti et al., 2013*).

3-1-2. Distribution et fonction du récepteur

Les NMDAR sont principalement localisés dans le SNC et exprimés à la membrane synaptique et extra-synaptique des neurones (*Stroebel et al., 2018*). Leur présence à la surface de cellules non neuronales comme les cellules gliales (*Conti et al., 1999*), ou endothéliales (*Hogan-Cann and Anderson, 2016*) a aussi été décrite.

Les NMDAR ont la particularité de fixer deux ligands différents, le glutamate et la glycine. Leur fixation entraîne un changement conformationnel du récepteur et l'ouverture du canal (*Hansen et al., 2018*). La pénétration du calcium, crucial pour la communication neuronale, modifie les propriétés biochimiques du neurone et initie un courant post-synaptique excitatoire.

La variété de sous-unités et d'isoformes ainsi que les multiples possibilités de les associer entre elles, engendrent une hétérogénéité parmi les NMDAR. Les différentes sous-unités qui composent le récepteur, lui confèrent des propriétés fonctionnelles particulières (*Hansen et al., 2018*). Il est par exemple, bien établi que les cinétiques d'activation et de désactivation des courants, la probabilité

d'ouverture du canal, la sensibilité aux agonistes et aux antagonistes sont des caractéristiques qui dépendent fortement de la (ou les) sous-unité(s) GluN2 impliquées dans le récepteur (*Cull-Candy et al., 2001*). Les sous-unités GluN2 impactent également la localisation et la circulation du récepteur à la surface neuronale. En effet les NMDAR contenant GluN2A semblent être préférentiellement synaptiques, tandis que les NMDAR avec GluN2B sont plus souvent extra-synaptiques (*Cull-Candy et al., 2001*). Cette organisation peut s'expliquer par la longueur des domaines intracytoplasmiques et leur capacité à interagir avec des protéines d'ancrages comme PSD95 (*postsynaptic density protein 95*) (*Cull-Candy et al., 2001*).

La fonction des NMDAR peut aussi, en partie, être appréhendée par l'étude des pathologies qui lui sont associées. Avant même la découverte des encéphalites auto-immunes, ces récepteurs étaient déjà connus ou suspectés pour être impliqués dans deux grands types de dysfonctionnements. Une hyperactivation des NMDAR par un excès de glutamate peut entraîner une excitotoxicité et une mort neuronale. Ce phénomène a été décrit dans la sclérose latérale amyotrophique (*Shaw and Ince, 1997*), la maladie de Huntington ou encore la maladie d'Alzheimer (*Paoletti et al., 2013*). Au cours de cette dernière, la mémantine, un antagoniste non compétitif des NMDAR, peut être indiquée. A l'inverse un hypofonctionnement des NMDAR a été suspecté dans la schizophrénie car ses symptômes se superposent à ceux observés après une administration d'antagonistes non compétitifs (kétamine ou phencyclidine) (*Zhou and Sheng, 2013*).

Des mutations dans les gènes GRIN2 ont été rapportées chez des individus avec un retard mental important parfois associé à des épilepsies (*Endele et al., 2010*), confirmant le rôle majeur des NMDAR dans le développement cérébral, ainsi que dans les processus d'apprentissage et de mémorisation (*Tsien et al., 1996*).

3-2. Auto-anticorps anti-NMDAR

3-2-1. Cible des auto-anticorps

Lorsque les premières encéphalites associées aux anticorps anti-NMDAR ont été décrites en 2005 et 2007, la cible exacte des auto-anticorps n'était pas connue. L'identification de leur cible s'est faite à l'aide d'un faisceau d'arguments. Tout d'abord, en immunohistochimie indirecte, le LCR de patients incubé sur des coupes de cerveaux de rat montre un marquage intense du neuropile de l'hippocampe (**Figure 2A**), et un marquage plus faible du cervelet, du cortex, et du striatum. L'immunomarquage concerne essentiellement les neurones de la couche moléculaire de l'hippocampe et de la couche granulaire du cervelet (*Vitaliani et al., 2005 ; Kreye et al., 2016*). Le marquage préférentiel de cette région de l'encéphale est dû à sa forte densité en NMDAR (*Monyer et al., 1994*). D'autre part, le LCR de patients incubé avec des cultures de neurones d'hippocampe de rat montre un marquage restreint à la surface cellulaire (**Figure 2B**) (*Vitaliani et al., 2005*). Prises ensemble, ces observations suggèrent que les auto-anticorps ciblent des molécules membranaires, principalement exprimées par les neurones de l'hippocampe.

La symptomatologie décrite précédemment a aussi beaucoup contribué à identifier la cible des anticorps. Effectivement, les signes cliniques miment les effets observés lors de l'utilisation d'antagonistes pharmacologiques des NMDAR tels que la phencyclidine et la kétamine. Il a alors été émis l'hypothèse que la pathologie pouvait être causée par un dysfonctionnement des NMDAR (*Dalmau et al., 2007*).

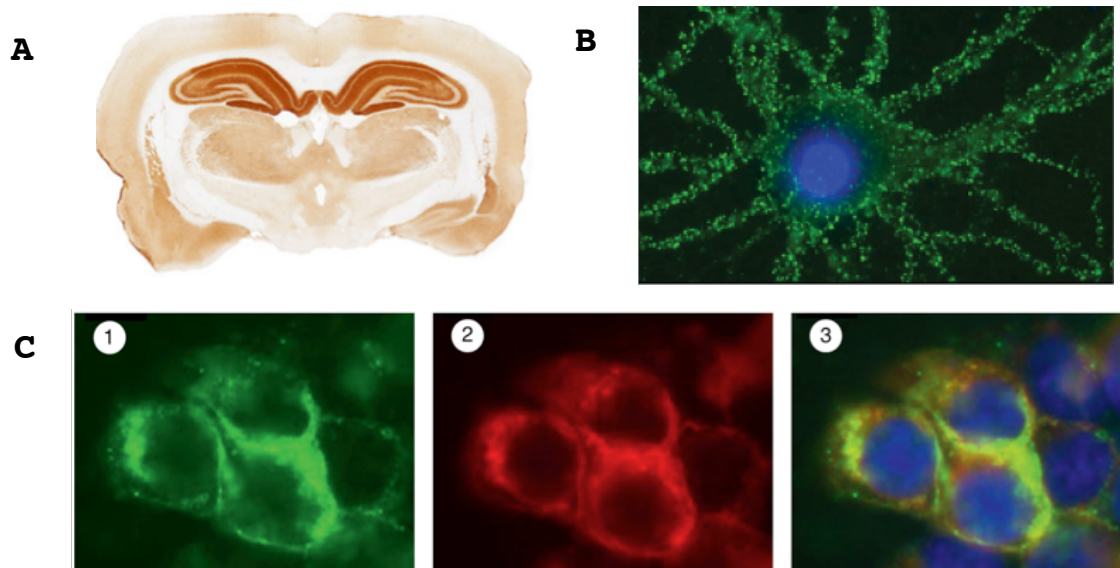


Figure 2 | Identification de la cible des auto-anticorps anti-NMDAR chez les patients atteints d'encéphalite.

(A) Coupe frontale d'un cerveau de rat incubée avec du liquide céphalo-rachidien (LCR) d'un patient atteint d'encéphalite à anticorps anti-NMDAR et révélée par une immunoglobuline anti-IgG humaine. Une intense immunoréactivité de l'hippocampe, zone dense en NMDAR, est à noter (*Dalmau et al., 2017*).

(B) Neurones d'hippocampe de rat en culture, incubés avec du LCR d'un patient. Un important marquage restreint à la membrane cellulaire est observé (*Dalmau et al., 2008*).

(C) Cellules HEK293 transfectées afin d'exprimer les sous-unités GluN1/GluN2B du NMDAR puis incubées soit avec du LCR de patients (photo 1) ; soit un anticorps monoclonal anti-GluN1 (photo 2) ; superposition des 2 immunomarquages précédents (photo 3). Le marquage du LCR du patient colocalise avec l'anticorps monoclonal anti-GluN1 (*Dalmau et al., 2011*).

En 2008, le recours aux cellules HEK293 transfectées par diverses sous-unités des NMDAR a permis de prouver que la cible des auto-anticorps était un domaine extracellulaire de GluN1 (**Figure 2C**). De plus, la transfection de cellules HEK293 avec un plasmide codant une sous-unité GluN1 tronquée pour son domaine amino-terminal, met en évidence une abrogation de la réactivité des LCR de patients (*Dalmau et al., 2008 ; Gleichman et al., 2012*). L'ensemble de ces preuves permet d'affirmer que les anticorps de patients atteints d'encéphalite à anticorps anti-NMDAR sont dirigés contre un épitope présent dans l'ATD de la protéine GluN1.

3-2-2. Mécanismes médiés par les auto-anticorps

a. Internalisation des NMDAR

Devant l'efficacité de l'immunothérapie et la corrélation du titre d'auto-anticorps avec la clinique, le rôle pathogénique des auto-anticorps de patients atteints a rapidement été suggéré. Il est aujourd'hui parfaitement admis que la pathologie est due aux auto-anticorps anti-GluN1, et que ces derniers suffisent à eux seuls, à induire une encéphalite (*Kreye et al., 2016 ; Malviya et al., 2017*).

In vitro, l'incubation du LCR de patients avec des neurones hippocampiques de rat entraîne une diminution de la densité en NMDAR à la surface synaptique (**Figure 3A**) (*Dalmau et al., 2008 ; Hughes et al., 2010*). Cet effet est induit rapidement par les anticorps anti-GluN1 puisque la densité en NMDAR est minimale après seulement 12 à 24 heures d'incubation (**Figure 3B**) (*Moscato et al., 2014*). La perte d'une partie des NMDAR entraîne donc une diminution du courant transmis par ces récepteurs, et un hypofonctionnement de la transmission glutamatergique. En revanche ces anticorps n'affectent pas l'expression des autres récepteurs synaptiques tels que les récepteurs AMPA. De plus, ils n'altèrent pas le nombre de synapses, la structure des dendrites, et n'engendrent pas de mort neuronale (*Hughes et al., 2010*).

La réduction du nombre de NMDAR à la surface neuronale est la conséquence de leur internalisation dans la synapse (**Figure 4**). Une fois internalisés, les complexes anticorps/NMDAR circulent dans la cellule au travers de vésicules d'endocytose et de lysosomes (*Moscato et al., 2014*).

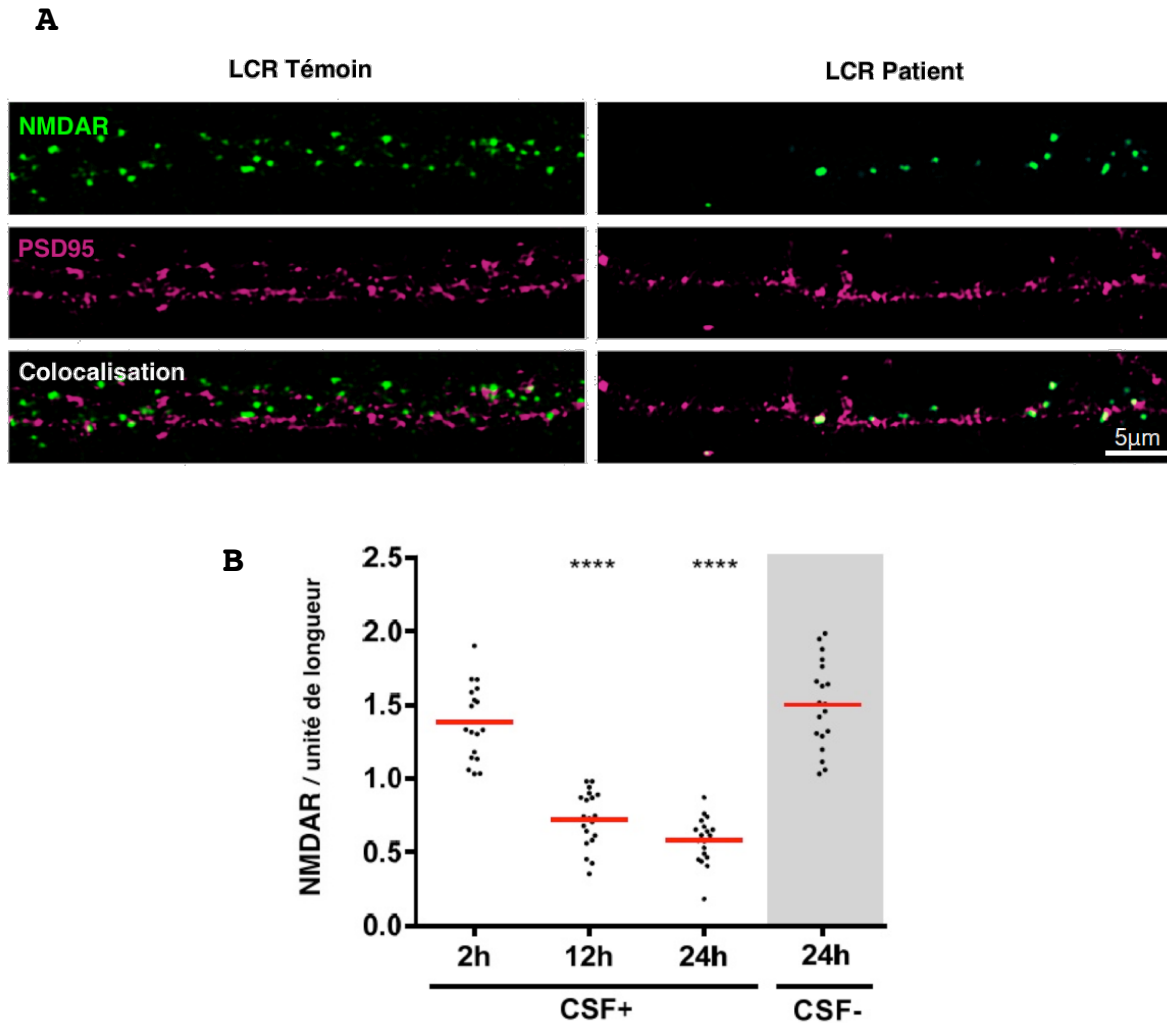


Figure 3 | Diminution de la densité en NMDAR à la surface des post-synapses neuronales.

(A) Dendrites de neurones hippocampiques de rat en culture montrant la densité en NMDAR (vert) ; la densité en PSD95, une protéine spécifiquement exprimée à la post-synapse (rose) ; et la colocalisation des NMDAR avec PSD95 (blanc) ; après 24 heures d'incubation avec le LCR du témoin (colonne de gauche) ou le LCR du patient atteint d'encéphalite à anticorps anti-NMDAR (colonne de droite). Seul le LCR du patient entraîne une réduction du nombre de NMDAR à la surface de la dendrite

(B) Les neurones hippocampiques de rat en culture sont incubés durant 2, 12 ou 24 heures avec le LCR du témoin ou le LCR du patient. Le nombre de NMDAR par unité de longueur, à la surface des dendrites, est ensuite mesuré. La densité en NMDAR est significativement diminuée après 12 à 24 heures d'incubation. (D'après Ladépêche et al., 2018).

L'élimination des anticorps dans la culture de neurones abroge ce phénomène. Ceci pouvant expliquer la réversibilité des symptômes avec une immunothérapie efficace (Hughes et al., 2010). Le phénomène d'internalisation de récepteurs membranaires avait déjà été décrit antérieurement dans

d'autres pathologies neurologiques, telles que la myasthénie gravis (*Drachman, 1994*).

L'effet pathogénique des auto-anticorps anti-GluN1 a également été démontré *in vivo*. Chez l'humain, les biopsies ainsi que les cerveaux prélevés *post mortem* montrent d'importants dépôts d'IgG dans l'hippocampe, associés à une réactivité microgliale, et une infiltration plasmocytaire dans les régions périvasculaires (*Tüzün et al., 2009*). Le transfert passif d'IgG purifiées de patients dans les ventricules cérébraux de souris induit, dans l'hippocampe de ces dernières, une diminution de la densité en NMDAR (*Hughes et al., 2010*). Cliniquement les souris développent un défaut de mémorisation et un comportement de type dépressif réversibles (*Planagumà et al., 2015*).

b. Perturbation de l'interaction avec le récepteur à l'Ephrin-B2

Les NMDAR synaptiques et notamment la sous-unité GluN1 interagissent avec un récepteur transmembranaire à activité tyrosine kinase, appelé récepteur à l'Ephrin-B2 (EPHB2R). Cette interaction permet la stabilisation et l'ancrage des NMDAR dans la membrane synaptique (*Dalva et al., 2000*). Il a été montré dans des cultures de neurones, que la fixation des auto-anticorps sur la sous-unité GluN1, perturbe l'interaction extracellulaire du NMDAR avec EPHB2R (*Mikasova et al., 2012*). Il en résulte une plus grande mobilité des NMDAR, et leur diffusion dans des régions extrasynaptiques avant leur endocytose.

L'administration de LCR de patients à des souris entraîne une diminution de la densité synaptique en NMDAR mais aussi en EPHB2R. De façon intéressante, le déficit mnésique et le comportement de type dépressif observés chez les souris, sont atténués par l'injection concomitante du LCR avec de l'ephrin-

B2, agoniste du EPHB2R, permettant un ancrage synaptique plus efficace des NMDAR et une moindre sensibilité aux effets des auto-anticorps (*Mikasova et al., 2012*). Ainsi la stimulation des EPHB2R par l'Ephrin-B2 prévient et antagonise les effets pathogéniques des anticorps anti-NMDAR observés *in vitro* et *in vivo* (*Planagumà et al., 2016*).

L'identification de ce mécanisme est particulièrement importante car l'utilisation de l'ephrin-B2 ou d'un analogue, peut être dans l'encéphalite à anticorps anti-NMDAR, une option thérapeutique envisageable, en association à une immunothérapie.

c. Implication du complément

Les anticorps anti-GluN1 responsables de la pathologie, sont exclusivement des IgG de sous-classes IgG1 et/ou IgG3 (*Tüzün et al., 2009*). Il a été montré *in vitro*, que ces auto-anticorps sont capables de fixer et d'activer le complément (*Irani et al., 2010*). Néanmoins, dans les biopsies de cerveaux de patients ainsi que dans les cerveaux prélevés *post-mortem*, aucun dépôt de complément n'est décrit (*Tüzün et al., 2009 ; Martinez-Hernandez et al., 2011*). De la même façon, dans les modèles murins avec injection d'anticorps de patients, le complément n'est pas activé et aucune mort neuronale n'est retrouvée (*Planagumà et al., 2015*). Cette apparente contradiction entre les propriétés observées *in vitro* et leur absence de rôle *in vivo*, peut s'expliquer par la présence et la sélectivité de la BHM qui entraîne physiologiquement, une faible présence du complément dans le SNC. Ainsi, il est admis que l'activation du complément n'est pas impliquée dans l'effet pathogénique des auto-anticorps.

