



HAL
open science

Neuroprotection dans des modèles animaux de la sclérose en plaques : évaluation pluridisciplinaire de la capacité du XBD173, un ligand du translocator protein, à améliorer les symptômes cliniques et les marqueurs neuropathologiques

Géraldine Leva

► **To cite this version:**

Géraldine Leva. Neuroprotection dans des modèles animaux de la sclérose en plaques : évaluation pluridisciplinaire de la capacité du XBD173, un ligand du translocator protein, à améliorer les symptômes cliniques et les marqueurs neuropathologiques. Neurobiologie. Université de Strasbourg, 2017. Français. NNT : 2017STRAJ076 . tel-01744411

HAL Id: tel-01744411

<https://theses.hal.science/tel-01744411>

Submitted on 27 Mar 2018

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.

ÉCOLE DOCTORALE des Sciences de la vie et de la santé (ED 414)
**INSERM UMR_S U1119 Biopathologie de la Myéline, Neuroprotection et
Stratégies Thérapeutiques**

THÈSE présentée par :

Géraldine LEVA

soutenue le : **28 Septembre 2017**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'Université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : **Neurosciences**

**Neuroprotection dans des modèles animaux de la
sclérose en plaques: évaluation pluridisciplinaire
de la capacité du XBD173, un ligand du *translocator
protein*, à améliorer les symptômes cliniques et les
marqueurs neuropathologiques**

THÈSE dirigée par :

Mme. PATTE-MENSAH Christine

Docteur-HDR, Maître de Conférences-HC, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

**Mme. AKWA Yvette
M. CHARLIER Thierry**

Docteur-HDR, Chargée de Recherche INSERM Université Paris-Sud
Professeur, Université de Rennes

AUTRE MEMBRE DU JURY :

M. DUFOUR André

Professeur, Université de Strasbourg

AUTRES MEMBRES DU JURY INVITES:

**M. MENSAH-NYAGAN Ayikoé, Guy
M. DE SEZE Jérôme**

Professeur, Université de Strasbourg
Professeur, Université de Strasbourg

ÉCOLE DOCTORALE des Sciences de la vie et de la santé (ED 414)
**INSERM UMR_S U1119 Biopathologie de la Myéline, Neuroprotection et
Stratégies Thérapeutiques**

THÈSE présentée par :

Géraldine LEVA

soutenue le : **28 Septembre 2017**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'Université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : **Neurosciences**

**Neuroprotection dans des modèles animaux de la
sclérose en plaques: évaluation pluridisciplinaire
de la capacité du XBD173, un ligand du *translocator
protein*, à améliorer les symptômes cliniques et les
marqueurs neuropathologiques**

THÈSE dirigée par :

Mme. PATTE-MENSAH Christine

Docteur-HDR, Maître de Conférences-HC, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

**Mme. AKWA Yvette
M. CHARLIER Thierry**

Docteur-HDR, Chargée de Recherche INSERM Université Paris-Sud
Professeur, Université de Rennes

AUTRE MEMBRE DU JURY :

M. DUFOUR André

Professeur, Université de Strasbourg

AUTRES MEMBRES DU JURY INVITES :

**M. MENSAH-NYAGAN Ayikoé, Guy
M. DE SEZE Jérôme**

Professeur, Université de Strasbourg
Professeur, Université de Strasbourg

REMERCIEMENTS

Cette thèse a été réalisée au sein du laboratoire Biopathologie de la Myéline, Neuroprotection, et Stratégies thérapeutiques (UMR_S 1119) dirigé par le Professeur Mensah-Nyagan.

Je tiens tout d'abord à remercier sincèrement le Professeur Mensah-Nyagan Ayikoe-Guy de m'avoir donné l'opportunité de réaliser ce projet de thèse au sein de son laboratoire, et de m'avoir apporté la chance de réaliser mon stage de master 2 dans son unité. Je le remercie pour son encadrement, ses enseignements, son apport scientifique de grande qualité, et tous ses conseils durant ces trois ans et demi. Ses compétences et sa rigueur scientifique m'ont beaucoup appris. Je le remercie de m'avoir également donné la chance de participer à des congrès, ce fut de très belles opportunités et de très beaux souvenirs.

Je souhaiterais adresser mes sincères remerciements à ma directrice de thèse Docteur Patte-Mensah Christine pour avoir accepté d'encadrer ce travail doctoral, pour ses nombreux conseils et toute son aide durant ces trois ans. Je la remercie pour toutes les heures qu'elle a consacrées à diriger cette recherche. Je la remercie pour sa grande disponibilité et notamment durant ces dernières semaines avec des délais très serrés de correction et de relecture des documents que je lui ai adressés.

Je remercie le Docteur Akwa Yvette et le Professeur Charlier Thierry, de m'avoir fait l'honneur d'expertiser mon travail de thèse. Je remercie également le Professeur Dufour André et le Professeur De Seze Jérôme d'avoir accepté de siéger dans le jury de ma thèse, et d'avoir jugé mon travail. Merci aux membres de mon jury de m'accorder l'opportunité d'échanger scientifiquement avec eux.

Je tiens à remercier Le Professeur Jérôme De Seze et le Docteur Nicolas Collongues pour leurs conseils et leur aide tout au long de cette thèse.

Un grand merci aussi à tous les membres et ex-membres de l'unité U1119 de m'avoir permis de travailler dans un climat sympathique. Je les remercie pour leurs nombreux conseils et leurs soutiens durant ces trois années. Les nombreuses discussions que j'ai pu avoir avec chacun d'entre eux m'ont beaucoup apporté.

Je remercie le Docteur Laurence Meyer qui m'a régulièrement aidée tout au long de ma thèse.

Un grand merci au Docteur Susana Brun pour son aide technique et ses conseils scientifiques.

Je tiens également à remercier le Docteur Christian Klein pour toute son aide technique durant mon stage de master et mes trois années de thèses. Je le remercie pour sa disponibilité tout au long de ma thèse et notamment ces dernières semaines, qui ont été très intensives. Merci de m'avoir soutenue et d'avoir été présent.

Je tiens plus particulièrement à remercier Jérémie Benyounes, mon binôme de cette aventure. Je te remercie pour toute ton aide technique, pour les beaux schémas figurant dans cette thèse, mais aussi pour tous tes conseils scientifiques ou non scientifiques.

Merci d'avoir été présent durant ces trois dernières années, de m'avoir aidée, soutenue et supportée. Je tenais également à te remercier pour les moments passés ensemble hors du laboratoire qui resteront de très bons souvenirs.

Un grand merci aussi à Anne-Sophie Wilding, avec qui j'ai traversé tous les stades de la thèse. Je suis contente d'avoir débuté cette thèse en même temps que toi et de soutenir le même jour que toi. Merci pour ton soutien, pour toutes les discussions scientifiques ou non, et les soirées passées ensemble. Je n'en garderai que de bons souvenirs.

Je tenais aussi à remercier Claudia De Tapia, même si on a été moins proches ces derniers mois, je te remercie pour tous les bons moments que nous avons passés ensemble, pour toutes les conversations téléphoniques qui ont duré pendant des heures, pour tes nombreux conseils et ton soutien.

Un merci aussi à l'unité U1112 pour tous les agréables midis passés avec eux.

Puis je souhaite remercier tous mes amis. Merci d'être là, d'être présent dans les bons et les mauvais moments. Merci de m'avoir soutenue jusqu'au bout. Chaque moment passé ensemble m'a permis de recharger les batteries et partir remotivée pour une nouvelle journée ou une nouvelle semaine.