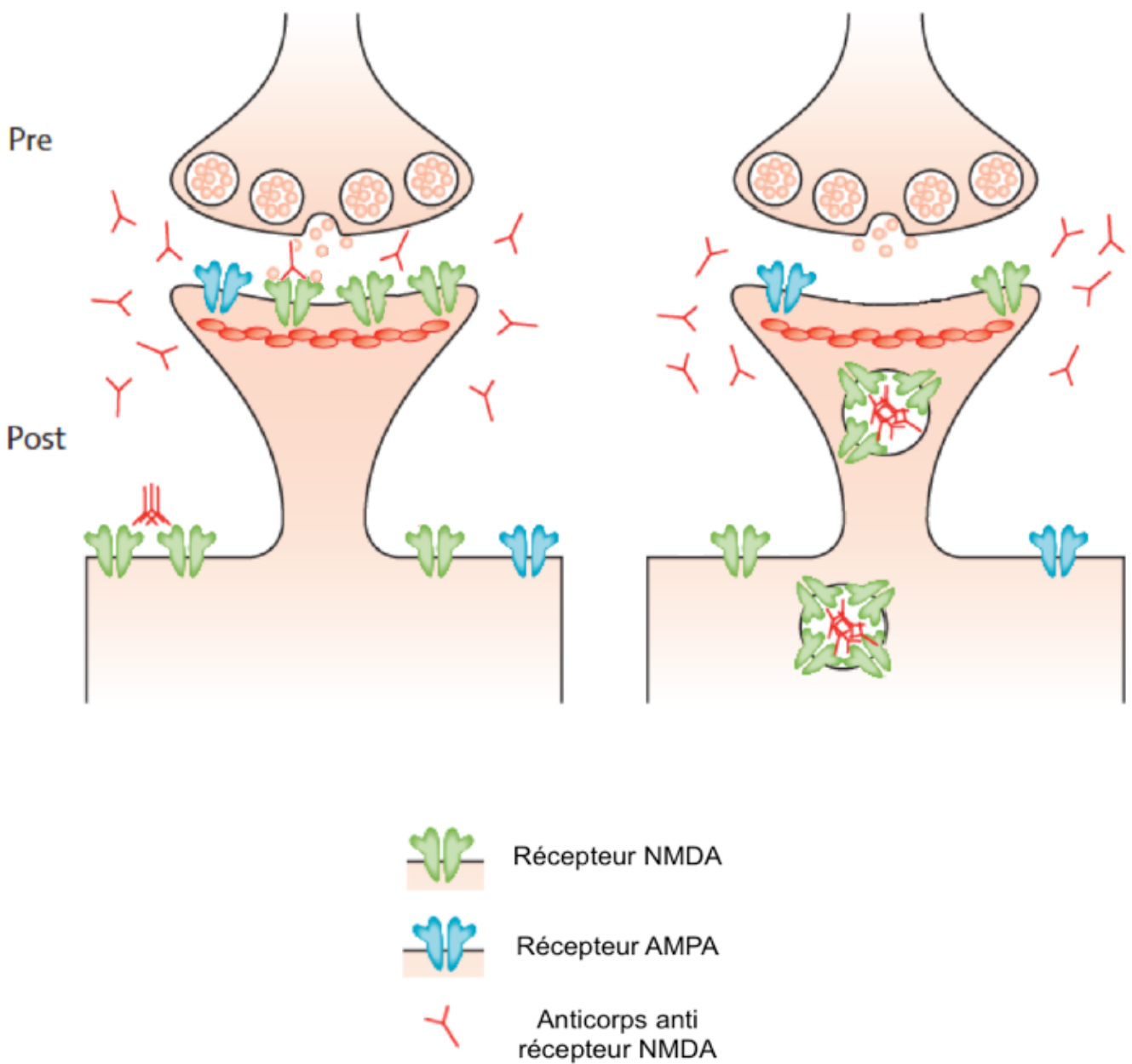


Figure 4 | Mécanisme pathogénique et effet des anticorps anti-NMDAR.

Les anticorps anti-NMDAR retrouvés chez les patients atteints d'encéphalite à anticorps anti-NMDAR induisent une diminution spécifique de la densité des NMDAR (récepteur en vert) à la surface des neurones. Cette diminution est dite spécifique car elle n'affecte pas les autres récepteurs synaptiques tels que les récepteurs AMPA (récepteur bleu). La réduction du nombre de NMDAR est la conséquence de leur internalisation dans la post-synapse. Les NMDAR ne sont donc plus disponibles pour fixer le glutamate et transmettre les signaux excitateurs (*d'après Dalmau et al., 2011*). L'altération de l'interaction des NMDAR avec le récepteur à l'Ephrin-B2 n'est pas représentée sur ce schéma.

3-3. Origines de la réponse immune

3-3-1. Tératomes ovariens

Comme dit précédemment, une néoplasie sous jacente est retrouvée dans 40% des cas et chez une femme sur deux atteintes d'encéphalite à anticorps anti-NMDAR. Chez ces dernières, le tératome ovarien est de loin la tumeur la plus fréquente (95%). Dans la très grande majorité des cas sa résection permet une amélioration significative des symptômes (*Titulaer et al., 2013*). Il apparait donc évident que cette tumeur est intimement impliquée dans la pathogénèse de l'encéphalite.

Il a été proposé qu'une expression de NMDAR au sein de la tumeur pourrait contribuer au déclenchement de l'auto-immunité (*Dalmau et al., 2007*). En effet, il est retrouvé dans l'ensemble des tératomes associés à une encéphalite, du tissu neuroglial exprimant des NMDAR (*Dalmau et al., 2007 ; Tüzün et al., 2009*). Cependant la présence de NMDAR dans le tissu neuroglial tumoral ne suffit pas à expliquer l'apparition d'une encéphalite, puisqu'il peut être également observé dans des tératomes de femmes sans symptômes neurologiques (*Dabner et al., 2012*). Ainsi l'expression ectopique de NMDAR semble être une condition nécessaire mais non suffisante au déclenchement d'un syndrome paranéoplasique.

Des neurones immatures, atypiques, dysmorphiques et dysplasiques sont retrouvés exclusivement dans le tissu neuroglial de tératomes associés aux encéphalites (*Day et al., 2014 ; Iemura et al., 2018*). Dans ces tératomes, la population astrocytaire est surreprésentée et affiche, elle aussi, des atypies (*Nolan et al., 2019*) sans que l'on comprenne l'implication de ces anomalies dans l'initiation de la réponse immune.

L'étude de l'infiltrat inflammatoire présent à proximité du tissu neuroglial de la tumeur est particulièrement intéressante. Une caractéristique frappante, dans les tératomes associés aux encéphalites, est la présence systématique d'agrégats lymphoïdes en contact direct avec le tissu neuroglial (*Dabner et al., 2012 ; Day et al., 2014 ; Tabata et al., 2014*). Ces agrégats lymphoïdes s'organisent en structure folliculaire tertiaire, avec en périphérie des lymphocytes T CD4 et T CD8, et en leur centre des lymphocytes B. De plus, les tératomes associés aux encéphalites se distinguent des autres tératomes par la présence de centres germinatifs dans ces structures folliculaires (*Dabner et al., 2012 ; Chefdeville et al., 2019*). En effet, des centres germinatifs sont retrouvés chez 92% des patients avec encéphalite contre seulement 7% des sujets sans encéphalite (*Nolan et al., 2019*). Une équipe a récemment montré que les lymphocytes B extraits de ces structures intra-tumorales, et remis en culture, sont capables de produire *in vitro* des anticorps spécifiquement dirigés contre la protéine GluN1 (*Makuch et al., 2018*).

Cette forte proximité entre le tissu nerveux atypique et l'infiltrat inflammatoire organisé en structures folliculaires avec centre germinatif contribue certainement à la rupture de tolérance du soi et la production d'auto-anticorps anti-NMDAR. Les anticorps produits, en franchissant la BHM et en allant se fixer notamment sur les récepteurs hippocampiques, induisent l'encéphalite. Il est également probable que les lymphocytes autoréactifs franchissent la barrière hémato-encéphalique (BHE). Le premier argument en faveur est la présence de plasmocytes périvasculaires dans les cerveaux *post-mortem* de patients (*Tüzün et al., 2009*). La pléiocytose fréquemment observée durant la phase d'état de la maladie est un autre argument (*Dalmau et al., 2011*), d'autant plus que récemment des cellules sécrétrices d'anticorps, isolées à partir du LCR de patients, ont permis de produire des anticorps monoclonaux recombinant anti-GluN1 (*Kreye et al., 2016 ; Malviya et al., 2017*). Pour finir, le titre normalisé en IgG anti-GluN1 est

constamment plus élevé dans le LCR que dans le sérum, traduisant une synthèse intrathécale des auto-anticorps (*Dalmau et al., 2008*).

3-3-2. Encéphalites virales

Le nombre important de cas non expliqués par un syndrome paranéoplasique a nécessité de rechercher d'autres facteurs déclencheurs. Il est à remarquer que les principaux signes cliniques de la maladie sont fréquemment précédés par des symptômes prodromiques, de type pseudo-grippaux ou gastro-intestinaux, faisant évoquer un processus infectieux et une possible activation par un agent microbien (*Dalmau et al., 2011*). Les agents infectieux sont régulièrement suspectés d'être impliqués dans l'initiation de réactions auto-immunes. Par exemple le virus Epstein-Barr (EBV) dans la sclérose en plaques (*Wucherpfennig and Strominger, 1995*), ou encore *Campylobacter jejuni* dans les syndromes de Guillain-Barré (*Willison et al., 2016*).

Récemment, il a été mis en évidence une association entre les encéphalites infectieuses à HSV et les encéphalites auto-immunes à anticorps anti-NMDAR (*Prüss et al., 2012 ; Armangue et al., 2013 ; Hacoheh et al., 2014 ; Armangue et al., 2015*). Le rapprochement entre ces deux entités fait suite à la publication de nombreux cas rapportant que les encéphalites à HSV rechutent fréquemment, après quelques semaines ou quelques mois, malgré l'administration d'antiviraux et la clairance virale au sein du SNC (*Sköldenberg et al., 2006*). Il a alors été suggéré que ces rechutes ne soient pas liées à une réactivation virale, mais plutôt causées par un mécanisme immunologique.

Une étude prospective estime qu'environ 20% des patients atteints d'encéphalite à HSV développent après cet épisode infectieux, des anticorps anti-NMDAR dirigés contre la sous-

unité GluN1 et des symptômes qui leur sont associés (*Armangue et al., 2018*), démontrant un lien évident entre ces deux encéphalites. La séroconversion vis-à-vis des NMDAR survient entre une et quatre semaines après le début de l'encéphalite herpétique (*Armangue et al., 2014*). Des anticorps ciblant des antigènes de la surface neuronale, autres que les NMDAR, peuvent être détectés de façon plus anecdotique, tels que des anticorps anti-récepteur à la dopamine D2 (*Mohammad et al., 2014*), anti-GABA_A (*Armangue et al., 2015*), ou contre des cibles encore non identifiées (*Armangue et al., 2018*).

Dans ce contexte d'encéphalite infectieuse, le mécanisme exact par lequel les patients s'immunisent vis-à-vis de la protéine GluN1 n'est pas clairement connu. Un mimétisme moléculaire entre un antigène viral et la molécule GluN1 est envisageable mais semble peu probable, étant donné que quelques patients développent des auto-anticorps autres que des anti-NMDAR. Réciproquement, le HSV n'est probablement pas l'unique virus neurotrope à pouvoir déclencher secondairement des encéphalites auto-immunes (*Tian et al., 2019*). Une hypothèse alternative, actuellement privilégiée, est celle d'une libération massive d'auto-antigènes lors d'une lyse neuronale induite par un virus (*Joubert and Dalmau, 2019*). L'accumulation de ces protéines neuronales, dans un contexte d'inflammation locale, pourrait favoriser le déclenchement d'une réponse auto-immune.

Ces données impliquent de rechercher en premier lieu, des anticorps anti-NMDAR chez tous les patients atteints d'encéphalite à HSV et pour lesquels il apparaît de nouveaux symptômes, des complications, ou des rechutes (*Armangue et al., 2015*). La méconnaissance de ce syndrome post-herpétique peut entraîner un retard dans le remplacement du traitement antiviral par une immunothérapie efficace, pouvant être dramatique notamment chez les jeunes enfants pour qui l'évolution de la maladie est significativement plus grave que chez les adolescents et les adultes (*Armangue et al., 2018*).

3-3-3. Susceptibilité génétique

Les encéphalites à anticorps anti-NMDAR peuvent apparaître chez des patients sans facteur déclenchant évident, laissant suspecter une possible prédisposition génétique à la pathologie. Dans les maladies autoimmunes, les gènes du système HLA (*Human Leukocyte Antigen*) sont considérés comme de potentiels gènes de susceptibilité, et sont donc communément étudiés. Plus de 200 associations entre gènes HLA et maladies, immuno-médiées ou non, sont actuellement connues ([Muñiz-Castrillo et al., 2020](#)). En neurologie, de telles associations ont déjà été rapportées, entre autres, dans la myasthénie gravis, la sclérose en plaques, la neuromyéélite optique, ou certaines encéphalites. Dans les encéphalites à anticorps anti-IgLON5 (*Immunoglobulin LAMP-OBCAM-Neurotrimin 5*), caractérisées par des troubles du sommeil associés à une tauopathie, l'ensemble des malades sont porteurs des allèles HLA-DRB1*10:01 et HLA-DQB1*05:01 ([Gelpi et al., 2016](#)). Concernant l'encéphalite à anticorps anti-LGI1, les molécules HLA-DR7 et HLA-DRB4 sont exprimées par respectivement 90% et 100% des patients ([van Sonderen et al., 2017](#)).

Dans l'encéphalite à anticorps anti-NMDAR les trois études réalisées à ce jour présentent des résultats particulièrement discordants ([Kim et al., 2017](#) ; [Mueller et al., 2018](#) ; [Shu et al., 2019](#)). Alors que Mueller et al. remarquent un lien avec l'allèle HLA-B*07:02 ; Shu et al., n'observent qu'une faible association avec l'allèle HLA-DRB1*16:02. Quant à Kim et al., dont l'étude portait sur un nombre très limité de patients, ils ne détectent aucune association avec un génotype HLA. Ces données contradictoires laissent à penser qu'il n'existe pas de véritable lien entre les gènes HLA et cette encéphalite.

4. Epitopes des NMDAR

4-1. Epitopes B des NMDAR

Les épitopes B correspondent aux régions d'antigènes reconnus par le BCR (*B Cell Receptor*) des lymphocytes B, et par les anticorps qui en sont issus. Les épitopes B peuvent être linéaires ou bien conformationnels. Dans ce dernier cas, l'épitope est formé par plusieurs segments discontinus et distants les uns des autres, mais rapprochés dans l'espace du fait du repliement de la molécule.

Dans l'encéphalite à anticorps anti-NMDAR, un épitope reconnu par des IgG de patients a été identifié. Ces auto-anticorps reconnaissent l'ATD de la sous-unité GluN1. La région N368/G369 de ce domaine est particulièrement importante pour la fixation des anticorps (**Figure 5**) (*Dalmau et al., 2008 ; Gleichman et al., 2012*). Récemment, il a été retrouvé dans le LCR de certains patients schizophrènes des IgG également dirigées contre GluN1 (*Jézéquel et al., 2017*). Le mécanisme d'action de ces auto-anticorps est en partie similaire à celui identifié chez les patients atteints d'encéphalite, mais il n'est pas certain que l'épitope soit identique. De façon plus générale, Castillo-Gómez et al. montrent que quelque soit l'épitope ciblé par les IgG anti-GluN1, ces derniers ont la capacité d'induire une internalisation des NMDAR, et sont donc potentiellement pathogéniques (*Castillo-Gómez et al., 2017*).

Il est à noter qu'il existe également des anticorps anti-NMDAR dirigés contre d'autres sous-unités que GluN1. Par exemple dans le lupus érythémateux disséminé, des IgG ayant une réactivité croisée entre GluN2 et l'ADN natif ont été rapportés (*Kowal et al., 2006*).

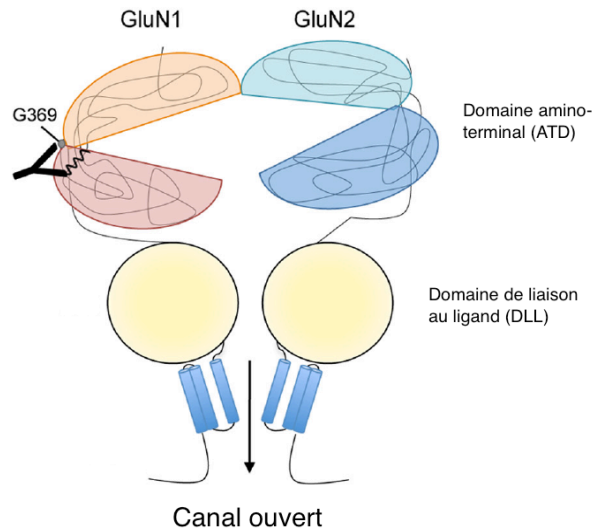


Figure 5 | Epitope des auto-anticorps de patients atteints d'encéphalite à anticorps anti-NMDAR.

Dans l'encéphalite à anticorps anti-NMDAR, un épitope B des auto-anticorps, a été identifié. Les auto-anticorps reconnaissent le domaine amino-terminal, de la sous-unité GluN1. La petite région N368/G369 de ce domaine semble être particulièrement importante à la fixation des anticorps. Cette même étude montre que la liaison de l'anticorps à cette région stabilise le canal ionique dans sa conformation ouverte (*Gleichman et al., 2012*).

4-2. Epitopes T des NMDAR

4-2-1. Définition d'un épitopes T

Les épitopes T sont des peptides issus de la dégradation de protéines endogènes ou exogènes. Il existe des épitopes T CD4 et des épitopes T CD8 qui se distinguent notamment par leur taille et leur modalité de présentation aux lymphocytes T. Seuls les épitopes T CD4 sont abordés ici. Il s'agit de peptides, d'environ dix à vingt AA, dont la présentation par l'intermédiaire des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH-II) est indispensable afin qu'ils puissent être reconnus par le TCR (*T Cell Receptor*) des lymphocytes T CD4.

4-2-2. Complexe majeur d'histocompatibilité de classe II

Les molécules de CMH-II sont des hétérodimères transmembranaires associant une chaîne α et une chaîne β dont les domaines distaux délimitent le sillon de présentation, dans lequel s'insère le peptide antigénique (**Figure 6**). Les extrémités du sillon sont ouvertes permettant l'ancrage de peptides de longueurs différentes. Les séquences d'AA dépassant, de part et d'autre du sillon, sont appelées régions flanquantes d'un peptide.

Chez l'homme, les molécules du CMH-II sont codées par les gènes du système HLA. Il existe 3 molécules HLA de classe II dites « classiques » : HLA-DR, HLA-DQ et HLA-DP. Le système HLA est extrêmement polymorphe et il est dénombré une très grande diversité d'allèles pour chaque gène HLA, avec plus de 5500 allèles de classe II identifiés à ce jour dans la population mondiale (<http://hla.alleles.org/nomenclature/stats.html>). Ce polymorphisme affecte notamment la région codant pour le sillon de présentation, et plus précisément les poches renfermant les résidus d'ancrages et d'interaction avec le peptide (*Rossjohn et al., 2015*). Ainsi la composition chimique et structurelle du sillon de présentation diffère pour chaque molécule de CMH-II et détermine le répertoire de peptides que chacun peut fixer (*Jurewicz et Stern, 2019*).

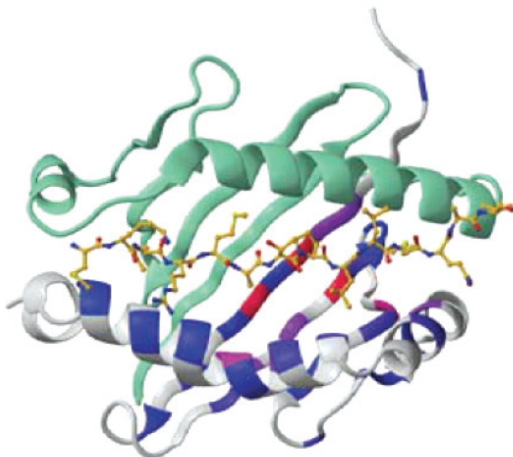


Figure 6 | Sillon de présentation d'une molécule de CMH-II.