Un merci particulier à Marine, Mickaël, Emma, Emeric, Amélie, Waël, Christelle et Luigi. Vous avez toujours été présents pour moi, merci pour les formidables moments passés ensemble, les soirées, les dimanches après-midi, les bons repas, votre écoute et vos nombreux conseils. Je suis heureuse de vous avoir parmi mes amis. Merci pour tout. (J'espère que vous avez remarqué l'utilisation de l'expression "recharger les batteries" quelques lignes plus haut).

Un merci aussi particulier à mes amis avec lesquels nous partageons la même passion: Auriane, Camille, Julie, Thibault, Gaël, Mélissa et Mathieu. Merci pour tous les bons moments passés ensemble: à l'équitation, mais aussi en soirées ou en vacances. Merci de m'avoir changé les idées dans les moments les plus difficiles, et d'être toujours présents. Un immense merci à vous tous.

Un merci aussi à Gina, avec qui on se suit depuis le master1 et qui est devenue une très bonne amie.

Pour terminer, je voudrais exprimer une reconnaissance particulière à ma famille pour leur soutien et leur affection.

Un merci particulier à mes grands-parents, ma marraine, Philippe, Carole, Jean-Marie, Nadine et Sylvie et José, qui font presque partie de la famille. Merci de m'avoir écoutée, soutenue, et d'avoir veillé à ce que je garde tous mes kilos.

Un merci aussi à Christine, Rachel, Christophe, Sabine, Yves, Didier et Nadine pour leur écoute.

Je tiens aussi à remercier tous mes cousins et cousines pour les bons moments passés ensemble. Et j'embrasse fort les petits bouts de chou, Swan, Martin, Louise et mon filleul Viggo.

Enfin, je remercie infiniment et avec beaucoup d'émotion mes parents et ma petite sœur Mathilde. Je vous remercie d'avoir toujours cru en moi, d'avoir toujours été présents durant toutes ces années et de me supporter au quotidien.

Ma mimi, merci pour ton soutien, ta bonne humeur, et tous les moments passés ensemble.

Maman, Papa, merci de m'avoir permis de réaliser mes projets. Merci de m'avoir encouragée dans les études et de m'avoir soutenue financièrement et psychologiquement.

Merci d'être toujours disponibles et à mon écoute. Merci pour tout votre amour.

Heureusement que vous êtes là.

Merci infiniment pour tout ce que vous avez fait pour moi.

SOMMAIRE

SOMMAIRE	7
RESUME	13
ABSTRACT	20
ABREVIATIONS	21
LISTE DES TABLEAUX	24
LISTE DES FIGURES	25
INTRODUCTION	28
I LA SCLEROSE EN PLAQUES	29
I.1 La pathologie	29
I.1.1 Quelques généralités	29
I.1.2 Les facteurs de risques	30
I.1.2.1 Zone Géographique	30
I.1.2.2 Déterminant génétique	32
I.1.2.3 Facteurs environnementaux	35
I.1.3 Les symptômes	38
I.1.4 Evolution de la Sclérose en plaques	39
I.1.5 Le diagnostic	40
I.2 Physiopathologie	42
I.2.1 Les oligodendrocytes	43

I.2.2	La myéline.....	45
I.2.2.1	Structure et fonction de la myéline.....	45
I.2.2.2	Les protéines de la myéline	48
I.2.2.3	Les maladies de la myéline.....	50
I.2.2.4	Domage axonal.....	51
I.2.2.5	Remyélinisation.....	52
I.2.3	L'inflammation dans la SEP	53
I.3	Les traitements actuels.....	57
I.3.1	Exemples d'immunomodulateurs	58
I.3.1.1	l'Interféron bêta.....	58
I.3.1.2	l'Acétate de Glatiramer.....	59
I.3.2	Exemples d'immunosuppresseurs.....	59
I.3.2.1	Le Fingolimod	59
I.3.2.2	Le Natalizumab	60
I.4	Pistes thérapeutiques actuellement explorées.....	60
I.4.1	Thérapie génique	60
I.4.2	Implantation de cellules souches.....	61
II	LES MODELES ANIMAUX	63
II.1	L'Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE)	63
II.1.1	L'historique.....	63
II.1.2	Généralités.....	64
II.1.3	Immunisation des animaux.....	66
II.1.4	Le modèle EAE induit par les peptides PLP-MOG ou MBP.....	66
II.1.4.1	La souris SJL/J RJ	68
II.1.4.2	La souris C57BL/6J.....	69
II.1.5	Le modèle EAE induit chez la souris Biozzi.....	69
II.1.6	Limites et avantages du modèle EAE	70

MATERIELS ET METHODES	106
I LES MODELES ANIMAUX	107
II IMMUNISATION DES SOURIS.....	107
III SUBSTANCES PHARMACOLOGIQUES	108
IV ETUDE DE L'ACTION DU XBD173 SUR LES SCORES CLINIQUES (SC), LE POIDS ET L'EVALUATION LOCOMOTRICE.....	109
IV.1 Principe du score clinique (SC)	109
IV.2 Echelle des SC	109
IV.3 Protocole expérimental de la mesure du poids et de l'évaluation du SC	111
IV.4 Evaluation de l'activité locomotrice par le test du Catwalk	111
IV.4.1 Principe.....	111
IV.4.2 Protocole expérimental.....	112
V CONSERVATION DES TISSUS.....	113
VI ANALYSE DE L'EXPRESSION DES GENES CODANT MBP, NF200 ET CRMP2	114
VI.1 Principe générale d'une RT-PCR.....	114
VI.2 Principe de la PCR quantitative en temps réel ou RT-qPCR	114
VI.3 Protocole.....	115
VI.3.1 Extraction des ARN	115
VI.3.2 Reverse Transcription	117
VI.3.3 PCR quantitative en temps réel ou RT-qPCR	118
VII EXPRESSION DES PROTEINES MBP ET CRMP2 DANS LE CERVEAU ET LA MOELLE EPINIERE	121
VII.1 Principe de la technique d'immunofluorescence.....	121
VII.2 Préparation des coupes	121
VII.3 Réaction immunohistochimique	121
VIII EFFET DU XBD173 SUR LA CONCENTRATION SERIQUE DE CYTOKINES.....	123

VIII.1	Principe de la cytométrie en flux	123
VIII.2	Protocole expérimental	124
IX	ETUDE DU MECANISME D’ACTION DE XBD173 PAR DOSAGE DE L’ALLOPREGNANOLONE PAR LA TECHNIQUE ELISA	127
IX.1	Principe de la technique ELISA	127
IX.2	Protocole expérimental	127
IX.2.1	Préparation des échantillons	127
IX.2.2	Extraction des stéroïdes	128
IX.2.3	Test Elisa dosage de l'Alloprégnanolone	128
X	ANALYSES STATISTIQUES	129
	RESULTATS	130
I	Effet du XBD173 sur les scores cliniques des souris EAE.....	131
I.1	Dans le modèle rémittent récurrent de l’EAE	131
I.2	Dans la forme progressive de l’EAE	136
II	Effet de XBD173 sur l’activité motrice des souris SJL/J Rj, évaluée par le test du Catwalk	139
III	Effet de XBD173 sur la distribution et le niveau d'expression de MBP dans le cerveau et la moelle épinière des souris SJL/J Rj	141
IV	Effet de XBD173 sur la distribution de CRMP2 dans la moelle épinière de souris SJL/J Rj.....	148
V	Effet du XBD173 sur l'expression du gène MBP dans les structures spinales et cérébrales des souris SJL/J Rj	150
VI	Effet du XBD173 sur l'expression des gènes CRMP2 et NF200 dans la moelle épinière.....	153
VII	Effet de XBD173 sur la concentration d'alloprégnanolone	155
VIII	Effet de XBD173 sur la concentration de cytokines pro-inflammatoires.....	158
IX	Effet de l’administration concomitante d’interféron β et XBD173 (10 mg/kg) sur les scores cliniques des souris EAE	161

DISCUSSION 165

CONCLUSION ET PERSPECTIVES 174

BIBLIOGRAPHIE 180

ANNEXE: ARTICLE PUBLIE..... 205

RESUME

Les atteintes de la myéline du système nerveux provoquent des pathologies démyélinisantes comme la sclérose en plaques (SEP) qui est une maladie neurologique chronique. La SEP se définit comme une maladie inflammatoire auto-immune: le système immunitaire du patient, normalement responsable de sa défense contre les infections externes, s'attaque à la myéline de son cerveau et de sa moelle épinière pour des raisons encore mal connues. Les symptômes, qui varient d'un sujet à l'autre ou évoluent dans le temps, peuvent être une névrite optique, des troubles sensoriels, des troubles moteurs, une asthénie physique et/ou intellectuelle, des troubles urinaires et sexuels, des difficultés attentionnelles, des déficits cognitifs et des épisodes dépressifs. On distingue la SEP évoluant par poussées (forme rémittente-récurrente) qui atteint 85% des patients de celle évoluant progressivement qui touche 15% des patients. Les modèles murins d'encéphalomyélite autoimmune expérimentale (EAE) induits par MOG (myelin oligodendrocyte glycoprotein) ou PLP (proteolipid protein) miment respectivement la forme progressive et rémittente-récurrente de la maladie.

Des progrès ont été réalisés dans la lutte contre les processus inflammatoires impliqués dans la SEP mais à ce jour, il n'existe pas de médicaments neuroprotecteurs efficaces pour lutter contre les dommages neuronaux subséquents aux atteintes de la myéline alors que ces dommages sont responsables du handicap et des symptômes neurologiques graves. Par ailleurs, les traitements actuellement disponibles peuvent provoquer des effets indésirables tels que le syndrome pseudo-grippal transitoire (température élevée, fatigue, courbatures, maux de tête...), une atteinte du foie et favoriser, à long terme, de l'ostéoporose et de l'hypertension. Etant donné que la SEP se déclenche souvent chez des personnes jeunes qui sont obligées de recevoir les traitements tout au long de leur vie, il y a un risque réel pour ces personnes de subir à long terme des conséquences délétères liées aux effets secondaires des médicaments contre la SEP. Ainsi, l'identification de nouveaux médicaments efficaces contre la SEP sans effets secondaires majeurs au long cours représente un sérieux défi pour la recherche biomédicale. L'attente du monde médical est aussi très forte pour trouver des médicaments qui permettraient une prise en charge efficace des atteintes axonales et/ou neuronales résultant des anomalies de la myéline chez les patients SEP.

Depuis quelques années, les chercheurs de l'Unité INSERM U1119 mènent une recherche multidisciplinaire active dans le domaine de la neuroprotection pour la caractérisation de nouveaux neuroprotecteurs dans des modèles cellulaires ou animaux de la

maladie d'Alzheimer et des neuropathies chimio-induites (Schaeffer et al. 2008; Schaeffer et al. 2008; Meyer et al. 2010; Patte-Mensah et al. 2010; Schaeffer et al. 2010; Meyer et al. 2011; Klein et al. 2013; Patte-Mensah et al. 2014; Wendt et al. 2014). Ces travaux, ainsi que diverses autres données de la littérature, suggèrent que les neurostéroïdes et les composés modulateurs de la neurostéroïdogénèse (biosynthèse des neurostéroïdes) tels que les ligands du *translocator protein* (TSPO) pourraient servir à élaborer des stratégies efficaces contre les maladies neurodégénératives et/ou neurologiques comme la SEP (Papadopoulos et al. 2006; Rupprecht et al. 2009; Barron et al. 2013; Brinton 2013; Daugherty et al. 2013; Patte-Mensah et al. 2014). Le TSPO est une protéine localisée sur la membrane externe mitochondriale qui contrôle la translocation du cholestérol du milieu extra- vers le milieu intra-mitochondrial où se trouve le cytochrome *P450side-chain-cleavage* qui convertit le cholestérol en prégnénolone, démarrant ainsi la voie de synthèse des neurostéroïdes dans les cellules nerveuses. Il est également bien démontré que le TSPO est fortement impliqué dans la modulation des réponses inflammatoires et des processus neuroinflammatoires (Pawlikowski 1993; Vowinckel et al. 1997; Qi et al. 2012; Karlstetter et al. 2014; Wang et al. 2014). En particulier, des études récentes ont montré que le ligand TSPO dénommé XBD173 ou Emapunil, qui exerce des effets anxiolytiques sans induire d'actions indésirables comme le font les benzodiazépines, est efficace à faible dose (10 mg/kg) pour contrecarrer les processus neuroinflammatoires et protéger contre la dégénérescence rétinienne chez la souris (Scholz et al. 2015). Alors que ces résultats ont suscité l'espoir de développer des thérapies basées sur l'utilisation du XBD173 pour traiter la neuroinflammation évoquée par la SEP et prévenir les symptômes neurologiques, de façon surprenante, une étude antérieure a rapporté une absence d'efficacité du XBD173 à la dose de 30 mg/kg dans le modèle de souris EAE-MOG qui mime la forme progressive de la SEP humaine (Ravikumar et al. 2016).

Au regard des données rappelées ci-dessus, le principal but du travail de thèse est d'évaluer la capacité du XBD173, ligand spécifique du TSPO, à exercer des effets neuroprotecteurs pouvant faciliter la suppression ou l'amélioration des symptômes neurologiques des modèles de souris EAE. Nous nous sommes plus particulièrement intéressés au modèle EAE-PLP qui mime la forme rémittente-récurrente affectant la majorité (plus de 85%) des patients SEP. Néanmoins, nous avons également fait quelques vérifications des effets du XBD173 dans le modèle EAE-MOG. Nos travaux ont été réalisés avec une approche pluridisciplinaire associant des techniques comportementales, pharmacologiques, histologiques, biochimiques et moléculaires.