La chaîne α (vert) et la chaîne β (gris) d'une molécule de CMH-II délimitent le sillon de présentation dans lequel vient s'insérer le peptide antigénique (jaune). Les régions polymorphiques sont représentées en bleu et en rose (*Unanue et al., 2016*).

Les molécules de CMH-II sont exprimées par les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) telles que cellules dendritiques, lymphocytes B ou macrophages. Leur rôle essentiel est de présenter les peptidiques antigéniques aux lymphocytes T CD4.

4-2-3. Apprêtement des antigènes et production des épitopes T CD4

Les épitopes T CD4 sont générés au sein des CPA, par la protéolyse des antigènes extracellulaires, internalisés par endocytose. L'acidification progressive des vésicules d'endocytose et des lysosomes favorise l'activation des protéases, notamment des cathepsines, chargée de découper les protéines en fragments de plus petites tailles.

Pendant ce temps, les molécules de CMH-II sont synthétisées dans le réticulum endoplasmique. A ce stade, le sillon de présentation du CMH-II est protégé par la chaîne invariante Ii (ou CD74). Cette chaîne est également nécessaire pour l'adressage aux lysosomes. L'absence de Ii entraîne une instabilité ainsi qu'une rétention des CMH-II dans le réticulum endoplasmique. Dans le lysosome, la chaîne Ii est digérée pour ne conserver qu'un peptide appelé CLIP. CLIP est lui-même délogé du sillon de présentation du CMH-II, par un changement conformationnel induit par une molécule HLA « non classique » HLA-DM. Le sillon de présentation est ainsi libre pour fixer un peptide antigénique présent dans le lysosome (*Jurewicz et Stern, 2019*).

La lyse protéique peut générer de multiples peptides capables de fixer les molécules de CMH-II. Cependant seuls quelques uns d'entre eux sont sélectionnés pour la présentation antigénique (*Blum et al., 2013*). Effectivement, seuls les peptides ayant une affinité suffisante et pouvant

s'adapter aux contraintes d'ancrages imposées par la molécule HLA sont sélectionnés.

Le complexe formé par l'association du CMH-II et d'un peptide est ensuite présenté au TCR d'un lymphocyte T CD4 spécifiques d'antigène, afin de permettre son activation et sa différenciation.

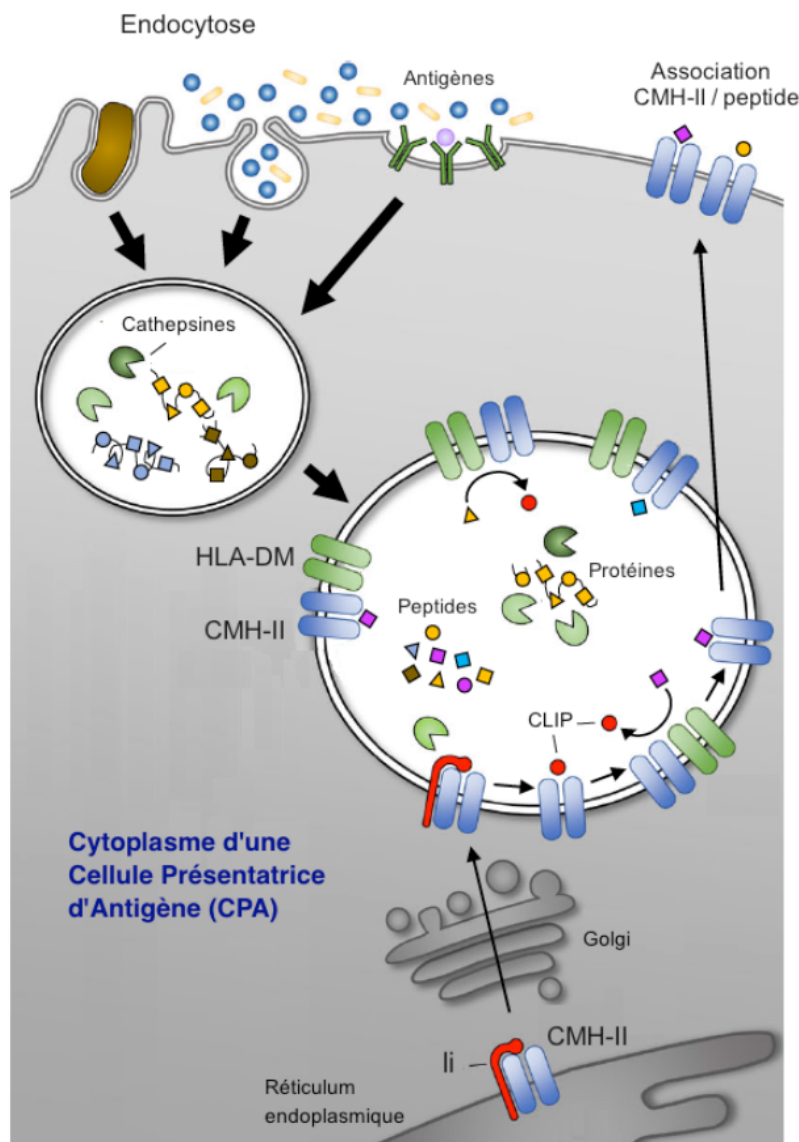


Figure 7 | Apprêtement des antigènes et production des épitopes T CD4.

Les antigènes sont endocytés par les cellules présentatrices d'antigènes (CPA). Les protéines sont dégradées en peptides à l'aide de protéases. Les molécules de CMH-II, nouvellement synthétisées dans le réticulum endoplasmique, sont associées à la chaîne li. Dans le lysosome, cette chaîne est elle-même dégradée en peptide CLIP. Grâce à la molécule HLA-DM, CLIP est délogé du sillon de présentation de la molécule de CMH-II. Le sillon de présentation est ainsi disponible pour fixer un peptide antigénique présent dans le lysosome. Le complexe CMH-II/peptide est ensuite adressé à la membrane plasmique de la CPA, pour présenter l'épitope aux TCR des lymphocytes T CD4 (d'après Jurewicz et Stern, 2019).

4-2-4. Implication des lymphocytes T CD4

a) Lymphocytes T CD4 dans les modèles d'immunisation active

Ces dernières années plusieurs modèles murins d'encéphalite à anticorps anti-NMDAR par immunisation active ont été mis au point (*Pan et al., 2019 ; Jones et al., 2019 ; Wagnon et al., 2020*). Ces modèles sont particulièrement intéressants pour analyser les mécanismes immunologiques en jeu et comprendre l'implication de chaque composant dans le développement de l'auto-immunité. Le modèle très récemment développé au laboratoire INSERM U1237 (PhIND) montre que deux semaines après immunisation avec un peptide issu de la protéine GluN1, les souris développent des IgG spécifiques. L'ensemble des tests comportementaux réalisés chez ces souris récapitule les principales caractéristiques de l'encéphalite à anticorps anti-NMDAR, à savoir troubles mnésiques, anxiété, et comportement de type dépressif (*Wagnon et al., 2020*). Dans ce modèle une infiltration de lymphocytes B est observée dans le SNC, alors que les lymphocytes T ne semblent pas être impliqués. Cependant dans le modèle proposé par Jones et al. un recrutement de lymphocytes T CD4 est retrouvé dans le parenchyme cérébral. De plus, les souris déficitaires en lymphocytes T CD4 sont incapables de produire des IgG anti-GluN1, démontrant un rôle central de ces cellules dans la pathogénèse de la maladie (*Jones et al., 2019*).

Ces contradictions, bien que pouvant s'expliquer par les différentes stratégies d'immunisation des souris, devront faire l'objet d'études supplémentaires avec notamment l'exploration des organes lymphoïdes secondaires (ganglions lymphatiques et rate), sites majeurs de la présentation antigénique.

b) Lymphocytes T CD4 dans l'encéphalite à anticorps anti-NMDAR

A notre connaissance, chez l'homme, l'implication des lymphocytes T CD4 dans l'encéphalite à anticorps anti-NMDAR n'a jamais été étudiée. Comme dit précédemment, bien que cette pathologie soit médiée par les auto-anticorps et donc par l'immunité humorale, l'immunité cellulaire, et notamment les lymphocytes T CD4 *helper* folliculaires (T_{FH}), sont requis. Ces lymphocytes T_{FH} interviennent dans les phénomènes de coopération avec les lymphocytes B. Cette coopération est nécessaire à la mise en place d'une réponse humorale vis-à-vis d'un antigène protéique. Au cours de ce phénomène les molécules CMH-II, exprimées à la surface des lymphocytes B, présentent des peptides dérivés d'une protéine antigénique aux lymphocytes T CD4. En retour, les T_{FH} contribuent à la formation d'un centre germinatif dans lequel les lymphocytes B prolifèrent et se différencient en plasmocytes ou B mémoires. Les T_{FH} favorisent également la commutation isotypique et la maturation d'affinité des IgG (**Figure 8**) (Crotty, 2019). Ainsi les IgG de haute affinité dirigées contre la sous-unité GluN1 du NMDAR, telles que retrouvées dans l'encéphalite auto-immune, seraient issues d'une coopération entre un lymphocyte B et un lymphocyte T CD4.

A l'inverse, il existe une autre sous-population de lymphocytes T CD4 dont le rôle est de maintenir une tolérance périphérique aux auto-antigènes. Il s'agit des lymphocytes T régulateurs (T_{REG}). On distingue les lymphocytes T_{REG} naturels, produits par le thymus et les lymphocytes T_{REG} induits en périphérie. Ces lymphocytes expriment fortement la chaîne α du récepteur à l'interleukine 2 (CD25), CTLA-4 (*cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4*) ainsi que le facteur de transcription FoxP3 (*Forkhead box P3*) (Wing et al., 2019).

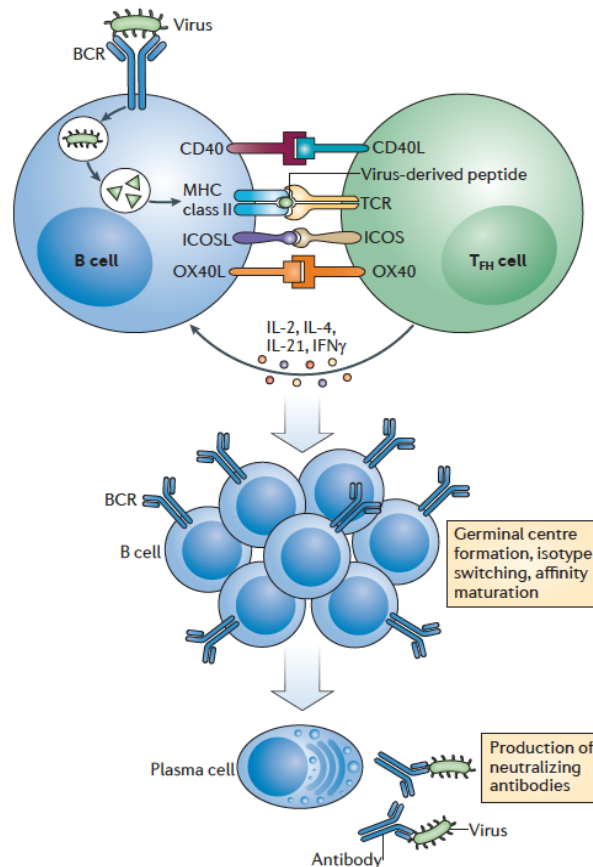


Figure 8 | Représentation de la coopération entre lymphocytes B et lymphocytes T CD4.

Les lymphocytes T CD4 *helper* folliculaires sont une sous-population de lymphocytes T CD4 impliquées dans les interactions avec les lymphocytes B. Sur le schéma, le *B Cell Receptor* (BCR) d'un lymphocyte B capte un antigène viral. Cet antigène protéique est endocyté puis apprêté. Un peptide de l'antigène viral est présenté à la surface du lymphocyte B via une molécule du CMH-II. Le complexe CMH-II/peptide est reconnu par le *T Cell Receptor* (TCR) d'un lymphocyte T CD4. Après intervention de nombreuses molécules de costimulation (CD40, CD40L, ICOS, ICOSL..) et de cytokines, le lymphocyte B peut former un centre germinatif et se différencier en cellules productrices d'anticorps IgG de haute affinité (Swain et al., 2012).

L'implication des lymphocytes T_{REG} dans la tolérance au soi et dans le contrôle de l'auto-immunité, fait de ces cellules des candidates idéales pour le développement de nouvelles approches thérapeutiques visant à moduler la réponse immune. Ces nouvelles approches pourraient être des alternatives intéressantes aux thérapies pharmacologiques non spécifiques et souvent toxiques. Différentes stratégies d'immunothérapies tolérogènes impliquant les lymphocytes T_{REG} sont à l'étude :

- Stratégie d'immunothérapie cellulaire par transfert adoptif de T_{REG} amplifiés *ex vivo*, à partir de lymphocytes T CD4+/CD25+. De nombreux essais thérapeutiques utilisant cette stratégie, notamment dans le traitement du diabète de type I, sont actuellement en cours. Il s'agit le plus souvent de transfert adoptif de T_{REG} polyclonaux (*Bluestone et al., 2015*).
- Stratégie d'immunothérapie peptidique pouvant requérir une formulation pharmacologique particulière, par exemple à base de nanoparticules recouvertes par des molécules de CMH-II présentant un peptide d'intérêt. (*Clemente-Casares et al., 2016*).

Notre objectif a été d'évaluer la réponse T CD4 vis-à-vis de l'antigène GluN1 et de déterminer quels épitopes étaient reconnus. En utilisant une approche bioinformatique, nous avons défini des séquences d'AA de la protéine GluN1 pouvant être présentées par des molécules HLA-DR. Des expériences, *in vitro*, de stimulation de cellules mononucléées du sang périphérique (CMSP) de sujets sains, par la protéine GluN1 ou les peptides candidats ont été réalisés. L'objectif est d'identifier des épitopes T CD4 issus de GluN1. L'identification de ces épitopes pourrait permettre l'élaboration d'immunothérapies tolérogènes.

MATERIELS ET **METHODES**

1. Cellules de sujets sains et isolement cellulaire

Des sujets volontaires sains exprimant l'allèle HLA-DRB1*01:01 ont été recrutés auprès de l'établissement français du sang (EFS, Hauts-de-France, Normandie, France). Après consentement, le sang a été prélevé sur tubes héparinés. Les CMSP ont été obtenues par isolement de gradient de ficoll. Brièvement, deux volumes de sang dilués au $\frac{1}{2}$ dans du tampon phosphate salin (PBS) ont été déposés sur un volume de Ficoll-Paque Plus (GE healthcare). Après centrifugation, l'anneau cellulaire a été récupéré puis lavé successivement deux fois avec du PBS. Une fraction des CMSP a été mise en culture, le reste congelé en RPMI 1640 avec 40% de sérum humain AB (SAB) décomplémenté (Sigma-Aldrich) et 10% de diméthylsulfoxyde (DMSO).

2. Protéine et peptides

2-1. Protéine

La protéine GluN1 isoforme 1a, de 938 AA (NCBI Reference Sequence NP_015566) a été fournie par la société Origene Technologies (Origene Technologies, Rockville, USA), avec une pureté supérieure à 80%.

2-2. Peptides

Les peptides issus de la sous-unité GluN1 du NMDAR ont été choisis en fonction de leur capacité à se lier à la molécule HLA-DRB1*01:01. L'affinité des peptides pour cette molécule de CMH-II est issue d'une prédiction bioinformatique réalisée à partir de la structure de la protéine GluN1-1a. Notre analyse informatique, effectuée en septembre 2018, a fait appel à trois logiciels, reposant sur des algorithmes différents :

- Immune Epitope DataBase (IEDB) (<http://tools.iedb.org/mhcii/>)
- NetMHCIIpan (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetMHCIIpan/>)
- Tepitope (<http://crdd.osdd.net/raghava/propred/>)

Un score global théorique a été calculé à partir des scores obtenus avec les trois logiciels (*Cf Partie résultats*). Ce score a permis de sélectionner dix peptides, de 15 AA, nous apparaissant les plus intéressants à tester. Pour des raisons de confidentialité, la séquence en AA de chacun des peptides ainsi que leur position au sein de la protéine GluN1 ne sont pas communiqués dans ce mémoire. Les peptides ont été simplement numérotés de 1 à 10.

L'ensemble des peptides a été synthétisé avec une pureté supérieure à 85%, sauf pour trois d'entre eux (peptide 6, peptide 8 et peptide 10) (J.Leprince, Inserm U982, Rouen, France). Selon les caractéristiques d'hydro-solubilité des peptides, déterminée à l'aide d'un site internet (https://www.peptide2.com/N_peptide_hydrophobicity_hydrophilicity.php), différents solvants ont été employés pour les solubiliser : eau stérile, éthanol ou acide acétique 10%. Un peptide de la protéine basique de la myéline (MBP) MBP₈₄₋₁₀₂ DENPVVHFFKNIVTPRTPP a été utilisé comme témoin négatif. Pour le témoin positif, il a été choisi un peptide de l'hémagglutinine HA₃₀₆₋₃₁₈ PKYVKQNTLKLAT issu du virus grippal H3N2. Les peptides ont été utilisés à 10 µg/ml.

3. Stimulation de CMSP en culture primaire

Les CMSP à la concentration de 2×10^6 cellules/ml ont été reprises dans du milieu constitué de RPMI 1640 (Gibco) supplémenté par 5% de SAB décomplémenté, 1% de GlutaMAX (Gibco), 1% d'antibiotiques pénicilline/streptomycine et tamponné par 20 mM d'HEPES, puis distribuées dans une plaque 24 puits à raison d'1 ml par puits. Enfin, les CMSP ont été mises en présence d'1 $\mu\text{g/ml}$ de protéine GluN1 ou de 10 $\mu\text{g/ml}$ de peptides. Des puits avec des CMSP non stimulées ont également été préparés. A partir du quatrième jour de culture puis tous les quatre jours, un tiers du milieu de chaque puits a été renouvelé et 20 UI/ml d'interleukine 2 (IL-2) (PROLEUKIN*) ont été ajoutés, sur une période de quinze jours.

4. Détermination de la fréquence des lymphocytes T spécifiques

4-1. Marquage avec un tétramère

Environ douze jours après le début de la culture primaire, une détermination de la fréquence des lymphocytes T CD4 spécifiques du peptide HA a été réalisée grâce à l'utilisation d'un tétramère. Les cellules ont d'abord été marquées, à + 4°C durant 20 minutes, avec un anticorps anti-CD4 couplé à la PE-Cy7 ou couplé au FITC (Beckton Dickinson), dans du tampon PBS/Albumine de sérum bovin (BSA) (Eurobio) 0,5%.

Ensuite les cellules ont été marquées, à température ambiante durant 30 minutes, dans le même tampon, avec le tétramère HLA-DRB1*01:01-HA ou le tétramère témoin négatif HLA-DRB1*01:01-CLIP (NIH Tetramer Core Facility, Atlanta, USA).

4-2. Cellules présentatrices d'antigènes

4-2-1. Cellules B-EBV^{DR1}

Une lignée de lymphocytes B transformés par le virus Epstein-Barr (B-EBV) a été utilisée en tant que CPA lors de l'activation des lymphocytes T. Cette lignée est homozygote pour l'allèle HLA-DRB1*01:01 (B-EBV^{DR1}) (H.Vié, Inserm U1232, Nantes, France). Elle a été mise en culture dans du RPMI 1640 enrichie par 10% de sérum de veau fœtal (SVF) décomplémenté, 1% GlutaMAX et 1% pénicilline/streptomycine. La lignée est entretenue tous les trois à quatre jours en ramenant la concentration des cellules à 10⁵ cellules/ml.

4-2-2 Cellules présentatrices d'antigènes artificielles

Les CPA artificielles (CPAA) sont issues de fibroblastes murins génétiquement modifiés afin d'exprimer diverses molécules humaines, HLA-DRB1*01:01, CD80, ICAM-1 et LFA-3, nécessaires à l'activation des lymphocytes T CD4 (*Garnier et al., 2016*). Les CPAA^{DR1} ont été cultivées en flasques de 25 ou 75 ml dans du milieu constitué de DMEM avec GlutaMAX (Gibco) supplémenté avec 10% de DCS (*Donor Calf Sera*) et 1% de pénicilline/streptomycine. Elles ont été repiquées

lorsqu'elles étaient à confluence (environ tous les quatre à cinq jours).

4-3. Marquage intracytoplasmique de l'IFN γ

Dans des tubes à hémolyse stériles, des cellules B-EBV^{DR1} à 10^6 /ml ont été chargées avec 10 μ g/ml d'un peptide d'intérêt, durant 1 heure à 37°C 5% CO₂. Les effecteurs T ont été mis en culture avec les cellules B-EBV^{DR1} chargées, au ratio 1:1 (une CPA pour un effecteur) durant 6 heures. Pour réaliser un témoin positif, des effecteurs T, ont également été activés par du phorbol-myristate-acétate (PMA) - ionomycine (Iono) aux concentrations respectives de 25 ng/ml et 1 μ g/ml. De la brefeldine A (Sigma-Aldrich), à 3 μ g/ml, a été ajoutée 5 heures avant la fin de la culture.

A la fin de l'incubation, les cellules ont été fixées par du paraformaldéhyde 4%, lavées à deux reprises avec du PBS puis stockées à + 4°C durant la nuit. Le lendemain, les cellules ont été marquées à + 4°C, en PBS/BSA 0,5%, à l'aide d'anticorps anti-CD4 couplé à la PE-Cy7. La perméabilisation, a été réalisée avec du PBS/BSA 0,5%/saponine 0,2%, pendant 5 minutes. Le marquage intracytoplasmique de l'interféron γ (IFN γ) a été effectué, à température ambiante, avec un anticorps spécifique couplé à l'APC (Miltenyi Biotec).

L'acquisition a été faite avec un cytomètre FACSVerse (BD Biosciences). Les données ont ensuite été analysées avec le logiciel BDFACSuite (BD) ou Kaluza (Beckman Coulter).

4-4. ELISpot

La capacité des effecteurs T à sécréter de l'IFN γ a été évaluée par ELISpot (*enzyme-linked immunospot*) en utilisant des plaques 96 puits, au fond desquels une membrane de PVDF (polyfluorure de vinylidène) a été recouverte avec un anticorps de capture anti-IFN γ (Diaclone, Besançon, France). Après quinze jours de culture primaire, les effecteurs ont été récupérés, lavés, puis mis en contact avec les cellules B-EBV^{DR1}, au ratio 1:10 (une CPA pour dix effecteurs). Ce mélange a été distribué à raison de 100 μ l, soit 10^5 effecteurs, par puits. Le peptide d'intérêt ou la protéine GluN1 ont ensuite été ajoutés à la concentration finale de 10 μ g/ml. Un témoin négatif a été réalisé en incubant les effecteurs T avec les cellules B-EBV^{DR1} ainsi que le solvant ayant servi à solubiliser le peptide. Un témoin positif a été réalisé en incubant des effecteurs avec du PMA-Iono, respectivement à 10 ng/ml et 500 ng/ml. L'ensemble des conditions a été réalisé en duplicats.

Après 20 heures d'incubation à 37°C, sous 5% de CO $_2$, les étapes de révélation ont été exécutées. Après avoir lavé la plaque, l'anticorps de détection biotinylé a été ajouté, puis la phosphatase alcaline couplée à la streptavidine. Enfin le substrat chromogène de l'enzyme, le BCIP/NBT (5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate/Nitro Blue Tetrazolium), a été introduit pour révéler les spots.

La capture de la plaque ELISpot et sa numérisation ont été effectuées par l'automate CTL S5 Versa et le logiciel Immunocapture 6.3 (Inserm U1234, Rouen, France). L'analyse des images scannées et le comptage des spots correspondants à des cellules sécrétrices d'IFN γ , ont été réalisés avec le logiciel Immunospot 5.0 en respectant les recommandations de Janetzki et al. ([Janetzki et al., 2015](#)).

RESULTATS

1. Sélection des peptides « candidats » GluN1 par analyse bioinformatique

Pour choisir les peptides « candidats », nous avons eu recours à des outils bioinformatiques de prédiction utilisant différentes bases de données, régulièrement mises à jour, et incorporant des milliers de résultats de tests de liaison réalisés *in vitro* entre des panels de peptides et des molécules HLA. Ces données, en association avec un algorithme, permettent de modéliser et de prédire l'affinité d'une séquence peptidique donnée pour une molécule HLA donnée.

L'approche bioinformatique a permis de sélectionner des peptides « candidats » dérivés de la protéine GluN1-1a, capables de fixer avec la meilleure affinité possible, la molécule HLA-DRB1*01:01. Pour notre étude, il a été choisi de synthétiser des peptides de 15 AA.

Trois logiciels de prédiction, disponibles sur internet et fréquemment cités dans des articles scientifiques, ont été comparés (IEDB, NetMHCIIpan, Tepitope). Ces logiciels choisissent des « core peptide », c'est à dire des séquences de 9 AA au sein desquelles se retrouvent les AA interagissant avec les résidus d'ancrage du sillon de présentation de la molécule HLA. Pour chaque « core peptide », le logiciel attribue un score qui traduit l'affinité de cette séquence pour la molécule HLA. De part et d'autre du « core peptide », se trouve des séquences flanquantes plus ou moins longues, selon la longueur choisie du peptide.

Un intérêt particulier a été porté au logiciel IEDB car sa base de données est l'une des plus riches actuellement disponibles. Elle est également mise à jour hebdomadairement.

De plus, ce logiciel présente l'avantage de disposer d'un algorithme particulier, le « nn align » qui évalue l'influence des séquences flanquantes sur l'affinité du peptide pour la molécule HLA.

Les résultats sont présentés différemment d'un logiciel à l'autre. Pour IEDB et NetMHCIIpan, le score est inversement corrélé à l'affinité. Ainsi un petit score indique une forte affinité pour la molécule HLA. Par contre pour Tepitope, le score est directement corrélé à l'affinité (**Figure 9**). A partir des scores fournis par chaque logiciel, un score global théorique a été calculé selon la formule suivante : score IEDB + score NetMHCIIpan + 1 / score Tepitope. Plus ce score global est petit, plus le peptide est affin pour la molécule HLA-DRB1*01:01.

ALLELE: DRB1_0101			
Rank	Sequence	At Position	Score
1	IVNIGAVLS	25	2.5000
2	FVYVKPTLS	428	2.4400
3	FRAITSTLA	900	2.1900
4	FRSGFGIGM	774	2.0800
5	FENMAGVFM	830	1.8800
6	FYRIPVLGL	112	1.8000
7	VFMLVAGGI	836	1.7000
8	MRLTLALL	3	1.6000
9	WKQNVLSI	788	1.5400
10	LVGLSVHVV	585	1.5000
11	MIIVASYTA	661	1.4500
12	WNGMMGELL	518	1.4000
13	WKIQLNATS	55	1.3000
14	WGVLLNSGI	631	1.3000
15	YQMSTRLKI	412	1.1000
16	LWLLVGLSV	582	1.1000
17	IMNLQNRKL	373	0.9900
18	FMLVAGGIV	837	0.9500
19	YAILVSEPP	87	0.8000
20	INNERAQYI	539	0.8000

Figure 9 | Résultats pour le logiciel Tepitope, de la prédiction de l'affinité des peptides issus de la protéine GluN1-1a pour la molécule HLA-DRB1*01:01.

La quatrième colonne affiche le score obtenu pour chaque peptide. Ce score traduit l'affinité du peptide pour la molécule HLA-DRB1*01:01. Pour Tepitope, plus le score est élevé, plus l'affinité est grande.

Dans la deuxième colonne, la séquence du « core peptide », de neuf acides aminés, est indiquée.

Seuls les 20 peptides ayant le plus d'affinité pour la molécule HLA-DRB1*01:01 sont montrés ici.

Pour certains peptides tels que le peptide 1, il existe une très bonne concordance entre les différents algorithmes de prédiction. Le peptide 1 arrive en 1^{ère} position avec IEDB et NetMHCIIPan, ainsi qu'en 3^{ème} position avec Tepitope mais cette concordance ne se vérifie pas pour tous les peptides. En effet Tepitope classe le peptide 4 à la 31^{ème} position, tandis que NetMHCIIPan et IEDB lui affectent respectivement le 2^{ème} et 5^{ème} rang. Ainsi sélectionner le peptide 4 peut sembler inapproprié au vu du score fourni par Tepitope. Cependant IEDB et NetMHCIIPan affichent des scores qui rendent ce peptide tout à fait pertinent (**Table 2**).

Les dix peptides couvrent l'ensemble de la protéine GluN1. Sept d'entre eux sont issus des domaines extracellulaires et les trois autres de la région cytoplasmique.

Rang	Domaine	IEDB [†]	NetMHCIIPan [†]	Tepitope [¶]	Score global théorique [°]
1	Cytoplasmique	NC	NC	NC	0,61
2	Extracellulaire	NC	NC	NC	3,29
3	Extracellulaire	NC	NC	NC	4,23
4	Extracellulaire	NC	NC	NC	5,17
5	Extracellulaire	NC	NC	NC	6,92
6	Extracellulaire	NC	NC	NC	9,73
7	Extracellulaire	NC	NC	NC	9,95
8	Cytoplasmique	NC	NC	NC	11,72
9	Cytoplasmique	NC	NC	NC	13,74
10	Extracellulaire	NC	NC	NC	17,33

Table 2 | Liste des 10 peptides dérivés de la protéine GluN1 sélectionnés par analyse bioinformatique pour leur affinité vis-à-vis de la molécule HLA-DRB1*01:01.

Les peptides sont triés selon leur score global théorique. Ces peptides ont été sélectionnés après croisement des scores obtenus avec 3 bases de données différentes (IEDB, NetMHCIIPan, Tepitope).

† Pour IEDB et NetMHCIIPan le score est inversement corrélé à l'affinité. Ainsi plus le score est petit, plus l'affinité est grande.

¶ Pour Tepitope, le score est directement corrélé à l'affinité.

Pour des raisons de confidentialité, le score individuel obtenu par chaque peptides avec chacune des bases de données n'est pas communiqué dans ce mémoire.

° Le score global théorique est obtenu selon la formule suivante : score IEDB + score NetMHCIIPan + 1/score Tepitope.

NC : Non Communiqué

2. Stimulation de CMSP en culture primaire

2-1. Mise au point des conditions de culture

La première étape du travail a été de mettre au point les conditions de culture permettant de générer des lymphocytes T CD4 spécifiques d'antigène. Pour cela nous avons utilisé le peptide de l'hémagglutinine (HA₃₀₆₋₃₁₈) issu d'un virus grippal. Des CMSP de sujets sains HLA-DR1 (n=6) ont été mis en culture et de l'IL-2 a été ajouté au bout du quatrième jour, puis tous les quatre jours afin de permettre l'expansion des lymphocytes T CD4.

Après quinze jours de culture, la proportion d'effecteurs spécifiques du peptide HA, parmi les lymphocytes T CD4 totaux, a été analysée en cytométrie de flux à l'aide d'un marquage tétramère et d'un anticorps anti-CD4 couplé à un fluorochrome. Pour déterminer la fixation non spécifique, un tétramère associé à un peptide non pertinent (peptide CLIP) a également été utilisé.

La mesure de la fréquence des effecteurs par marquage avec un tétramère montre une forte proportion de lymphocytes T CD4 spécifiques du peptide HA, avec une moyenne de 20,4% et des extrêmes allant de 12,0 à 40,4%. La **Figure 10** est un exemple du marquage par tétramère réalisé pour le donneur 6.

Il existe une importante variabilité interindividuelle dans la proportion de lymphocytes T CD4 spécifiques du peptide HA générés par les donneurs. Ceci peut être lié, entre autres, au fait que certains d'entre eux possèdent déjà, *in vivo*, des effecteurs mémoires spécifiques.

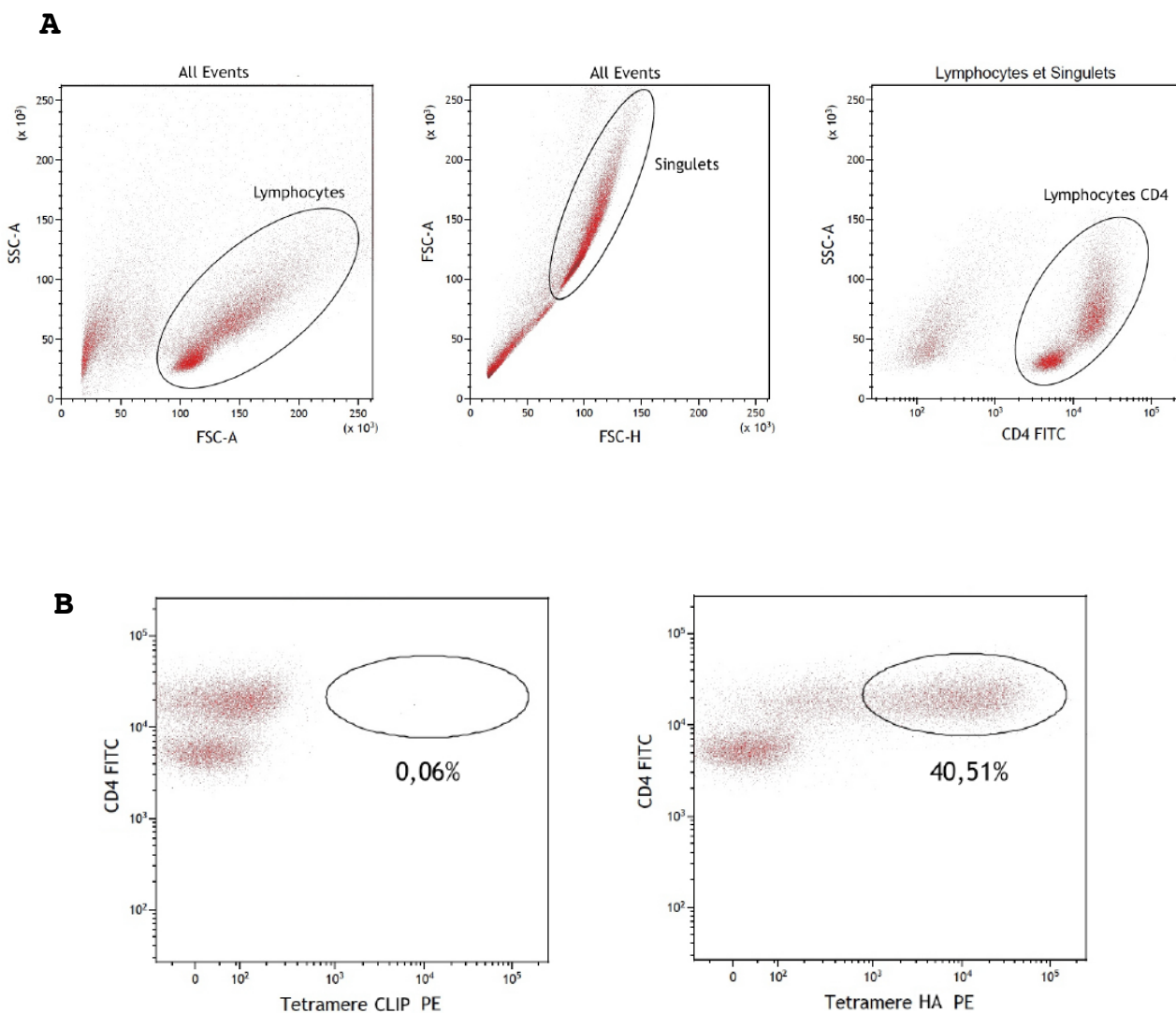


Figure 10 | Détermination de la fréquence des lymphocytes T CD4 spécifiques du peptide HA par marquage avec tétramère.

(A) Stratégie de « gating » : les lymphocytes T CD4 ont été analysés sur l'intersection des lymphocytes et des singlets. (B) La fenêtre de gauche correspond au tétramère négatif couplé à un peptide non pertinent (peptide CLIP). Il permet d'évaluer le marquage non spécifique. La fenêtre de droite correspond au tétramère positif (couplé au peptide HA). La proportion de lymphocytes T CD4 spécifiques du peptide HA, parmi les lymphocytes T CD4 totaux est obtenue par soustraction du pourcentage tétramère positif avec le tétramère négatif. Ces images sont issues de l'analyse du donneur 6.

2-2. Validation de la quantification des lymphocytes T spécifiques d'antigène par dosage de l'IFN γ

Pour déterminer la fréquence des effecteurs T spécifiques de la protéine GluN1, deux techniques différentes ont été employées : un marquage de l'IFN γ intracytoplasmique, et la sécrétion d'IFN γ en ELISpot. Comme précédemment, le peptide HA a été utilisé pour la mise au point.

2-2-1. Marquage intracytoplasmique de l'IFN γ

Les effecteurs issus de la stimulation des CMSP d'un sujet sain (donneur 2) par le peptide HA, ont été recueillis après 2 semaines de culture. La fréquence des lymphocytes T spécifiques a été déterminée en incubant les effecteurs au ratio 1:1 avec soit des cellules B-EBV^{DR1}, soit des CPAA^{DR1}, durant 6 heures. Ces CPA ont préalablement été chargées avec le peptide HA ou avec le peptide non spécifique (MBP), pendant une heure. Les cellules ont ensuite été fixées, perméabilisées, puis marquées avec des anticorps anti-CD4 et anti-IFN γ couplés à des fluorochromes avant leur analyse en cytométrie (**Figure 11**).

Une production importante d'IFN γ est observée après activation des lymphocytes T avec des B-EBV^{DR1} chargées avec le peptide HA (B-EBV/HA). Dans cette condition 11,2% des lymphocytes T CD4 produisent de l'IFN γ . En revanche, aucune sécrétion d'IFN γ n'est retrouvée parmi les lymphocytes T mis en contact avec les cellules B-EBV^{DR1} chargées avec le peptide non spécifique (B-EBV/MBP). En effet, seulement 0,3% des

lymphocytes T CD4 secrètent de l'IFN γ (**Figure 11B**). Des résultats similaires sont obtenus en ayant recours à d'autres CPA : les CPAA (**Figure 11C**).

2-2-2. ELISpot

Les effecteurs issus de la stimulation des CMSP d'un sujet sain (donneur 1) par le peptide HA ont été recueillis, après deux semaines de culture. La fréquence des lymphocytes T spécifiques a été déterminée par ELISpot en incubant les effecteurs, au ratio 10:1, avec des cellules B-EBV^{DR1} durant 20 heures. Dans certaines conditions, le peptide HA ou le peptide non spécifique MBP a été ajouté.