Pour atteindre notre objectif, nous avons dans un premier temps évalué les effets du XBD173 sur la symptomatologie de la maladie. Pour cela, des souris femelles âgées de 8-10 semaines, SJL/J Rj ou des souris mâles C57BL/6J, ont été immunisées respectivement avec la protéine PLP (EAE-PLP) ou avec la protéine MOG (EAE-MOG). Quatre groupes de souris ont été étudiés. Un groupe de souris non immunisé (contrôle) qui ne déclenche pas la maladie, leur score clinique (SC) reste à 0 (aucun symptôme). Les souris immunisées sont traitées par le XBD173 (10, 15 ou 20 mg/kg) ou par le véhicule. L'administration des substances, par voie intra-péritonéale, est réalisée tous les 2 jours à partir du 4^{ème} jour post-immunisation (J4). Une perte de poids corporel est observée chez toutes les souris EAE-PLP jusqu'à J14 (16-18% de perte) avant que ces souris ne récupèrent progressivement leur poids qui retourne à sa valeur initiale à J30. Chez les souris EAE-PLP traitées au véhicule, les SC augmentent parallèlement à la perte de poids pour atteindre un pic à J14 (SC de 4) avant de redescendre à des SC plus faibles (0.5-1) à J30. Le traitement au XBD173 (10 et 20 mg/kg) retarde significativement l'apparition des premiers symptômes et diminue la moyenne des SC au pic de la maladie (SC de 1.5 et 2, respectivement). Le SC de 3 (mouvements non coordonnés, parésie des pattes arrières) représente un indice clé de l'évolution des symptômes et donc du développement de la maladie. A J14, 77 % des souris traitées au XBD173 (10 mg/kg) présentent un SC inférieur à 3 alors que seulement 17 % des souris EAE traitées au véhicule ont un SC ne dépassant pas 3. Ces résultats confirment le fait que le XBD173 ralentit le développement des symptômes. En plus de l'évaluation cinétique des SC, la locomotion des souris est aussi mesurée deux fois par semaine à l'aide du test de Catwalk. Couplé à un logiciel de mesure, ce test permet d'analyser divers paramètres de motricité dont l'aire maximum de contact des pattes postérieures sur la plateforme (AMC, cm²). Le groupe véhicule présente une diminution significative de la moyenne de l'AMC de J3 à J14, proportionnelle à l'augmentation des SC, avec un retour à la valeur initiale à J24. En revanche, chez les souris traitées au XBD173 (10 ou 20 mg/kg), la moyenne de l'AMC augmente significativement au pic de la maladie.

Les expériences réalisées sur le modèle EAE-MOG sont encore préliminaires. Toutefois, les SC des souris traitées par le véhicule augmentent progressivement pour atteindre un plateau à J18, comme attendu dans ce modèle. Le traitement au XBD173 (15 mg/kg) induit une diminution des SC.

Compte-tenu des effets bénéfiques provoqués par le XBD173 pour réduire les SC des souris EAE-PLP, nous avons poursuivi les études par des analyses immunohistochimiques et de biologie moléculaire sur les moelles épinières (ME) et les cerveaux des souris SJL/J Rj.

Pour cela, la moitié des souris a été mise à mort au pic de la maladie (J14) où les SC sont les plus élevés, et l'autre moitié des souris a été sacrifiée à J24 juste avant la rechute (SC faibles). Nous avons étudié l'expression d'un marqueur spécifique de la myéline (la protéine basique de la myéline ou MBP) et de deux marqueurs axonaux (Collapsin response mediator protein ou CRMP2, et neurofilament 200 ou NF200).

Le marquage de la protéine MBP a été réalisé sur des coupes sagittales de ME et de cerveau à J14 en utilisant un anticorps polyclonal de lapin anti-MBP révélé soit par le kit SG (coloration), soit par un second anticorps couplé à l'Alexa 488 (immunofluorescence). Les observations microscopiques ont révélé que la distribution et l'intensité de l'immunomarquage MBP sont nettement plus faibles dans la ME et dans le cerveau des souris EAE-PLP traitées au véhicule en comparaison aux souris contrôles non immunisées. En particulier, les analyses quantitatives réalisées avec le logiciel de comptage microscopique cellSens Dimension Olympus ont montré une forte baisse de l'immunoréactivité MBP dans la ME, le corps calleux, le cervelet et le cortex cérébral des souris EAE traitées au véhicule comparées aux souris EAE traitées au XBD173 (10 ou 20 mg/kg) et aux animaux contrôles non immunisés. Ces résultats suggèrent que l'induction de l'EAE par l'immunisation avec la PLP provoque une diminution de la distribution et du niveau d'expression de la protéine MBP ainsi qu'une démyélinisation dans la ME et dans le cerveau, en particulier dans les structures cérébrales telles que le corps calleux, le cervelet et le cortex qui sont fortement myélinisées en situation normale et interviennent dans la régulation des divers processus neurophysiologiques moteurs, sensoriels et inter-hémisphériques. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons d'abord réalisé des expériences de biologie moléculaire en combinant les techniques de *reverse transcription* (RT) et de PCR quantitative en temps réel (qPCR). Ces expériences ont montré qu'au pic de la maladie (J14), le taux des transcrits ARN messagers (ARNm) codant la MBP est significativement réprimé dans la ME et le cerveau des souris EAE par rapport aux animaux contrôles. Le traitement au XBD173 (10 ou 20 mg/kg) restaure le niveau normal d'ARNm codant MBP dans la ME et le cerveau des souris EAE.

Dans la pathologie SEP, il a clairement été montré que la démyélinisation ou les anomalies de la myéline entraînent des atteintes axonales et/ou neuronales qui aggravent les symptômes neurologiques. Pour obtenir des informations sur une éventuelle atteinte ou souffrance axonale, nous avons alors évalué à J14 le niveau d'expression de CRMP2 et NF200, marqueurs axonaux, dans la ME des souris contrôles, véhicules, et traités avec XBD173 à 10 ou 20 mg/kg grâce à la RT-qPCR. De plus nous avons réalisé un marquage de

la protéine CRMP2 sur des coupes sagittales de ME à J14 en utilisant un anticorps polyclonal de lapin anti-CRMP2 révélé par un second anticorps couplé à l'Alexa 488 (immunofluorescence). Bien que préliminaires, nos résultats montrent une diminution du taux d'ARNm codant pour les protéines CRMP2 et NF200 dans la ME des souris EAE comparées aux contrôles et cette tendance à la baisse est prévenue par le traitement au XBD173. Les observations microscopiques ont révélé que l'intensité de l'immunomarquage CRMP2 est plus faible dans la ME des souris EAE-PLP traitées au véhicule en comparaison aux souris contrôles non immunisées. L'immunoréactivité CRMP2 est augmentée chez les animaux traités au XBD173 par rapport aux souris EAE-PLP injectées par le véhicule. Ces résultats préliminaires suggèrent que l'induction de l'EAE par l'immunisation avec la PLP provoque une perte axonale au niveau de la ME, qui est contrecarrée par le traitement au XBD173.

Les interleukines, en particulier les cytokines pro-inflammatoires, jouent un rôle majeur dans le développement des pathologies autoimmunes. Nous avons donc utilisé la cytométrie en flux pour déterminer l'effet du traitement XBD173 (10 ou 20 mg/kg) sur la concentration sérique d'interleukine-17 A (IL-17A), d'interleukine-6 (IL-6), du facteur de nécrose tumorale (tumor necrosis factor ou TNF- α), et de l'interféron gamma (IFN- γ) chez les souris EAE-PLP au pic de la maladie (J14). Le taux sérique des 4 cytokines pro-inflammatoires est fortement augmenté chez les animaux EAE-véhicule par rapport aux souris contrôles. Les animaux EAE traités au XBD173 (10 ou 20 mg/kg) présentent une concentration sérique d'IL-17A, d'IL-6 et de TNF α significativement réduite par rapport au véhicule, ce qui est en faveur d'une action anti-inflammatoire du XBD173. En clinique humaine, la phase inflammatoire de la SEP est couramment traitée par l'interféron beta (IFN- β) qui agit principalement sur la production des cytokines. Nous avons cherché à savoir si l'administration concomitante de XBD173 et d'IFN- β aurait un effet synergique pour empêcher ou retarder l'apparition des symptômes. Comme attendu, l'injection d'IFN- β (20 000 Unités, tous les deux jours) retarde l'apparition des symptômes et diminue les SC chez les souris EAE. L'administration concomitante de XBD173 et d'IFN- β ne permet pas d'obtenir un effet additif et/ou synergique par rapport à des injections de ces composés seuls. Toutefois l'administration concomitante des deux molécules (XBD173 et IFN- β) permet de décaler l'apparition des symptômes par rapport au véhicule et réduit le SC moyen au pic de la maladie. De plus, le traitement avec le concomitant (XBD173 et IFN- β) diminue significativement les SC de la phase de rémission par rapport aux groupes recevant l'IFN- β seul ou le véhicule suggérant un effet bénéfique de cette bithérapie pour favoriser la

remyélinisation et la réparation axonale qui se produisent au cours de cette période. Ce résultat devra être vérifié par des expériences complémentaires.