Une très forte sécrétion d'IFN γ est observée après incubation des effecteurs avec des cellules B-EBV^{DR1} chargées avec le peptide HA, alors que quasiment aucune sécrétion n'est retrouvée lorsque les effecteurs sont incubés avec des B-EBV^{DR1} et le peptide non spécifique MBP (**Figure 12**). Le test réalisé avec 10⁵ cellules, est saturant et ne permet pas de déterminer la fréquence des effecteurs spécifiques du peptide HA. Une étude des effecteurs, par des dilutions en cascade, a été réalisée. La courbe est linéaire jusqu'à 25 000 effecteurs par puits. Au delà, le nombre de spots n'est pas interprétable (**Figure 13**).

2-3. Stimulation de CMSP par les peptides « candidats » GluN1

Les effecteurs issus de la stimulation des CMSP de sujets sains (donneurs 2 et 3) par les peptides « candidats » ont été recueillis après deux semaines de culture. La fréquence des lymphocytes T spécifiques a été déterminée, par ELISpot, en incubant les cellules, au ratio 10:1, avec des cellules B-

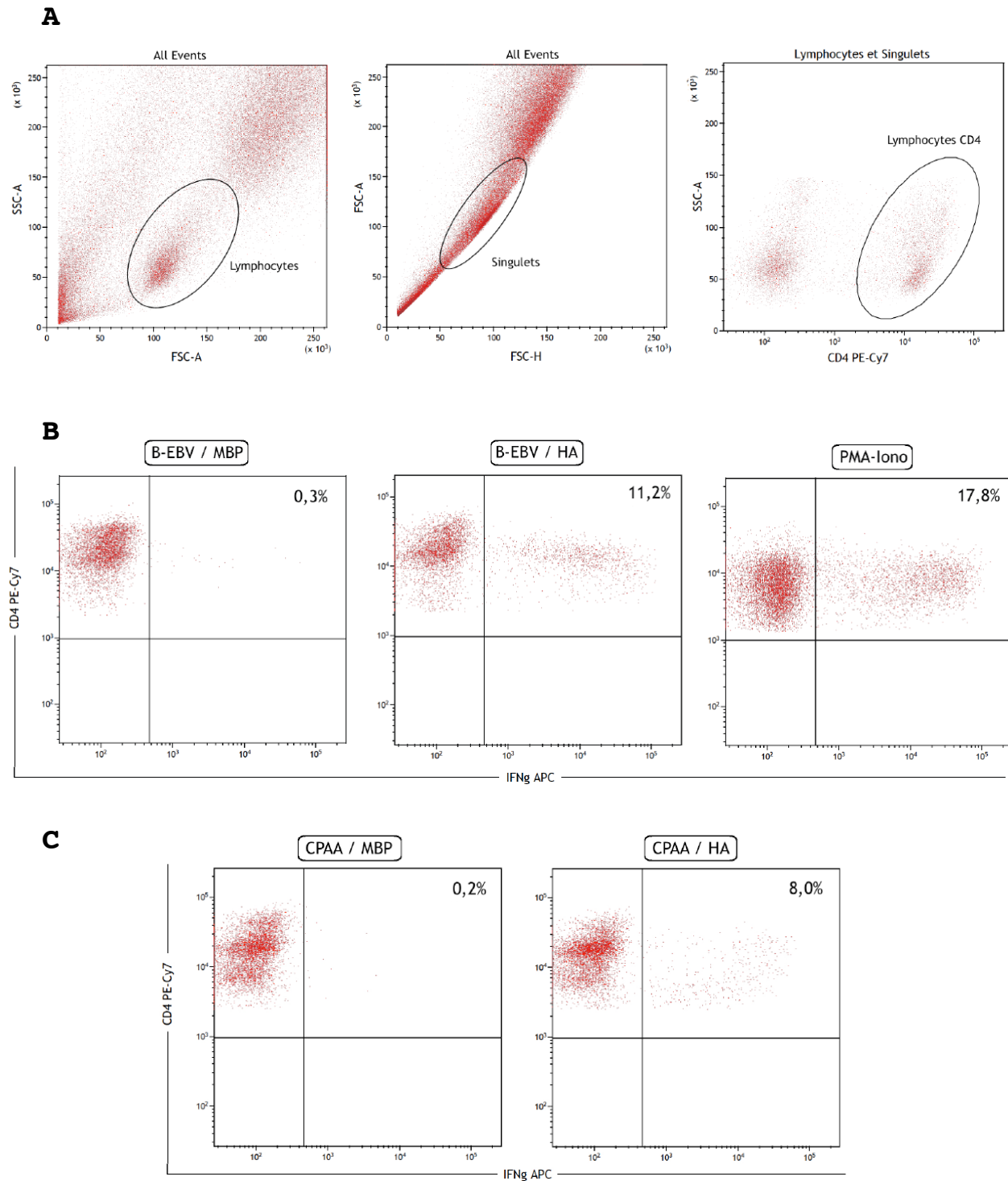


Figure 11 | Détermination de la fréquence des lymphocytes T CD4 spécifiques du peptide HA par marquage de l'IFN γ intracytoplasmique.

(A) Stratégie de « gating » : les lymphocytes T CD4 ont été analysés sur l'intersection des lymphocytes et des singulets. Les effecteurs (10^6) issus de la stimulation des CMSP par le peptide HA ($10 \mu\text{g/ml}$) ont été mis en contact avec soit (B) des cellules B-EBV^{DR1} (10^6) soit (C) des CPAA^{DR1} (10^6). Ces cellules ont préalablement été chargées soit avec un peptide non spécifique MBP ; soit le peptide d'intérêt HA. Un témoin positif a été réalisé en activant des effecteurs avec du PMA-iono (respectivement 25 ng/ml et $1 \mu\text{g/ml}$). En haut à droite de chaque fenêtre est affichée la proportion de lymphocytes T CD4 produisant de l'IFN γ intracytoplasmique, parmi les lymphocytes T CD4 totaux.

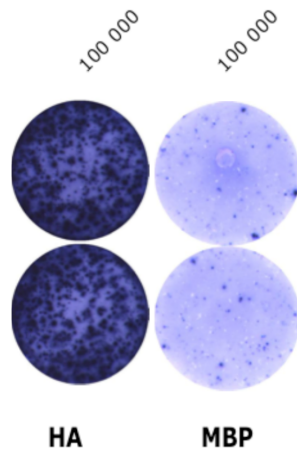


Figure 12 | Quantification des lymphocytes T spécifiques d'antigène, recueillis après stimulation de CMSP par le peptide HA.

Les effecteurs (10^5 /puits) issus de CMSP stimulées par le peptide HA ont été incubés avec des cellules B-EBV^{DR1} (10^4 /puits) en présence du peptide HA ($10 \mu\text{g/ml}$) à gauche ; ou du peptide non spécifique MBP ($10 \mu\text{g/ml}$) à droite. La valeur affichée au dessus des duplicats correspond au nombre d'effecteurs par puits.

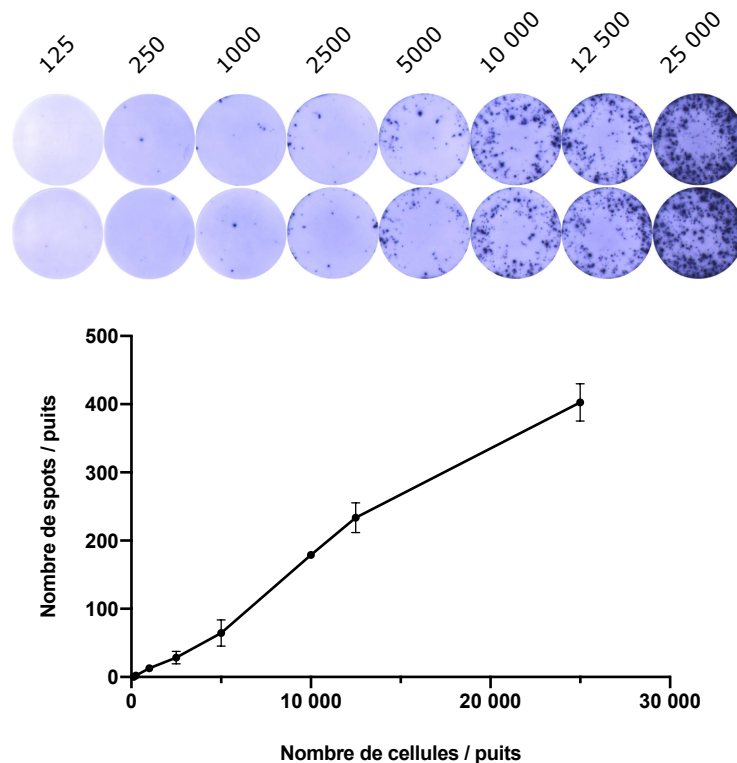


Figure 13 | Etude par dilution en cascade des effecteurs issus de la stimulation des CMSP par le peptide HA, en ELISpot.

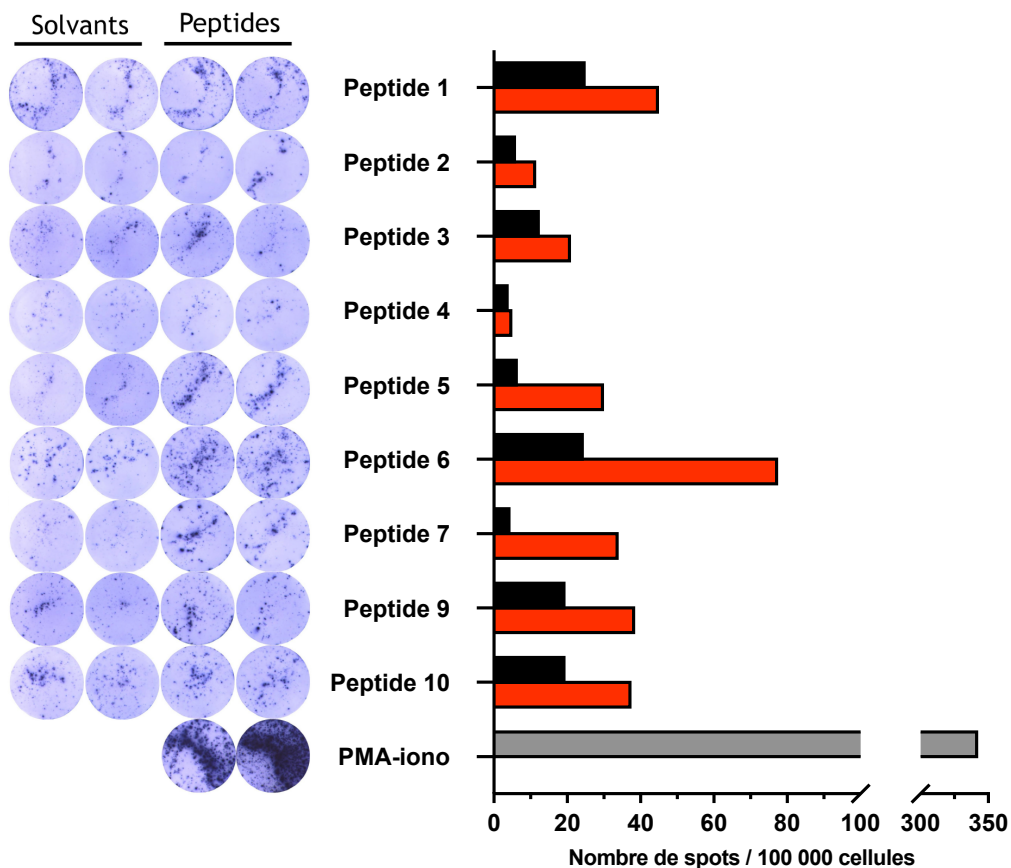
Les effecteurs (10^5) issus de CMSP stimulées par le peptide HA, ont été mis en présence de cellules B-EBV^{DR1} (10^4) et du peptide HA ($10 \mu\text{g/ml}$) puis diluées en cascade.

A gauche sont présentées les images numérisées des puits. La valeur affichée au dessus des duplicats correspond au nombre d'effecteurs par puits. Sur le graphique est tracée la courbe du nombre de spots en fonction du nombre de cellules par puits.

EBV^{DR1}, durant 20 heures. Les effecteurs ont été mis en présence soit du même peptide « candidat » utilisé lors de la stimulation, soit du solvant employé pour solubiliser le peptide en question (témoin négatif). De façon arbitraire, les effecteurs ont été considérés comme spécifiques du peptide « candidat » si le nombre de spots en présence du peptide d'intérêt est au moins trois fois supérieur au témoin négatif (*Janetzki et al., 2015*).

Les effecteurs du donneur 2, réactivés par les peptides 5, 6 et 7 génèrent trois fois plus de spots, qu'en présence du solvant seul (**Figure 14A**). Il est à noter que pour ce donneur les résultats obtenus avec le peptide 8 ne sont pas montrés car ininterprétables. En ce qui concerne le donneur 3, ce sont les peptides 1, 2, 5 et 6 qui induisent une sécrétion d'IFN γ au moins trois fois supérieure au solvant seul (**Figure 14B**).

A : Donneur 2



B : Donneur 3

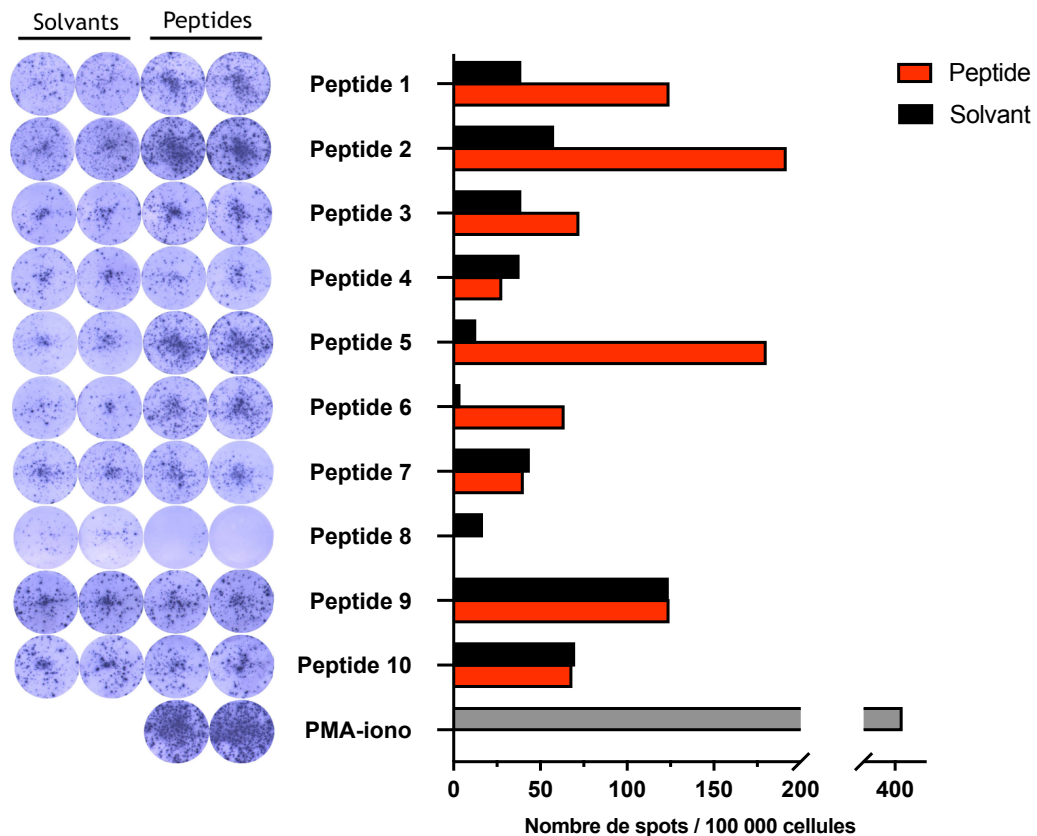


Figure 14 | Détermination de la fréquence des lymphocytes T spécifiques des peptides « candidats » en ELISpot.

Les effecteurs (10^5 /puits) issus des CMSP stimulées par les peptides « candidats » ont été incubés avec des cellules B-EBV^{DR1} (10^4 /puits) en présence soit du peptide « candidat » (10 μ g/ml) ; soit du solvant utilisé pour solubiliser le peptide.

A gauche sont présentées les images des puits, réalisés en duplicats, en présence du peptide ou du solvant. (A) Résultats du donneur 2 ; (B) Résultats du donneur 3.

A droite, les histogrammes indiquent le nombre de spots obtenu après activation en présence du peptide (en rouge), ou en présence du solvant seul (en noir). Un témoin positif (en gris) a été réalisé, en activant des effecteurs de chaque donneur avec du PMA-iono (respectivement 10 ng/ml et 500 ng/ml). A noter que pour le donneur 2, les résultats obtenus avec le peptide 8 ne sont pas montrés car ininterprétables.

2-4. Stimulation de CMSP par la protéine GluN1

La fréquence des effecteurs spécifiques de GluN1 a été déterminée par deux techniques différentes : un marquage intracytoplasmique de l'IFN γ et la sécrétion d'IFN γ en ELISpot.

2-4-1. Détermination de la fréquence des effecteurs spécifiques de la protéine GluN1 par marquage intracytoplasmique de l'IFN γ

Les effecteurs issus de la stimulation des CMSP d'un sujet sain (donneur 4) par la protéine GluN1 ont été recueillis après deux semaines de culture. La fréquence des lymphocytes T spécifiques a été déterminée en incubant les cellules, au ratio 1:1, avec des cellules B-EBV^{DR1}, durant 6 heures. Ces dernières ont préalablement été chargées, séparément, avec les différents peptides « candidats » ou avec le peptide non spécifique (MBP) pendant 1 heure.

Cependant, du fait d'un faible nombre d'effecteurs disponibles, nous avons été amené à « pooler » deux par deux, les cellules B-EBV^{DR1} chargées avec un peptide « candidat », avant d'être incubées avec les effecteurs. A la fin de l'incubation, les cellules ont été fixées, perméabilisées puis marquées avec des anticorps anti-CD4 et anti-IFN γ couplés à des fluorochromes avant leur analyse en cytométrie.

Aucune production significative d'IFN γ , par les effecteurs après leur incubation avec des cellules B-EBV^{DR1} chargées en peptides « candidats » puis « poolées » deux à deux, n'est observée. Quelque soit la condition de cellules B-EBV^{DR1} chargées, la proportion de lymphocytes T CD4 sécréteurs d'IFN γ est identique à la proportion de lymphocytes T CD4 sécréteurs d'IFN γ après incubation avec des cellules B-EBV^{DR1} chargées avec le peptide non spécifique MBP (**Figure 15**).

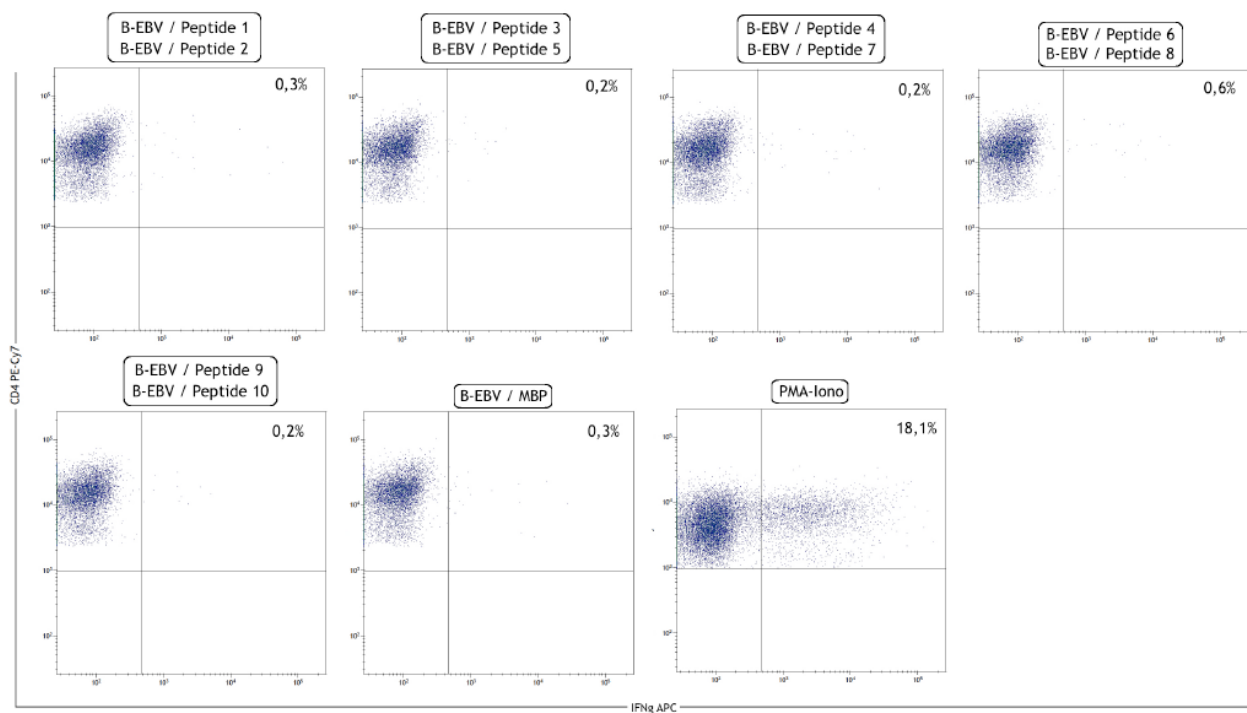


Figure 15 | Détermination de la fréquence des lymphocytes T CD4 spécifiques de la protéine GluN1 par marquage de l'IFN γ intracytoplasmique.

La stratégie de « gating » non montrée ici est identique à celle de la figure 9, les lymphocytes T CD4 ont été analysés sur l'intersection des lymphocytes et des singulets. Les effecteurs (10^6) issus de la stimulation des CMSP par la protéine GluN1 (1 μ g/ml) ont été mis en contact avec des cellules B-EBV^{DR1} (10^6) chargés avec, soit les peptides « candidats », soit le peptide non spécifique MBP. Les cellules B-EBV^{DR1} chargées séparément en peptide « candidat » ont été « poolées » deux à deux.

Un témoin positif a été réalisé en activant des effecteurs avec du PMA-iono (respectivement 25 ng/ml et 1 μ g/ml). En haut à gauche de chaque fenêtre est affichée la proportion de lymphocytes T CD4 produisant de l'IFN γ intracytoplasmique, parmi les lymphocytes T CD4 totaux.

2-4-2. Détermination de la fréquence des effecteurs spécifiques de la protéine GluN1 par ELISpot

Comme avec les peptides, après la stimulation des CMSP d'un sujet sain (donneur 5) par la protéine GluN1, la fréquence des effecteurs T spécifiques a été déterminée par ELISpot en incubant les effecteurs, au ratio 10:1, avec des cellules B-EBV^{DR1}, durant 20 heures. Les effecteurs ont été mis

en présence soit de la protéine GluN1, soit des peptides « candidats », ou soit du solvant employé pour solubiliser le peptide en question.

Aucun des peptides « candidats » n'est capable d'induire une sécrétion d'IFN γ supérieure à celle générée par le solvant. En revanche une très forte sécrétion d'IFN γ est observée lorsque les effecteurs sont mis en présence de la protéine GluN1 (**Figure 16**).

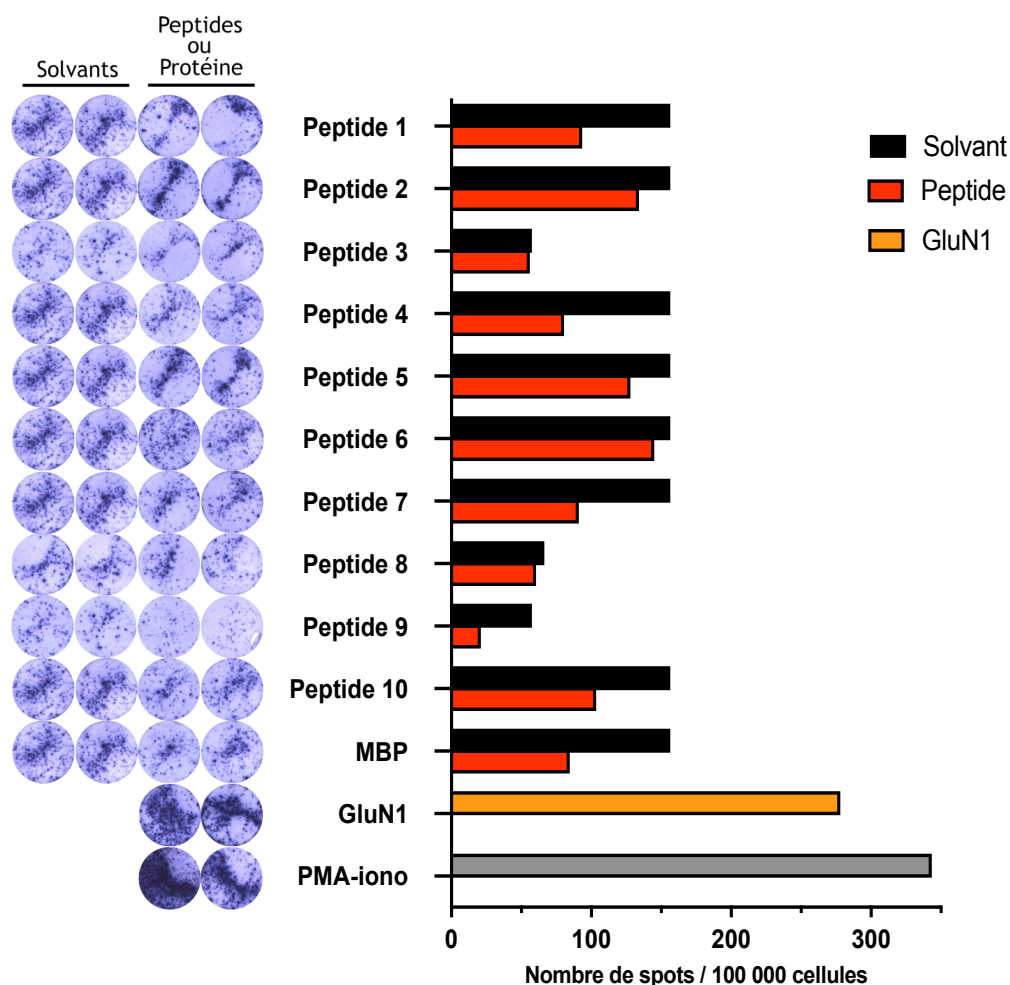


Figure 16 | Détermination en ELISpot de la fréquence des lymphocytes T spécifiques de la protéine GluN1 par ELISpot.

Les effecteurs (10^5 /puits) issus de la stimulation de CMSP par la protéine GluN1 ont été incubés avec des cellules B-EBV^{DR1} (10^4 /puits) en présence soit de la protéine GluN1 ($10 \mu\text{g/ml}$) ; soit du peptide d'intérêt ($10 \mu\text{g/ml}$) ; soit du solvant utilisé pour solubiliser le peptide.

A gauche sont présentées les images des puits, réalisés en duplicat, en présence du peptide ou du solvant. A droite, les histogrammes indiquent le nombre de spots obtenu après activation en présence du peptide (en rouge), en présence du solvant seul (en noir) ou en présence de la protéine GluN1 ($10 \mu\text{g/ml}$). Un témoin positif (en gris) a été réalisé en activant des effecteurs avec du PMA-iono (respectivement 10 ng/ml et 500 ng/ml).

DISCUSSION

Notre objectif a été d'évaluer la réponse T CD4 vis-à-vis de l'antigène GluN1 et d'identifier certains de ses épitopes. Pour ce faire, une analyse bioinformatique a permis de sélectionner des peptides « candidats », issus de la protéine GluN1, ayant une forte affinité pour la molécule HLA-DR1. Puis des expériences *in vitro*, de stimulation de cellules mononucléées du sang périphérique de sujets sains, par la protéine GluN1 ou par les peptides « candidats » ont été réalisées.

Notre étude s'est focalisée sur un unique contexte HLA. Le contexte HLA-DR1 a été retenu, car le laboratoire disposait déjà des outils nécessaires pour évaluer les réponses immunes T CD4 dans ce contexte (cellules B-EBV^{DR1}, CPAA^{DR1}, tétramère HLA-DRB1*01:01-HA). Il est important de préciser que dans l'encéphalite à anticorps anti-NMDAR aucune des trois études réalisées à ce jour n'est parvenue à montrer de lien entre cette pathologie et un haplotype HLA de classe II ([Kim et al., 2017](#) ; [Mueller et al., 2018](#) ; [Shu et al., 2019](#)). Néanmoins, il faut remarquer que deux d'entre elles ont été effectuées sur des cohortes asiatiques (coréennes et chinoises), et ne sont donc pas nécessairement transposables à la population caucasienne. De plus, aucune de ces études ne distingue les encéphalites post-herpétiques, des encéphalites paranéoplasiques. Il serait intéressant de renouveler cette analyse en ségrégant les patients selon la pathogénèse. Pourtant des associations entre allèles HLA et encéphalites auto-immunes ont déjà été identifiées. Par exemple pour l'encéphalite à anticorps anti-LGI1, les molécules HLA-DR7 et HLA-DRB4 sont exprimées par respectivement 90% et 100% des patients ([van Sonderen et al., 2017](#)). Dans les encéphalites à anticorps anti-IgLON5, les malades sont porteurs de l'allèle HLA-DRB1*10:01 ([Gelpi et al., 2016](#)).

Pour identifier des épitopes T CD4 de la protéine GluN1, la sélection de peptides « candidats » a été une étape clef de

ce travail. Afin de choisir ces peptides, nous avons opté pour une méthode bioinformatique. Cette méthode permet de sélectionner un nombre restreint de peptides ayant la meilleure affinité possible pour une molécule HLA donnée. Ce type d'analyse bioinformatique, déjà bien développée pour la prédiction d'épitopes T CD8, est également utilisable pour les épitopes T CD4 (*Fleri et al., 2017a*). La prédiction de ces derniers reste néanmoins complexe du fait de la longueur importante et variable des régions flanquantes, elles aussi impliquées dans l'interaction avec le TCR. De nombreux logiciels sont disponibles sur internet (IEDB, NetMHCII, SYFPEITHI, EpiToolKit...), et il est particulièrement difficile de savoir lequel est le plus adéquat et le plus fiable. Nous avons sélectionné trois logiciels (IEDB, NetMHCIIpan, Tepitope) parmi les plus régulièrement mis à jour et les plus fréquemment cités dans la littérature (*Fleri et al., 2017b*). A partir des scores obtenus individuellement, il a été calculé un score global théorique nous permettant de sélectionner les 10 peptides les plus pertinents.

Une autre approche envisageable pour étudier une réponse à des épitopes GluN1 consiste à synthétiser des peptides de 15 AA chevauchants, et couvrant l'ensemble de la protéine. Contrairement à la méthode prédictive, cette approche a l'avantage d'être exhaustive et d'étudier la protéine dans son intégralité (*Pham et al., 2016*). Cependant, cette solution est particulièrement chronophage et onéreuse, notamment pour les protéines de haut poids moléculaire telle que GluN1-1a (938 AA). Une troisième approche, plus récente et encore à l'étude, consiste à identifier les épitopes immunodominants d'un antigène donné. Cette méthode repose sur un système *in vitro* de digestion d'antigènes par des cathepsines suivie d'une analyse par spectrométrie de masse (*Kim et al., 2014*).

Les peptides « candidats », en fonction des résidus d'AA inclus dans la séquence, présentaient des caractéristiques d'hydro-solubilité très différentes, évaluées avec l'aide du site internet

https://www.peptide2.com/N_peptide_hydrophobicity_hydrophilicity.php. Pour se mettre dans les conditions les plus favorables à la solubilisation des peptides, trois solvants ont été employés : eau stérile, éthanol, et acide acétique 10%. Le recours à l'éthanol et l'acide acétique 10% est apparu comme une contrainte expérimentale importante. En effet, l'utilisation de différents solvants nous a obligé à multiplier les conditions « témoin négatif » dans lesquelles les effecteurs étaient mis en présence de CPA et du solvant seul. A ceci s'ajoute un effet toxique sur les cellules, pour certains. Ainsi les réponses obtenues avec le peptide 8, repris dans l'acide acétique 10%, devront être réévaluées après solubilisation dans un nouveau solvant. Il aurait probablement été préférable d'utiliser un mélange de solvants aqueux et organique de type PBS/DMSO, même si la solubilisation est moins efficace.

En utilisant un peptide modèle issu de l'antigène HA du virus grippal H3N2, nous avons mis au point nos conditions de culture. Nos résultats sont similaires à ceux obtenus antérieurement au laboratoire (*Garnier et al., 2016*). Pour déterminer la fréquence des effecteurs spécifiques du peptide HA, un marquage par tétramère associé à un marquage anti-CD4 a été effectué. Cette méthode a l'avantage d'être directe et de ne pas recourir à l'utilisation de CPA. Elle est cependant trop onéreuse pour tester un large panel de peptides. Une évaluation de la sécrétion d'IFN γ en ELISpot a donc également été réalisée. Cette technique est souvent utilisée pour l'identification d'épitopes T et la détection de cellules spécifiques d'antigènes car considérée très sensible (*Janetzki et al., 2015*). Elle n'avait cependant jamais été employée au laboratoire et a nécessité une mise au point.

La réponse vis-à-vis des peptides « candidats » GluN1 a été évaluée. En utilisant comme CPA des cellules B-EBV, un bruit de fond, plus ou moins important selon les donneurs, est à noter. Il est possible que celui-ci soit induit par des effecteurs anti-EBV préexistants. Plusieurs pistes

d'amélioration sont envisagées comme avoir recours à d'autres CPA telles que les CPAA^{DR1} (*Gilardin et al., 2017*). Les résultats obtenus, avec deux sujets sains différents, sont particulièrement intéressants. Ils montrent que le peptide 5 et peptide 6 sont des épitopes T CD4 potentiels de la protéine GluN1. Il est à noter que ces peptides ne sont pas les plus affins pour la molécule HLA-DRB1*01:01 selon notre score global théorique. Ces observations sont cependant très préliminaires, et devront être confirmées avec un plus grand nombre de sujets sains.

La réponse vis-à-vis de la protéine GluN1 a également été évaluée. En première approche, la fréquence des effecteurs spécifiques a été déterminée par marquage intracytoplasmique de l'IFN γ , suivi d'une analyse en cytométrie. En y ajoutant un marquage anti-CD4, cette technique présente l'avantage de pouvoir identifier les lymphocytes d'intérêt, contrairement à l'ELISpot. Bien que cette méthode, avec le peptide HA, donne des résultats concordant au marquage par tétramère (données non montrées), les résultats obtenus avec un sujet sain suggèrent qu'elle n'est pas suffisamment sensible pour détecter les effecteurs spécifiques issus d'une stimulation par un auto-antigène. Nous avons donc ensuite analysé la sécrétion d'IFN γ en ELISpot. Les résultats obtenus, à l'issue d'une stimulation, ne permettent pas d'identifier d'épitopes T CD4 parmi les peptides « candidats ». Néanmoins une réponse importante vis-à-vis de la protéine GluN1 est détectée. En l'absence de témoin négatif (effecteurs et CPA mis en présence du solvant de la protéine), il nous est impossible de déterminer si cette sécrétion d'IFN γ est spécifique de l'antigène GluN1. Dans le cas d'une sécrétion non spécifique, plusieurs hypothèses peuvent être formulées. (1) Il est possible que nos conditions de stimulation ne soient pas optimales pour générer des effecteurs spécifiques. La concentration en protéine dans la culture primaire (1 μ g/ml) est peut être insuffisante. La faible disponibilité de cette protéine recombinante ne nous a pas permis de l'utiliser à des

concentrations plus importantes. (2) Il est envisageable que les CMSP mises en culture primaire ne sont pas suffisamment efficaces pour endocyter, apprêter et/ou présenter l'auto-antigène GluN1. Pour pallier ce problème, nous envisageons d'utiliser des CPA professionnelles telles que des monocytes ou des cellules dendritiques autologues. Ceci nécessite néanmoins de disposer d'une plus grande quantité de CMSP par donneur. En revanche, si la sécrétion d'IFN γ que nous observons est spécifique, l'hypothèse qui peut être avancée est que nos peptides « candidats » ne sont pas générés *in vitro* de façon efficace à partir de la protéine GluN1. Dans ce cas, il serait nécessaire d'élargir notre sélection de peptides « candidats ».

CONCLUSION ET **PERSPECTIVES**

Les résultats obtenus au cours de mon stage sont préliminaires, et devront être confirmés avec un plus grand nombre de sujets sains. Plusieurs axes d'amélioration et d'approfondissement sont actuellement à l'étude. Il est envisagé de réaliser des restimulations (ou cultures secondaires) dans le but d'amplifier le nombre d'effecteurs spécifiques et ainsi obtenir des réponses plus intenses avec un minimum de bruit de fond. Ces restimulations seront réalisées à l'aide de cellules irradiées (CMSP ou CPA professionnelles autologues ou encore CPAA).

Il est également prévu pour les donneurs à venir, de réaliser systématiquement un phénotypage lymphocytaire par cytométrie de flux. Cette analyse nous permettra de déterminer au mieux la proportion des lymphocytes T CD4, T CD8, B et NK présents dans la culture. Par la même méthode, il sera possible de caractériser les populations d'effecteurs T CD4 générés, en évaluant la proportion de lymphocytes T naïfs (CD45RA+/CD45RO-) et T mémoires (CD45RA-/CD45RO+). La détermination du profil d'expression des récepteurs aux chimiokines (CCR4, CCR6, CXCR3, CXCR5...), exprimés à la surface cellulaire après stimulation, permettra également de définir l'orientation T_{FH} , Th1, Th2 ou Th17 des lymphocytes T effecteurs.

Comme dit précédemment, dans l'encéphalite à anticorps anti-NMDAR, il n'existe pas d'association HLA/maladie connue. Dans un futur proche, il serait donc intéressant d'étendre cette étude à d'autres contextes HLA fréquents. Moins d'une dizaine de molécules HLA-DR sont suffisantes pour couvrir, à elles seules, près de 90% de la population générale caucasienne (HLA-DR1, DR3, DR7, DR11, DR13, DR15...) (<http://allelesfrequencies.net/hla.asp>).

A plus long terme, une identification probante et formelle d'épitopes T CD4 issus de la sous-unité GluN1 des

NMDAR pourrait permettre l'immunomonitorage des patients, et le développement d'immunothérapies tolérogènes.