Alors que le mécanisme d'action du XBD173 n'est pas complètement élucidé, plusieurs études ont montré que l'activation du TSPO par le XBD173 entraîne une stimulation de la synthèse des neurostéroïdes, en particulier de l'alloprégnanolone (AP) qui exerce des effets neuroprotecteurs et anti-inflammatoires dans divers modèles expérimentaux. Nous avons alors utilisé la méthode ELISA pour doser les concentrations d'AP dans la ME et le cerveau des animaux contrôles et EAE traités au véhicule ou au XBD173 (10 ou 20 mg/kg). A J14, la concentration spinale et cérébrale d'AP est diminuée chez les souris traitées par le véhicule par rapport aux souris contrôles. L'administration de XBD173 restaure une concentration normale d'AP dans la ME et le cerveau chez les souris EAE.

En conclusion, nos études montrent que le XBD173, ligand spécifique du TSPO, stimule la synthèse de l'AP, diminue la production d'interleukines pro-inflammatoires, empêche la répression cérébrale et spinale de MBP et la démyélinisation centrale, réduit la perte axonale, et améliore la symptomatologie de l'EAE en retardant l'apparition des symptômes tout en en atténuant leur sévérité.

Les travaux réalisés au cours de la thèse ouvrent des perspectives intéressantes sur l'utilisation du XBD173 à faible dose pour élaborer des stratégies thérapeutiques efficaces contre la SEP avec peu ou pas d'effets secondaires à long terme. Les perspectives que nous envisageons se déclinent à court et moyen termes. Dans un premier temps, nous étofferons les études que nous avons commencées pendant la thèse et pour lesquelles les résultats étaient préliminaires: action du XBD173 dans le modèle EAE-MOG, évaluation des concentrations sériques d'autres cytokines pro- et anti-inflammatoires. Ces travaux permettront de confirmer les mécanismes d'action du XBD173 dans l'induction d'un effet bénéfique chez les souris EAE. Ensuite, nous étudierons également si des injections du XBD173 au moment de l'apparition des premiers symptômes à J8 ou J10 (thérapie curative) sont aussi efficaces que l'approche préventive utilisée dans la thèse qui a consisté à administrer le XBD173 à partir du 4^{ème} jour post-immunisation (J4).

Etant donné que l'ensemble de nos travaux chez l'animal est effectué en étroite collaboration avec les médecins-neurologues spécialistes de la SEP qui sont membres actifs de notre Unité INSERM (U1119) et du Centre d'Investigation Clinique de Strasbourg, nous pouvons raisonnablement espérer que les résultats prometteurs issus de la thèse et les

perspectives prévues contribueront à monter des essais cliniques permettant le transfert, vers la clinique humaine, des stratégies neuroprotectrices innovantes et efficaces contre la SEP.

ABSTRACT

Multiple sclerosis (MS) is a chronic inflammatory autoimmune disease affecting the central myelin. Progress has been made for MS treatment, but effective neuroprotective drugs against MS-evoked axonal damages and severe disability are still missing. This thesis assessed the potential of XBD173, a ligand of the translocator protein controlling neurosteroidogenesis and neuroinflammation, to improve symptoms in the proteolipid protein-induced MS model (EAE-PLP mice) that mimics the relapsing-remitting form affecting 85% of MS patients. Our results show that XBD173 at low dose decreases serum levels of pro-inflammatory interleukins, prevents the repression of myelin and axonal markers, and also ameliorates clinical deficits in EAE-PLP mice. The beneficial effect of XBD173 against clinical symptoms was also observed in the EAE-MOG mice mimicking the progressive MS. Promising perspectives are open for the development of effective strategies against MS with little or no serious side effects.

Keywords: Ligand of translocator protein; Multiple sclerosis; Neuroprotection; Neurosteroids; Therapeutic strategy; TSPO; XBD173 or Emapunil.

ABREVIATIONS

Acide désoxyribonucléique	ADN
Acide désoxyribonucléique complémentaire	ADNc
Acide ribonucléique	ARN
Acide ribonucléique messenger	ARNm
Adénosine triphosphate	ATP
Adjuvant complet de Freund (<i>Complete Freund's Adjuvant</i>)	CFA
Adjuvant incomplet de Freund (<i>Incomplete Freund's Adjuvant</i>)	IFA
Aire de contact maximum	ACM
Alloprégnanolone	AP
ATPase associée à diverses activités cellulaires (<i>ATPase associated with diverse cellular activities</i>)	AAA
Autorisation de mise sur le marché	AMM
Barrière hémato-encéphalique	BHE
Benzodiazépine	BZ
Bêta-amyloïde	A β
Canal anionique dépendant de la tension (<i>Voltage Dependent Anion Channel</i>)	VDAC
Cellules Présentatrices d'Antigènes	CPA
Cellules progénitrices des oligodendrocytes (<i>Oligodendrocyte progenitor cells</i>)	OPC
Cervelet	Cer
Complexe majeur d'histocompatibilité	CMH
Concentration d'ARNm	[ARNm]
Corps calleux	Cc
Cortex	C
Dosage d'immunoabsorption par enzyme liée (<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>)	ELISA
Encéphalomyélite auto-immune expérimentale	EAE
Enzyme de clivage de la chaîne latérale du cholestérol (<i>Cholesterol side-chain cleavage enzyme</i>)	P450 _{scc}
Erreur standard sur la moyenne (<i>Standard Error of the Mean</i>)	SEM
Facteur de nécrose tumorale (<i>Tumor necrosis factor</i>)	TNF
Glycoprotéine associée à la myéline (<i>Myelin-associated glycoprotein</i>)	MAG
Glycoprotéine d'oligodendrocyte de myéline (<i>Myelin oligodendrocyte glycoprotein</i>)	MOG
Hydroxypropylcellulose	HPC
3 β -hydroxystéroïde déshydrogénase (<i>3β-hydroxysteroid deshydrogenases</i>)	3 β -HSD