Pour l'immunomonitorage des patients, la production de tétramères de molécules de CMH-II chargées avec le peptide d'intérêt, en association avec un panel de marqueurs, permettrait de suivre en cytométrie, l'évolution phénotypique des populations spécifiques de l'antigène, au cours de l'immunothérapie. Le suivi des populations effectrices et régulatrices spécifiques d'antigène, permettrait d'anticiper les rechutes et ainsi améliorerait la prise en charge. Une telle méthode a déjà été utilisée pour la maladie cœliaque, qui présente néanmoins l'avantage d'être restreinte à deux contextes HLA particuliers (*Christophersen et al., 2019*). Dans l'encéphalite à anticorps anti-NMDAR, la mise au point de techniques d'immunomonitorages, est d'autant plus pertinente qu'actuellement il n'existe pas de biomarqueur ayant démontré une véritable efficacité dans le suivi des patients (*Peng et al., 2019*), les titres d'auto-anticorps sériques et/ou du LCR étant eux-mêmes imparfaitement corrélés à la clinique (*Gresa-Arribas et al., 2014*).

Le développement d'immunothérapies tolérogènes pourrait être une deuxième application en clinique. Plusieurs stratégies sont envisageables. Une première approche consiste à restaurer une tolérance immunitaire par transfert adoptif de T_{REG} générés *in vitro*. Actuellement, seule la thérapie cellulaire basée sur des T_{REG} polyclonaux fait l'objet d'essais cliniques pour traiter notamment le diabète de type I (*Bluestone et al., 2015*). Cependant, les T_{REG} spécifiques d'antigène pourraient être une alternative intéressante aux T_{REG} polyclonaux. D'une part, ils contrôlent les réponses auto-immunes plus efficacement (*Tang et al., 2004*), et d'autre part, leur action ciblée limite le risque de voir apparaître des pathologies infectieuses ou tumorales liées à un effet immunosuppresseur global des T_{REG} polyclonaux (*Bluestone and Tang, 2018*). Ces thérapies cellulaires basées sur les T_{REG} doivent cependant faire face à plusieurs contraintes qui

freinent leur utilisation en pratique. En effet, l'expansion *in vitro* de T_{REG} spécifiques d'antigène nécessite des conditions de culture particulières et contraignantes afin d'assurer leur spécificité ainsi que le maintien de leurs fonctions immunosuppressives (Miyara et al., 2017).

Une deuxième approche d'induction de tolérance spécifique d'antigène vise à administrer aux patients un peptide ou un mélange de peptides issus de l'auto-antigène, ou plus rarement l'auto-antigène dans son intégralité. Ces immunothérapies tolérogènes ont montré des effets limités mais prometteurs au cours d'essais de phases I/II, dans la sclérose en plaques récurrente (Chataway et al., 2018) et le diabète de type I (Smith and Peakman, 2018). Cette immunothérapie basée sur les peptides, soulève de nombreuses questions concernant la dose, la fréquence, ainsi que la voie d'administration des peptides. De nombreux paramètres doivent encore être optimisés, avant d'envisager leur utilisation à plus large échelle.

Les recherches actuellement réalisées dans le domaine des immunothérapies peptidiques visent à augmenter la biodisponibilité des molécules, et améliorer leur présentation aux lymphocytes. Pour y parvenir, le recours aux nanoparticules tolérogènes constitue un outil intéressant. De multiples formulations pharmacologiques de nanoparticules ont déjà été mises au point. Elles peuvent, par exemple, prendre la forme de liposomes encapsulant le peptide (McCarthy et al., 2017), ou bien de billes de latex recouvertes de molécules de CMH-II associées au peptide d'intérêt (Clemente-Casares et al., 2016). Les stratégies d'immunothérapies par nanoparticules tolérogènes, bien qu'encore limitées aux modèles expérimentaux, sont actuellement en plein essor et extrêmement prometteuses.

BIBLIOGRAPHIE

Armangue, T., Titulaer, M.J., Málaga, I., Bataller, L., Gabilondo, I., Graus, F., Dalmau, J., and Spanish Anti-N-methyl-D-Aspartate Receptor (NMDAR) Encephalitis Work Group (2013). Pediatric anti-N-methyl-D-aspartate receptor encephalitis-clinical analysis and novel findings in a series of 20 patients. *J. Pediatr.* 162, 850-856.e2.

Armangue, T., Leypoldt, F., Málaga, I., Raspall-Chaure, M., Martí, I., Nichter, C., Pugh, J., Vicente-Rasoamalala, M., Lafuente-Hidalgo, M., Macaya, A., et al. (2014). Herpes simplex virus encephalitis is a trigger of brain autoimmunity. *Ann. Neurol.* 75, 317-323.

Armangue, T., Moris, G., Cantarín-Extremera, V., Conde, C.E., Rostasy, K., Erro, M.E., Portilla-Cuenca, J.C., Turón-Viñas, E., Málaga, I., Muñoz-Cabello, B., et al. (2015). Autoimmune post-herpes simplex encephalitis of adults and teenagers. *Neurology* 85, 1736-1743.

Armangue, T., Spatola, M., Vlagea, A., Mattozzi, S., Cárceles-Cordon, M., Martínez-Heras, E., Llufríu, S., Muchart, J., Erro, M.E., Abaira, L., et al. (2018). Frequency, symptoms, risk factors, and outcomes of autoimmune encephalitis after herpes simplex encephalitis: a prospective observational study and retrospective analysis. *Lancet Neurol* 17, 760-772.

Bluestone, J.A., and Tang, Q. (2018). Treg cells-the next frontier of cell therapy. *Science* 362, 154-155.

Bluestone, J.A., Buckner, J.H., Fitch, M., Gitelman, S.E., Gupta, S., Hellerstein, M.K., Herold, K.C., Lares, A., Lee, M.R., Li, K., et al. (2015). Type 1 diabetes immunotherapy using polyclonal regulatory T cells. *Sci Transl Med* 7, 315ra189.

Blum, J.S., Wearsch, P.A., and Cresswell, P. (2013). Pathways of antigen processing. *Annu. Rev. Immunol.* 31, 443-473.

Bost, C., Chanson, E., Picard, G., Meyronet, D., Mayeur, M.-E., Ducray, F., Rogemond, V., Psimaras, D., Antoine, J.-C., Delattre, J.-Y., et al. (2018). Malignant tumors in autoimmune encephalitis with anti-NMDA receptor antibodies. *J. Neurol.* 265, 2190-2200.

Byrne, S., Walsh, C., Hacohen, Y., Muscal, E., Jankovic, J., Stocco, A., Dale, R.C., Vincent, A., Lim, M., and King, M. (2015). Earlier treatment of NMDAR antibody encephalitis in children results in a better outcome. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm* 2, e130.

Castillo-Gómez, E., Oliveira, B., Tapken, D., Bertrand, S., Klein-Schmidt, C., Pan, H., Zafeiriou, P., Steiner, J., Jurek, B., Trippe, R., et al. (2017). All naturally occurring autoantibodies against the NMDA receptor subunit NR1 have pathogenic potential irrespective of epitope and immunoglobulin class. *Mol. Psychiatry* 22, 1776–1784.

Chataway, J., Martin, K., Barrell, K., Sharrack, B., Stolt, P., Wraith, D.C., and ATX-MS1467 Study Group (2018). Effects of ATX-MS-1467 immunotherapy over 16 weeks in relapsing multiple sclerosis. *Neurology* 90, e955–e962.

Chefdeville, A., Treilleux, I., Mayeur, M.-E., Couillault, C., Picard, G., Bost, C., Mokhtari, K., Vasiljevic, A., Meyronet, D., Rogemond, V., et al. (2019). Immunopathological characterization of ovarian teratomas associated with anti-N-methyl-D-aspartate receptor encephalitis. *Acta Neuropathol Commun* 7, 38.

Christophersen, A., Lund, E.G., Snir, O., Solà, E., Kanduri, C., Dahal-Koirala, S., Zühlke, S., Molberg, Ø., Utz, P.J., Rohani-Pichavant, M., et al. (2019). Distinct phenotype of CD4+ T cells driving celiac disease identified in multiple autoimmune conditions. *Nat. Med.* 25, 734–737.

Clemente-Casares, X., Blanco, J., Ambalavanan, P., Yamanouchi, J., Singha, S., Fandos, C., Tsai, S., Wang, J., Garabatos, N., Izquierdo, C., et al. (2016). Expanding antigen-specific regulatory networks to treat autoimmunity. *Nature* 530, 434–440.

Colijn, M.A., and Ismail, Z. (2019). Clinically Relevant Anti-Neuronal Cell Surface Antibodies in Schizophrenia Spectrum Disorders. *Neuropsychobiology* 78, 70–78.

Conti, F., Barbaresi, P., Melone, M., and Ducati, A. (1999). Neuronal and glial localization of NR1 and NR2A/B subunits of the NMDA receptor in the human cerebral cortex. *Cereb. Cortex* 9, 110–120.

Crotty, S. (2019). T Follicular Helper Cell Biology: A Decade of Discovery and Diseases. *Immunity* 50, 1132–1148.

Cull-Candy, S., Brickley, S., and Farrant, M. (2001). NMDA receptor subunits: diversity, development and disease. *Curr. Opin. Neurobiol.* 11, 327–335.

Dabner, M., McCluggage, W.G., Bundell, C., Carr, A., Leung, Y., Sharma, R., and Stewart, C.J.R. (2012). Ovarian teratoma associated with anti-N-methyl D-aspartate receptor encephalitis: a report of 5 cases documenting prominent intratumoral lymphoid infiltrates. *Int. J. Gynecol. Pathol.* 31, 429–437.

Dahm, L., Ott, C., Steiner, J., Stepniak, B., Teegen, B., Saschenbrecker, S., Hammer, C., Borowski, K., Begemann, M., Lemke, S., et al. (2014). Seroprevalence of autoantibodies against brain antigens in health and disease. *Ann. Neurol.* 76, 82–94.

Dalmau, J., and Graus, F. (2018). Antibody-Mediated Encephalitis. *N. Engl. J. Med.* 378, 840–851.

Dalmau, J., Tüzün, E., Wu, H., Masjuan, J., Rossi, J.E., Voloschin, A., Baehring, J.M., Shimazaki, H., Koide, R., King, D., et al. (2007). Paraneoplastic Anti-N-methyl-D-aspartate Receptor Encephalitis Associated with Ovarian Teratoma. *Ann Neurol* 61, 25–36.

Dalmau, J., Gleichman, A.J., Hughes, E.G., Rossi, J.E., Peng, X., Lai, M., Dessain, S.K., Rosenfeld, M.R., Balice-Gordon, R., and Lynch, D.R. (2008). Anti-NMDA-receptor encephalitis: case series and analysis of the effects of antibodies. *Lancet Neurol* 7, 1091–1098.

Dalmau, J., Lancaster, E., Martinez-Hernandez, E., Rosenfeld, M.R., and Balice-Gordon, R. (2011). Clinical experience and laboratory investigations in patients with anti-NMDAR encephalitis. *Lancet Neurol* 10, 63–74.

Dalmau, J., Geis, C., and Graus, F. (2017). Autoantibodies to Synaptic Receptors and Neuronal Cell Surface Proteins in Autoimmune Diseases of the Central Nervous System. *Physiol. Rev.* 97, 839–887.

Dalva, M.B., Takasu, M.A., Lin, M.Z., Shamah, S.M., Hu, L., Gale, N.W., and Greenberg, M.E. (2000). EphB receptors interact with NMDA receptors and regulate excitatory synapse formation. *Cell* 103, 945–956.

Day, G.S., Laiq, S., Tang-Wai, D.F., and Munoz, D.G. (2014). Abnormal neurons in teratomas in NMDAR encephalitis. *JAMA Neurol* 71, 717–724.

Drachman, D.B. (1994). Myasthenia gravis. *N. Engl. J. Med.* 330, 1797–1810.

Dubey, D., Alqallaf, A., Hays, R., Freeman, M., Chen, K., Ding, K., Agostini, M., and Vernino, S. (2017). Neurological Autoantibody Prevalence in Epilepsy of Unknown Etiology. *JAMA Neurol* 74, 397–402.

Ehrenreich, H. (2018). Autoantibodies against N-methyl-D-aspartate receptor 1 in health and disease. *Curr. Opin. Neurol.* 31, 306–312.

Endele, S., Rosenberger, G., Geider, K., Popp, B., Tamer, C., Stefanova, I., Milh, M., Kortüm, F., Fritsch, A., Pientka, F.K., et al. (2010). Mutations in GRIN2A and GRIN2B encoding regulatory subunits of NMDA receptors cause variable neurodevelopmental phenotypes. *Nat. Genet.* 42, 1021–1026.

Favier, M., Joubert, B., Picard, G., Rogemond, V., Thomas, L., Rheims, S., Bailhache, M., Villega, F., Pédespan, J.-M., Berzero, G., et al. (2018). Initial clinical presentation of young children with N-methyl-D-aspartate receptor encephalitis. *Eur. J. Paediatr. Neurol.* 22, 404–411.

Fleri, W., Paul, S., Dhanda, S.K., Mahajan, S., Xu, X., Peters, B., and Sette, A. (2017a). The Immune Epitope Database and Analysis Resource in Epitope Discovery and Synthetic Vaccine Design. *Front Immunol* 8, 278.

Fleri, W., Vaughan, K., Salimi, N., Vita, R., Peters, B., and Sette, A. (2017b). The Immune Epitope Database: How Data Are Entered and Retrieved. *J Immunol Res* 2017, 5974574.

Freedman, M.S., Thompson, E.J., Deisenhammer, F., Giovannoni, G., Grimsley, G., Keir, G., Ohman, S., Racke, M.K., Sharief, M., Sindic, C.J.M., et al. (2005). Recommended standard of cerebrospinal fluid analysis in the diagnosis of multiple sclerosis: a consensus statement. *Arch. Neurol.* 62, 865–870.

Gabilondo, I., Saiz, A., Galán, L., González, V., Jadraque, R., Sabater, L., Sans, A., Sempere, A., Vela, A., Villalobos, F., et al. (2011). Analysis of relapses in anti-NMDAR encephalitis. *Neurology* 77, 996–999.

Gable, M.S., Sheriff, H., Dalmau, J., Tilley, D.H., and Glaser, C.A. (2012). The frequency of autoimmune N-methyl-D-aspartate receptor encephalitis surpasses that of individual viral etiologies in young individuals enrolled in the California Encephalitis Project. *Clin. Infect. Dis.* 54, 899–904.

Garnier, A., Hamieh, M., Drouet, A., Leprince, J., Vivien, D., Frébourg, T., Le Mauff, B., Latouche, J.-B., and Toutirais, O. (2016). Artificial antigen-presenting cells expressing HLA class II molecules as an effective tool for amplifying human specific memory CD4(+) T cells. *Immunol. Cell Biol.* *94*, 662–672.

Gelpi, E., Höftberger, R., Graus, F., Ling, H., Holton, J.L., Dawson, T., Popovic, M., Pretnar-Oblak, J., Högl, B., Schmutzhard, E., et al. (2016). Neuropathological criteria of anti-IgLON5-related tauopathy. *Acta Neuropathol.* *132*, 531–543.

Gilardin, L., Delignat, S., Peyron, I., Ing, M., Lone, Y.-C., Gangadharan, B., Michard, B., Kherabi, Y., Sharma, M., Pashov, A., et al. (2017). The ADAMTS131239–1253 peptide is a dominant HLA-DR1-restricted CD4+ T-cell epitope. *Haematologica* *102*, 1833–1841.

Gleichman, A.J., Spruce, L.A., Dalmau, J., Seeholzer, S.H., and Lynch, D.R. (2012). Anti-NMDA receptor encephalitis antibody binding is dependent on amino acid identity of a small region within the GluN1 amino terminal domain. *J. Neurosci.* *32*, 11082–11094.

Granerod, J., Ambrose, H.E., Davies, N.W., Clewley, J.P., Walsh, A.L., Morgan, D., Cunningham, R., Zuckerman, M., Mutton, K.J., Solomon, T., et al. (2010). Causes of encephalitis and differences in their clinical presentations in England: a multicentre, population-based prospective study. *Lancet Infect Dis* *10*, 835–844.

Granerod, J., Cousens, S., Davies, N.W.S., Crowcroft, N.S., and Thomas, S.L. (2013). New estimates of incidence of encephalitis in England. *Emerging Infect. Dis.* *19*.

Graus, F., Titulaer, M.J., Balu, R., Benseler, S., Bien, C.G., Cellucci, T., Cortese, I., Dale, R.C., Gelfand, J.M., Geschwind, M., et al. (2016). A clinical approach to diagnosis of autoimmune encephalitis. *Lancet Neurol* *15*, 391–404.

Gresa-Arribas, N., Titulaer, M.J., Torrents, A., Aguilar, E., McCracken, L., Leypoldt, F., Gleichman, A.J., Balice-Gordon, R., Rosenfeld, M.R., Lynch, D., et al. (2014). Antibody titres at diagnosis and during follow-up of anti-NMDA receptor encephalitis: a retrospective study. *Lancet Neurol* *13*, 167–177.

Hacohen, Y., Deiva, K., Pettingill, P., Waters, P., Siddiqui, A., Chretien, P., Menson, E., Lin, J.-P., Tardieu, M., Vincent, A., et al. (2014). N-methyl-D-aspartate receptor antibodies in post-herpes simplex virus encephalitis neurological relapse. *Mov. Disord.* *29*, 90–96.

Hansen, K.B., Yi, F., Perszyk, R.E., Furukawa, H., Wollmuth, L.P., Gibb, A.J., and Traynelis, S.F. (2018). Structure, function, and allosteric modulation of NMDA receptors. *J. Gen. Physiol.* *150*, 1081–1105.

Hara, M., Martinez-Hernandez, E., Ariño, H., Armangué, T., Spatola, M., Petit-Pedrol, M., Saiz, A., Rosenfeld, M.R., Graus, F., and Dalmau, J. (2018). Clinical and pathogenic significance of IgG, IgA, and IgM antibodies against the NMDA receptor. *Neurology* *90*, e1386–e1394.

Hogan-Cann, A.D., and Anderson, C.M. (2016). Physiological Roles of Non-Neuronal NMDA Receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* *37*, 750–767.

Hughes, E.G., Peng, X., Gleichman, A.J., Lai, M., Zhou, L., Tsou, R., Parsons, T.D., Lynch, D.R., Dalmau, J., and Balice-Gordon, R.J. (2010). Cellular and synaptic mechanisms of anti-NMDA receptor encephalitis. *J. Neurosci.* *30*, 5866–5875.

Iemura, Y., Yamada, Y., Hirata, M., Kataoka, T.R., Minamiguchi, S., and Haga, H. (2018). Histopathological characterization of the neuroglial tissue in ovarian teratoma associated with anti-N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor encephalitis. *Pathol. Int.* *68*, 677–684.

Irani, S.R., Bera, K., Waters, P., Zuliani, L., Maxwell, S., Zandi, M.S., Friese, M.A., Galea, I., Kullmann, D.M., Beeson, D., et al. (2010). N-methyl-D-aspartate antibody encephalitis: temporal progression of clinical and paraclinical observations in a predominantly non-paraneoplastic disorder of both sexes. *Brain* *133*, 1655–1667.

Janetzki, S., Price, L., Schroeder, H., Britten, C.M., Welters, M.J.P., and Hoos, A. (2015). Guidelines for the automated evaluation of Elispot assays. *Nat Protoc* *10*, 1098–1115.

Jézéquel, J., Johansson, E.M., Dupuis, J.P., Rogemond, V., Gréa, H., Kellermayer, B., Hamdani, N., Le Guen, E., Rabu, C., Lepleux, M., et al. (2017). Dynamic disorganization of synaptic NMDA receptors triggered by autoantibodies from psychotic patients. *Nat Commun* *8*, 1791.

Jones, B.E., Tovar, K.R., Goehring, A., Jalali-Yazdi, F., Okada, N.J., Gouaux, E., and Westbrook, G.L. (2019). Autoimmune receptor encephalitis in mice induced by active immunization with conformationally stabilized holoreceptors. *Sci Transl Med* *11*.

Joubert, B., and Dalmau, J. (2019). The role of infections in autoimmune encephalitides. *Rev. Neurol. (Paris)* 175, 420–426.

Jurewicz, M.M., and Stern, L.J. (2019). Class II MHC antigen processing in immune tolerance and inflammation. *Immunogenetics* 71, 171–187.

Kalev-Zylinska, M.L., Symes, W., Little, K.C.E., Sun, P., Wen, D., Qiao, L., Young, D., During, M.J., and Barber, P.A. (2013). Stroke patients develop antibodies that react with components of N-methyl-D-aspartate receptor subunit 1 in proportion to lesion size. *Stroke* 44, 2212–2219.

Kayser, M.S., Titulaer, M.J., Gresa-Arribas, N., and Dalmau, J. (2013). Frequency and characteristics of isolated psychiatric episodes in anti-N-methyl-d-aspartate receptor encephalitis. *JAMA Neurol* 70, 1133–1139.

Kim, A., Hartman, I.Z., Poore, B., Boronina, T., Cole, R.N., Song, N., Ciudad, M.T., Caspi, R.R., Jaraquemada, D., and Sadegh-Nasseri, S. (2014). Divergent paths for the selection of immunodominant epitopes from distinct antigenic sources. *Nat Commun* 5, 5369.

Kim, T.-J., Lee, S.-T., Moon, J., Sunwoo, J.-S., Byun, J.-I., Lim, J.-A., Shin, Y.-W., Jun, J.-S., Lee, H.S., Lee, W.-J., et al. (2017). Anti-LGI1 encephalitis is associated with unique HLA subtypes. *Ann. Neurol.* 81, 183–192.

Kowal, C., DeGiorgio, L.A., Lee, J.Y., Edgar, M.A., Huerta, P.T., Volpe, B.T., and Diamond, B. (2006). Human lupus autoantibodies against NMDA receptors mediate cognitive impairment. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 19854–19859.

Kreye, J., Wenke, N.K., Chayka, M., Leubner, J., Murugan, R., Maier, N., Jurek, B., Ly, L.-T., Brandl, D., Rost, B.R., et al. (2016). Human cerebrospinal fluid monoclonal N-methyl-D-aspartate receptor autoantibodies are sufficient for encephalitis pathogenesis. *Brain* 139, 2641–2652.

Lejuste, F., Thomas, L., Picard, G., Desestret, V., Ducray, F., Rogemond, V., Psimaras, D., Antoine, J.-C., Delattre, J.-Y., Groc, L., et al. (2016). Neuroleptic intolerance in patients with anti-NMDAR encephalitis. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm* 3, e280.

Makuch, M., Wilson, R., Al-Diwani, A., Varley, J., Kienzler, A.-K., Taylor, J., Berretta, A., Fowler, D., Lennox, B., Leite, M.I., et al. (2018). N-methyl-D-aspartate receptor antibody production from germinal center reactions: Therapeutic implications. *Ann. Neurol.* 83, 553–561.

Malter, M.P., Elger, C.E., and Surges, R. (2013). Diagnostic value of CSF findings in antibody-associated limbic and anti-NMDAR-encephalitis. *Seizure* 22, 136–140.

Malviya, M., Barman, S., Golombeck, K.S., Planagumà, J., Mannara, F., Strutz-Seebohm, N., Wrzos, C., Demir, F., Baksmeier, C., Steckel, J., et al. (2017). NMDAR encephalitis: passive transfer from man to mouse by a recombinant antibody. *Ann Clin Transl Neurol* 4, 768–783.

Martinez-Hernandez, E., Horvath, J., Shiloh-Malawsky, Y., Sangha, N., Martinez-Lage, M., and Dalmau, J. (2011). Analysis of complement and plasma cells in the brain of patients with anti-NMDAR encephalitis. *Neurology* 77, 589–593.

McCarthy, D.P., Yap, J.W.-T., Harp, C.T., Song, W.K., Chen, J., Pearson, R.M., Miller, S.D., and Shea, L.D. (2017). An antigen-encapsulating nanoparticle platform for TH1/17 immune tolerance therapy. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* 13, 191–200.

Mikasova, L., De Rossi, P., Bouchet, D., Georges, F., Rogemond, V., Didelot, A., Meissirel, C., Honnorat, J., and Groc, L. (2012). Disrupted surface cross-talk between NMDA and Ephrin-B2 receptors in anti-NMDA encephalitis. *Brain* 135, 1606–1621.

Miyara, M., Chader, D., Burlion, A., Goldstein, J., Sterlin, D., Norol, F., Trebeden-Nègre, H., Claër, L., Sakaguchi, S., Marodon, G., et al. (2017). Combination of IL-2, rapamycin, DNA methyltransferase and histone deacetylase inhibitors for the expansion of human regulatory T cells. *Oncotarget* 8, 104733–104744.

Mohammad, S.S., Sinclair, K., Pillai, S., Merheb, V., Aumann, T.D., Gill, D., Dale, R.C., and Brilot, F. (2014). Herpes simplex encephalitis relapse with chorea is associated with autoantibodies to N-Methyl-D-aspartate receptor or dopamine-2 receptor. *Mov. Disord.* 29, 117–122.

Monyer, H., Burnashev, N., Laurie, D.J., Sakmann, B., and Seeburg, P.H. (1994). Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. *Neuron* 12, 529–540.

Moscato, E.H., Peng, X., Jain, A., Parsons, T.D., Dalmau, J., and Balice-Gordon, R.J. (2014). Acute mechanisms underlying antibody effects in anti-N-methyl-D-aspartate receptor encephalitis. *Ann. Neurol.* 76, 108–119.

Mueller, S.H., Färber, A., Prüss, H., Melzer, N., Golombeck, K.S., Kümpfel, T., Thaler, F., Elisak, M., Lewerenz, J., Kaufmann, M., et al. (2018). Genetic predisposition in anti-LGI1 and anti-NMDA receptor encephalitis. *Ann. Neurol.* 83, 863–869.

Muñiz-Castrillo, S., Vogrig, A., and Honnorat, J. (2020). Associations between HLA and autoimmune neurological diseases with autoantibodies. *Auto Immun Highlights* 11, 2.

Nolan, A., Buza, N., Margeta, M., and Rabban, J.T. (2019). Ovarian Teratomas in Women With Anti-N-methyl-D-Aspartate Receptor Encephalitis: Topography and Composition of Immune Cell and Neuroglial Populations Is Compatible With an Autoimmune Mechanism of Disease. *Am. J. Surg. Pathol.* 43, 949–964.

Nosadini, M., Mohammad, S.S., Ramanathan, S., Brilot, F., and Dale, R.C. (2015). Immune therapy in autoimmune encephalitis: a systematic review. *Expert Rev Neurother* 15, 1391–1419.

Ogawa, E., Nagai, T., Sakuma, Y., Arinuma, Y., and Hirohata, S. (2016). Association of antibodies to the NR1 subunit of N-methyl-D-aspartate receptors with neuropsychiatric systemic lupus erythematosus. *Mod Rheumatol* 26, 377–383.

Pan, H., Oliveira, B., Saher, G., Dere, E., Tapken, D., Mitjans, M., Seidel, J., Wesolowski, J., Wakhloo, D., Klein-Schmidt, C., et al. (2019). Uncoupling the widespread occurrence of anti-NMDAR1 autoantibodies from neuropsychiatric disease in a novel autoimmune model. *Mol. Psychiatry* 24, 1489–1501.

Paoletti, P., Bellone, C., and Zhou, Q. (2013). NMDA receptor subunit diversity: impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 14, 383–400.

Peng, Y., Zheng, D., Zhang, X., Pan, S., Ji, T., Zhang, J., Shen, H.-Y., and Wang, H.-H. (2019). Cell-Free Mitochondrial DNA in the CSF: A Potential Prognostic Biomarker of Anti-NMDAR Encephalitis. *Front Immunol* 10, 103.

Pham, J., Oseroff, C., Hinz, D., Sidney, J., Paul, S., Greenbaum, J., Vita, R., Phillips, E., Mallal, S., Peters, B., et al. (2016). Sequence conservation predicts T cell reactivity against ragweed allergens. *Clin Exp Allergy* 46, 1194–1205.

Planagumà, J., Leypoldt, F., Mannara, F., Gutiérrez-Cuesta, J., Martín-García, E., Aguilar, E., Titulaer, M.J., Petit-Pedrol, M., Jain, A., Balice-Gordon, R., et al. (2015). Human N-methyl D-aspartate receptor antibodies alter memory and behaviour in mice. *Brain* 138, 94–109.

Planagumà, J., Haselmann, H., Mannara, F., Petit-Pedrol, M., Grünewald, B., Aguilar, E., Röpke, L., Martín-García, E., Titulaer, M.J., Jercog, P., et al. (2016). Ephrin-B2 prevents N-methyl-D-aspartate receptor antibody effects on memory and neuroplasticity. *Ann. Neurol.* 80, 388–400.

Prüss, H., Finke, C., Höltje, M., Hofmann, J., Klingbeil, C., Probst, C., Borowski, K., Ahnert-Hilger, G., Harms, L., Schwab, J.M., et al. (2012). N-methyl-D-aspartate receptor antibodies in herpes simplex encephalitis. *Ann. Neurol.* 72, 902–911.

Rossjohn, J., Gras, S., Miles, J.J., Turner, S.J., Godfrey, D.I., and McCluskey, J. (2015). T cell antigen receptor recognition of antigen-presenting molecules. *Annu. Rev. Immunol.* 33, 169–200.

Shaw, P.J., and Ince, P.G. (1997). Glutamate, excitotoxicity and amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurol.* 244 Suppl 2, S3–14.

Shu, Y., Qiu, W., Zheng, J., Sun, X., Yin, J., Yang, X., Yue, X., Chen, C., Deng, Z., Li, S., et al. (2019). HLA class II allele DRB1*16:02 is associated with anti-NMDAR encephalitis. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 90, 652–658.

Sköldenberg, B., Aurelius, E., Hjalmarsson, A., Sabri, F., Forsgren, M., Andersson, B., Linde, A., Strannegård, O., Studahl, M., Hagberg, L., et al. (2006). Incidence and pathogenesis of clinical relapse after herpes simplex encephalitis in adults. *J. Neurol.* 253, 163–170.

Smith, E.L., and Peakman, M. (2018). Peptide Immunotherapy for Type 1 Diabetes—Clinical Advances. *Front Immunol* 9, 392.

van Sonderen, A., Roelen, D.L., Stoop, J.A., Verdijk, R.M., Haasnoot, G.W., Thijs, R.D., Wirtz, P.W., Schreurs, M.W.J., Claas, F.H.J., Sillevius Smitt, P.A.E., et al. (2017). Anti-LGI1 encephalitis is strongly associated with HLA-DR7 and HLA-DRB4. *Ann. Neurol.* 81, 193–198.

Stroebel, D., Casado, M., and Paoletti, P. (2018). Triheteromeric NMDA receptors: from structure to synaptic physiology. *Curr Opin Physiol* 2, 1–12.

Tabata, E., Masuda, M., Eriguchi, M., Yokoyama, M., Takahashi, Y., Tanaka, K., Yukitake, M., Horikawa, E., and Hara, H. (2014). Immunopathological significance of ovarian teratoma in patients with anti-N-methyl-d-aspartate receptor encephalitis. *Eur. Neurol.* 71, 42–48.

Tang, Q., Henriksen, K.J., Bi, M., Finger, E.B., Szot, G., Ye, J., Masteller, E.L., McDevitt, H., Bonyhadi, M., and Bluestone, J.A. (2004). In Vitro-expanded Antigen-specific Regulatory T Cells Suppress Autoimmune Diabetes. *Journal of Experimental Medicine* 199, 1455–1465.

Thompson, A.J., Banwell, B.L., Barkhof, F., Carroll, W.M., Coetzee, T., Comi, G., Correale, J., Fazekas, F., Filippi, M., Freedman, M.S., et al. (2018). Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. *Lancet Neurol* 17, 162–173.

Tian, M., Li, J., Lei, W., and Shu, X. (2019). Japanese Encephalitis Virus-Induced Anti-N-Methyl-D-Aspartate Receptor Encephalitis: A Case Report and Review of Literature. *Neuropediatrics* 50, 111–115.

Titulaer, M.J., McCracken, L., Gabilondo, I., Armangué, T., Glaser, C., Iizuka, T., Honig, L.S., Benseler, S.M., Kawachi, I., Martinez-Hernandez, E., et al. (2013). Treatment and prognostic factors for long-term outcome in patients with anti-NMDA receptor encephalitis: an observational cohort study. *Lancet Neurol* 12, 157–165.

Tsien, J.Z., Huerta, P.T., and Tonegawa, S. (1996). The essential role of hippocampal CA1 NMDA receptor-dependent synaptic plasticity in spatial memory. *Cell* 87, 1327–1338.

Turnbull, M.T., Siegel, J.L., Becker, T.L., Stephens, A.J., Lopez-Chiriboga, A.S., and Freeman, W.D. (2020). Early Bortezomib Therapy for Refractory Anti-NMDA Receptor Encephalitis. *Front Neurol* 11, 188.

Tüzün, E., Zhou, L., Baehring, J.M., Bannykh, S., Rosenfeld, M.R., and Dalmau, J. (2009). Evidence for antibody-mediated pathogenesis in anti-NMDAR encephalitis associated with ovarian teratoma. *Acta Neuropathol.* 118, 737–743.

Venkatesan, A. (2015). Epidemiology and outcomes of acute encephalitis. *Curr. Opin. Neurol.* 28, 277–282.

Vitaliani, R., Mason, W., Ances, B., Zwerdling, T., Jiang, Z., and Dalmau, J. (2005). Paraneoplastic encephalitis, psychiatric symptoms, and hypoventilation in ovarian teratoma. *Ann. Neurol.* 58, 594–604.

Wagnon, I., Hélie, P., Bardou, I., Regnauld, C., Lesec, L., Leprince, J., Naveau, M., Delaunay, B., Toutirais, O., Lemauff, B., et al. (2020). Autoimmune encephalitis mediated by B-cell response against N-methyl-d-aspartate receptor. *Brain*.

Wang, W., Zhang, L., Chi, X.-S., He, L., Zhou, D., and Li, J.-M. (2019). Psychiatric Symptoms of Patients With Anti-NMDA Receptor Encephalitis. *Front Neurol* 10, 1330.

Willison, H.J., Jacobs, B.C., and van Doorn, P.A. (2016). Guillain-Barré syndrome. *Lancet* 388, 717–727.

Wing, J.B., Tanaka, A., and Sakaguchi, S. (2019). Human FOXP3+ Regulatory T Cell Heterogeneity and Function in Autoimmunity and Cancer. *Immunity* 50, 302–316.

Wu, S., Li, H., Lian, Y., Chen, Y., Zheng, Y., Wang, C., Zhang, Q., Huang, Z., Mao, Z., and Pang, K. (2020). Anti-N-methyl-D-aspartate receptor encephalitis: a prospective study focused on cerebrospinal fluid and clinical symptoms. *Neurol. Sci.*

Wucherpfennig, K.W., and Strominger, J.L. (1995). Molecular mimicry in T cell-mediated autoimmunity: viral peptides activate human T cell clones specific for myelin basic protein. *Cell* 80, 695–705.

Zhang, Y., Liu, G., Jiang, M., Chen, W., and Su, Y. (2019). Efficacy of Therapeutic Plasma Exchange in Patients with Severe Refractory Anti-NMDA Receptor Encephalitis. *Neurotherapeutics* 16, 828–837.

Zhou, Q., and Sheng, M. (2013). NMDA receptors in nervous system diseases. *Neuropharmacology* 74, 69–75.

Zuliani, L., Graus, F., Giometto, B., Bien, C., and Vincent, A. (2012). Central nervous system neuronal surface antibody associated syndromes: review and guidelines for recognition. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 83, 638–645.



VU, LE PRESIDENT DU JURY

CAEN, LE

VU, LE DIRECTEUR DE LA FACULTE
DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

CAEN, LE

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

ETUDE DE LA REPONSE T CD4 VIS-A-VIS DU RECEPTEUR AU N-METHYL-D-ASPARTATE : IMPLICATIONS POUR L'IMMUNOTHERAPIE DANS L'ENCEPHALITE AUTO-IMMUNE

Résumé

L'encéphalite à anticorps anti-récepteur au N-méthyl-D-aspartate (NMDAR) est une atteinte grave du système nerveux central pouvant être à l'origine de symptômes neuropsychiatriques. Cette pathologie est médiée par des auto-anticorps, ciblant la sous-unité GluN1 des NMDAR. Aucune information n'est disponible concernant l'implication des lymphocytes T CD4, pourtant nécessaire à la mise en place d'une réponse humorale avec des IgG de haute affinité.

L'objectif a été d'évaluer la réponse T CD4 vis-à-vis de l'antigène GluN1 et d'identifier certains de ses épitopes. Une analyse bioinformatique a permis de sélectionner dix peptides candidats, issus de la protéine GluN1, ayant une forte affinité pour la molécule HLA-DR1. Puis, des expériences *in vitro* de stimulation de cellules mononucléées du sang périphérique de sujets sains, par la protéine GluN1 ou par les peptides candidats ont été réalisées. Nos résultats, obtenus par ELISpot, identifient deux peptides pertinents sans pouvoir démontrer qu'ils sont issus de l'apprêtement de la protéine GluN1. Ces résultats très préliminaires devront être confirmés sur un plus grand nombre de sujets.

A terme, la caractérisation d'épitopes T CD4 issus de GluN1 sera utile pour évaluer la réponse des lymphocytes T chez les patients, et élaborer des stratégies d'immunothérapies tolérogènes.

CD4 T CELL RESPONSE AGAINST N-METHYL-D-ASPARTATE : INVOLVEMENT FOR IMMUNOTHERAPY IN AUTO-IMMUNE ENCEPHALITIS

Summary

Anti-N-méthyl-D-aspartate receptor (NMDAR) encephalitis is a severe disorder of central nervous system causing neuropsychiatric symptoms. This pathology is mediated by auto-antibodies directed against GluN1 subunit of NMDAR. No information is available on the involvement of CD4 T cells, required for the establishment of a humoral response with high affinity IgG.

The objective was to evaluate CD4 T cell response against GluN1 antigen and determine its epitopes. Using bioinformatic analysis we selected ten candidate peptides from GluN1 protein that bind with a strong affinity HLA-DR1 molecule. Then, *in vitro* experiments has been realized with peripheral blood mononuclear cells of healthy donors stimulated by GluN1 protein or candidate peptides. Our ELISpot results identify two relevant peptides, but without evidences of processing from GluN1 protein. These preliminaries results should be confirm on a higher number of healthy donors.

Characterization of CD4 T epitopes of GluN1 would be useful to evaluate the patients' T cells reponse and development of tolerogenic immunotherapy strategies.

Mots-clés

Encéphalites auto-immunes ; Récepteur NMDA ; Epitopes T ; Lymphocytes T CD4