Imagerie par résonance magnétique	IRM
Interféron bêta	IFN- β
Interféron gamma	IFN- γ
Interleukine	IL
Lésions cérébrales traumatiques	LCB
Liquide céphalo-rachidien	LCR
Lymphocytes T auxiliaires (<i>T helper</i>)	Th
Lymphocytes T régulateurs	Tregs
Lymphocytes thymiques	LT
Métalloprotéinase-9 de la matrice	MMP-9
Millions d'unités internationales	MUI
Moelle épinière	ME
Neurofilament 200 kDa	NF200
Oligodendrocyte	OL
Paraformaldéhyde	PFA
Pertussis Toxine	PT
Phycoérythrine	PE
Pore de transition de perméabilité mitochondriale (<i>Mitochondrial permeability transition pore</i>)	MPTP
Prégnènone	PREG
Protéine 2 médiatrice de la réponse à la collapsine (<i>Collapsin response mediator protein 2</i>)	CRMP2
Protéine 3A de la famille des AAA-ATPases (<i>ATPase family AAA Domain-containing protein 3A</i>)	ATAD3A
Protéine basique de la myéline (<i>Myelin basic protein</i>)	MBP
Protéine régulatrice aigue stéroïdienne (<i>Steroidogenic acute regulatory protein</i>)	StAR
Protéine translocatrice 18 kDa (<i>Translocator protein 18 KDa</i>)	TSPO
Protéolipide protéine	PLP
Réaction en chaîne par polymérase (<i>Polymerase chain reaction</i>)	PCR
Réaction en chaîne par polymérase quantitative (<i>Polymerase chain reaction quantitative</i>)	qPCR
Récepteur antigénique de surface des lymphocytes T (<i>T cell receptor</i>)	TCR
Résonance magnétique nucléaire	RMN
Sclérose en plaques	SEP
Sclérose en plaques progressive primaire	PP-MS
Sclérose en plaques progressive secondaire	SP-MS
Sclérose en plaques rémittente-récurrente	RR-MS
Score clinique	SC
Solution saline tamponnée au phosphate (<i>Phosphate buffered saline</i>)	PBS
Souris EAE traitées au véhicule HPC 0,3%	Souris-veh

Systeme nerveux central	SNC
Systeme nerveux peripherique	SNP
Tomographie a emission de positons	TEP
Transcriptase inverse (<i>Reverse transcription</i>)	RT
Translocateur de nucleotides a adenine (<i>Adenine nucleotide translocase</i>)	ANT

LISTE DES TABLEAUX

Tableau	Titre	Page
1	Echelle des scores cliniques	110

LISTE DES FIGURES

Figure	Titre	Page
1	Prévalence de la sclérose en plaques dans le monde	31
2	Les principales formes de la sclérose en plaques	40
3	Visualisation des foyers d'inflammation dans le cerveau par IRM	42
4	Structure d'un neurone	43
5	Les différentes étapes de la maturation des oligodendrocytes	45
6	Myélinisation d'un axone par l'oligodendrocyte	46
7	Présentation d'un nœud de Ranvier qui permet la conduction de l'influx nerveux	47
8	Protéines de la myéline	49
9	Tableau présentant les principales pathologies de la myéline du SNC et du SNP	51
10	Les grandes étapes de la physiopathologie de la SEP	56
11	Localisation de quelques protéines de la myéline	68
12	Structure 3D du TSPO en présence du ligand PK-11195	77
13	Les différentes protéines formant le transductosome	78
14	Régulation de l'expression des gènes après activation du récepteur TSPO par le ligand PK 11195	82
15	Sites de liaison de ligands sur le récepteur TSPO	86
16	Structure de l'éthifoxine	87

17	Structure de XBD173	90
18	Voie de biosynthèse de quelques neurostéroïdes	95
19	Structure générale d'un récepteur nucléaire aux stéroïdes	96
20	Test comportemental du Catwalk	112
21	Principales étapes de l'extraction des ARNs	116
22	Tableau récapitulatif des produits nécessaires à la RT et les étapes de l'incubation.	117
23	Principales étapes de la PCR quantitative en temps réel	120
24	Principales étapes du principe de la cytométrie en flux	124
25	Principales étapes du protocole expérimental de la cytométrie en flux	126
26	Cinétique du poids des souris SJL/J RJ pour les groupes véhicule et XBD173	132
27	Evaluation des scores cliniques des souris SJL/J RJ pour les groupes souris-veh et XBD173 (10, 15 ou 20 mg/kg)	134-135
28	Cinétique du poids des souris C57BL/6J pour les groupes véhicule et XBD173 (10, 15 ou 20 mg/kg)	137
29	Evaluation des scores cliniques pour le groupe véhicule et les groupes traités avec le XBD173 des souris C57BL/6J	138
30	Effet de XBD173 sur l'activité motrice des souris SJL/J Rj	140
31	Immunomarquage de la protéine MBP sur des coupes sagittales cérébrales des souris SJL/J Rj	142
32	Marquage immunofluorescent de la protéine MBP dans la partie lombaire de la moelle épinière des souris SJL/J Rj	144
33	Marquage immunofluorescent de la protéine MBP dans le cervelet, le corps calleux et le cortex chez les souris SJL/J Rj	145

34	Quantification de l'expression de la protéine MBP dans les 3 zones du cerveau et dans la partie lombaire de la moelle épinière chez les souris SJL/J Rj	147
35	Marquage immunofluorescent de la protéine CRMP2 dans la moelle épinière des souris SJL/J Rj	149
36	Expression du gène MBP dans la moelle épinière et dans les différentes zones du cerveau des souris SJL/J Rj	151-152
37	Expression du gène CRMP2 dans la moelle épinière des souris SJL/J Rj	154
38	Expression du gène NF200 dans la moelle épinière des souris SJL/J Rj	155
39	Concentration d'alloprégnanolone dans les tissus cérébral et spinal des souris SJL/J Rj	157
40	Quantification avec la cytométrie de flux, de l'effet de XBD173 sur la concentration de cytokines pro-inflammatoire dans le sérum des souris SJL/J Rj	159-160
41	Cinétique du poids des souris SJL/J RJ pour les groupes véhicule, traités avec l'interféron β , ou co-traités avec l'interféron β + XBD173	162
42	Evaluation des scores cliniques pour les groupes véhicule, traités à l'interféron β seul et traités de façon concomitante à l'interféron β et au XBD173	164
43	Récapitulatif des principales étapes de l'effet de XBD173 10 mg/kg sur les souris SJL/J Rj EAE	176

INTRODUCTION

I LA SCLEROSE EN PLAQUES

I.1 La pathologie

I.1.1 Quelques généralités

La sclérose en plaques (SEP) est une maladie auto-immune chronique touchant le système nerveux central (SNC). C'est une maladie inflammatoire et neurodégénérative, avec des lésions démyélinisantes par plaques au sein de la substance blanche du SNC et des dommages axonaux. On distingue la SEP évoluant par poussées (forme rémittente-récurrente) qui atteint 85% des patients de celle évoluant progressivement qui touche 15% des patients. Les premières représentations de lésions du cerveau et de la ME caractéristiques de cette pathologie ont été décrites dès 1835. Pour la première fois en 1849, la SEP a été diagnostiquée chez un patient. Depuis, elle affecte plus de 100 000 individus en France, 400 000 en Europe et environ 2.5 millions de personnes dans le monde (Compston and Coles 2002) et 70% des patients ont entre 20 et 40 ans. La SEP représente la cause majeure de handicap dans cette tranche d'âge. Les études épidémiologiques montrent que, dans tous les pays où elle existe, la SEP est plus fréquente chez les femmes. On observe de légères différences entre certains pays, la proportion "Femmes/Hommes" (F/H) est la plus élevée en Nouvelle Zélande (F/H : 2,5/1) et la plus basse en Europe (F/H : 1,5/1). On admet que le rapport moyen est de 2/1. Plusieurs études à travers le monde suggèrent que, durant les 50 dernières années, l'incidence de la maladie a augmenté (Barnett et al. 2003), et que cette augmentation est plus rapide chez les femmes que chez les hommes, modifiant encore plus le ratio homme/femme (Orton et al. 2006; Alonso and Hernan 2008).

I.1.2 Les facteurs de risques

I.1.2.1 Zone Géographique

Cette pathologie est plus fréquente dans les régions tempérées que dans les régions tropicales comme le montre la figure 1. La SEP affecte particulièrement les caucasiens et très rarement les africains ou les asiatiques. Un gradient de latitude Pole-Equateur a été mis en évidence. Par exemple, la prévalence est forte au nord et au centre de l'Europe (Kingwell et al. 2013), au nord des Etats-Unis (Evans et al. 2013) mais aussi en Australie (Makhani et al. 2014) et en nouvelle Zélande (Pearson et al. 2016). Le Canada possède l'un des taux les plus élevés de SEP au monde. On estime à 65 000 personnes le nombre de Canadiens souffrant de cette maladie (Amankwah et al. 2017). La prévalence est faible en Afrique du Sud, en Asie (Makhani et al. 2014) et au Mexique (Rivera et al. 2014).

Un gradient de latitude est également observé au sein d'un même pays. Par exemple en Irlande, le taux d'incidence est élevé et comparable au reste des îles britanniques, avec la présence d'un gradient persistant Nord-Sud (O'Connell et al. 2017).

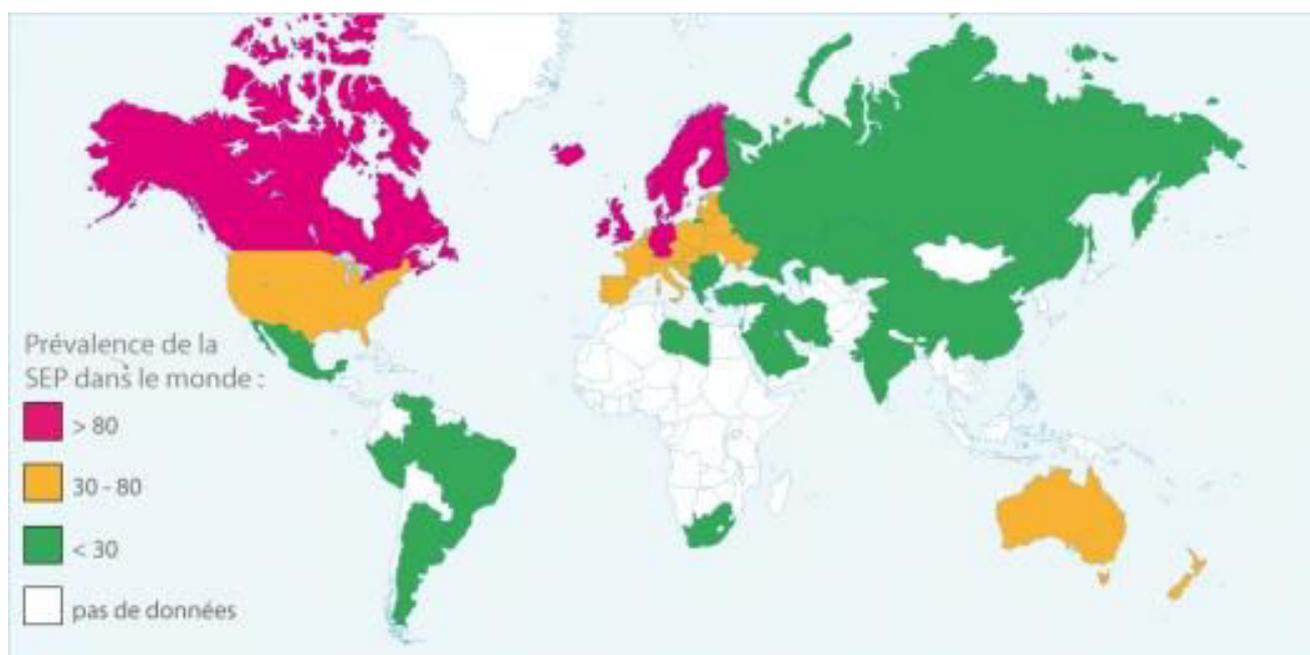


Fig. 1 : Prévalence de la sclérose en plaques dans le monde, D'après ARSEP fondation (ARSEP-fondation. 2017)

Cette carte représente le nombre de personnes atteintes de la SEP sur 100 000 habitants. Les zones représentées en rose sur la carte correspondent aux zones géographiques où l'on retrouve plus de 80 personnes touchées par la SEP; en orange, entre 30 et 80 personnes atteintes de la pathologie et les zones colorées en vert représentent moins de 30 individus atteints de la SEP.

De même, en France, les prévalences sont les plus élevées dans les Départements du Nord, Picardie, Champagne, Lorraine et Alsace. Cette prévalence est le double de celle observée en Provence-Côte d'Azur, Languedoc-Roussillon, Midi-Pyrénées. De même, la façade atlantique possède une prévalence faible (62, 59 et 47/100.000 habitants en Bretagne, pays de Loire et Poitou-Charente, respectivement) alors que la Franche-Comté, située à la même latitude, a une prévalence élevée de 95/100.000 habitants (Charcot.org).

I.1.2.2 Déterminant génétique

Le «gène» de la SEP n'existe pas. Ce n'est donc pas une maladie héréditaire simple. La SEP appartiendrait plutôt au groupe des «maladies à hérédités complexes» où l'association de plusieurs gènes conduirait au développement de la pathologie. Cependant, il existe des facteurs génétiques favorables à son déclenchement, sous l'influence d'autres facteurs, notamment environnementaux (voir paragraphe suivant). Le risque d'avoir la SEP est augmenté lorsqu'un parent est touché par cette pathologie surtout si les familles partagent le même environnement. Ainsi, des études ont dévoilé que les risques de développer la SEP étaient accrus si l'un des membres de la famille était atteint de la maladie (Dyment et al. 2004). Les risques augmentent de 20-50 fois (2 à 5%) pour une personne apparentée au premier degré (5% pour les frères et soeurs, 2% pour les parents et 2% pour les enfants). Le taux de concordance est plus élevé chez les jumeaux monozygotes (environ 30%) alors qu'il n'est que de 2% chez les jumeaux dizygotes (Compston 1999).

Il existe de nombreux variants génétiques connus et identifiés comme facteurs de prédisposition dans la maladie. L'analyse génétique de patients atteints de SEP a clairement démontré une forte association entre la présence de certains allèles du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I et/ou II et l'apparition de la maladie (Lincoln et al. 2005; Hafler et al. 2007; Svejgaard 2008; Ramagopalan and Ebers 2009; Ramagopalan et al. 2009). Par exemple, un individu portant l'allèle, HLA-DRB1*1501, possède trois fois plus de risques de développer la SEP qu'un individu qui ne le porte pas (Hafler et al. 2007; Parnell and Booth 2017). Pourtant, ce n'est pas si simple car il existe aussi des combinaisons d'allèles plus ou moins impliquées dans le développement de la maladie. En effet, d'autres allèles et d'autres gènes du CMH peuvent intervenir dans la prédisposition génétique de la maladie. Il a été identifié plus de 50 variants de susceptibilité pour la SEP à travers le génome. Outre les gènes du CMH, 200 autres gènes pourraient intervenir dans le déclenchement de la maladie

(Parnell and Booth 2017) codant des cytokines, des immunoglobulines, des protéines impliquées dans la clairance des agents pathogènes mais aussi le récepteur cellulaire des lymphocytes T. Un grand nombre de gènes impliqués jouent donc un rôle fondamental dans le fonctionnement du système immunitaire.

Le chromosome X est-il impliqué dans la SEP? Cette question se pose puisque les études épidémiologiques européennes montrent que la prévalence de la SEP est toujours plus élevée chez la femme que chez l'homme, avec des sex-ratios variant de 1.1 à 3.4 femmes atteintes pour un homme. Il n'existe aucune indication directe de l'impact de gènes localisés sur le chromosome X et le développement de la maladie. Cependant, plusieurs gènes impliqués dans l'immunité sont présents sur le chromosome X, par exemple, *TLR7* (Toll-like receptor), *CD40L* (cluster of differentiation) et *FoxP3* (forkhead box) qui pourraient être impliqués dans la SEP (Harbo et al. 2013) et leur mutation pourrait concourir à observer des problèmes de reconnaissance de l'auto-immunité (Selmi 2008). En effet, pour cette dernière hypothèse, le lien entre le chromosome X et l'auto-immunité a été démontré chez les personnes atteintes du syndrome d'hyper-IgM qui est causé par une anomalie de *CD40L* (localisé en Xq26). Le ligand CD40 est exprimé à la surface des lymphocytes T CD4+ activés. De même, le syndrome de Wiskott-Aldrich, maladie récessive héréditaire liée à une mutation du gène *WAS* (Xp11.4-p11.21), conduit à la dysrégulation immunitaire et à des manifestations auto-immunes (Selmi 2008).

Les femmes atteintes du syndrome de Turner (XO), caractérisé par une monosomie chromosomique X complète ou partielle, présentent un risque accru de maladies auto-immunes, en partie en raison de la haploinsuffisance des gènes présents sur le chromosome X. En effet, d'autres caractéristiques du phénotype du syndrome de Turner peuvent également être responsables du risque élevé de maladies auto-immunes comme la concentration accrue de cytokines pro-inflammatoires telles que IL-6, IL-8 et TNF- α (Jorgensen et al. 2010). Les

personnes atteintes du syndrome de Klinefelter possèdent un chromosome sexuel X supplémentaire (XXY). Les hommes atteints de ce syndrome ont une augmentation du risque de maladies auto-immunes comme la SEP confirmant ainsi l'implication du chromosome X dans les maladies auto-immunes (Seminog et al. 2015). Le chromosome X pourrait être impliqué dans la SEP non par des mutations présentes mais par l'existence de gènes de susceptibilité (gènes impliqués dans l'immunité). Ainsi, selon cette hypothèse, la présence de deux chromosomes X dans le sexe féminin pourrait multiplier par deux ou augmenter significativement le risque de SEP. Toutefois, cette relation de cause à effet n'est pas systématique dans toutes les populations car le sex-ratio fluctue également en fonction de divers autres facteurs biologiques, notamment les facteurs hormonaux. Ces constats ont donc amené les chercheurs à étudier le rôle joué par les hormones sexuelles dans le développement de la pathologie. En effet, il a été observé que chez la femme enceinte, qui est sujette à d'importantes fluctuations des hormones sexuelles, le nombre moyen de poussées annuelles diminue progressivement durant les 3 trimestres de grossesse passant de 0.7 avant la grossesse, à 0.6, puis 0.5 et enfin 0.2 aux 1^{er}, 2^{ème} et 3^{ème} trimestres, respectivement. Puis, après l'accouchement, le nombre moyen de poussées annuelles augmente fortement (taux annuel moyen de 1.2) pour retrouver progressivement une valeur seuil un an après l'accouchement (Confavreux et al. 1998). Dans l'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE), un modèle animal de SEP (voir paragraphe sur les modèles animaux), les souris transgéniques SJL/J RJ femelles ont une sensibilité accrue à développer une EAE par rapport aux souris mâles (Smith-Bouvier et al. 2008). D'autres études ont montré que la testostérone et l'estriol induisent des effets anti-inflammatoires ainsi que des effets neuroprotecteurs (Gold and Voskuhl 2009). Le traitement par l'estriol s'est avéré être efficace chez les souris EAE lorsqu'elles reçoivent le traitement après l'apparition des symptômes (Kim et al. 1999). Il a été montré que le traitement aux œstrogènes affecte les cytokines, les

chimiokines, la métalloprotéinase-9 de la matrice (MMP-9), la présentation des antigènes et la fonction des cellules dendritiques. En effet, l'administration d'oestrogènes, le 17β -oestradiol, diminue les risques de développement de l'EAE soit en augmentant principalement les lymphocytes Th2, soit en diminuant les cytokines pro-inflammatoires et TNF- α dans le SNC (Bebo et al. 2001; Ito et al. 2001; Matejuk et al. 2001; Liu et al. 2003; Subramanian et al. 2003; Palaszynski et al. 2004). Le traitement aux oestrogènes (œstradiol *E2*) induit également les lymphocytes T régulateurs CD25+ permettant une diminution des symptômes (Matejuk et al. 2004).

Bien que tous les arguments cités ci-dessus plaident en faveur de l'implication de facteurs génétiques et/ou hormonaux dans la survenue de la SEP, les facteurs environnementaux joueraient aussi un rôle important dans le déclenchement de la maladie.

I.1.2.3 Facteurs environnementaux

La contribution des facteurs environnementaux à la SEP, s'est vérifiée en étudiant les migrations de populations entre des zones de prévalences inégales. Par exemple, des personnes migrant d'une zone à fort risque vers une zone à faible risque présentent moins de prédisposition à développer la maladie. Cependant, des migrants provenant d'un pays à faible prévalence de SEP et s'installant dans une zone fortement risquée tendent à garder un faible risque de développer la maladie comparable à celui de leur pays d'origine (Gale and Martyn 1995). Compte tenu de ces constatations, la question s'est posée de savoir s'il existe un âge seuil à partir duquel le risque de développer la SEP était établi. Bien que des études semblent établir un âge seuil à environ 15 ans, d'autres n'ont pas montré de corrélation entre l'âge de migration et le risque de développer une SEP (Compston 2005; Milo and Kahana 2010).

Parmi les facteurs environnementaux suspectés, plusieurs pistes ont été étudiées. En tenant compte de la répartition de la maladie selon le gradient Nord (très fréquente) / Sud

(rare) reflétant le niveau d'ensoleillement, le taux de Vitamine D a été une des premières pistes testées. Il a été montré que la vitamine D joue un rôle immunomodulateur. En effet, elle augmente la réponse phagocytaire au niveau des macrophages, elle diminue l'expression des molécules CD40, CD80 et la concentration des cytokines pro-inflammatoires comme IL-12 et IL-23. Elle inhibe la production de Th1, Th9 et Th17 provoquant ainsi la diminution de la concentration de l'IFN- γ ou encore de l'IL-17. La Vitamine D module aussi d'autres types de mécanismes impliqués dans l'inflammation comme l'induction de l'apoptose des lymphocytes B et stimulation de la synthèse de l'IL-10 (Vanherwegen et al. 2017). Cependant, l'exposition au rayonnement UV pourrait être associée au déclenchement de la SEP même si cette hypothèse est controversée. En effet, certaines études, qui utilisent les estimations de données satellitaires UV et les chiffres de prévalence de la SEP, ont montré que l'exposition prolongée à la lumière du soleil est un facteur de risque potentiel pour la SEP (Orton et al. 2011). Plus récemment, des études, réalisées dans le modèle EAE, ont décrit que l'irradiation aux UVB bloque sélectivement l'infiltration et la liaison des cellules inflammatoires dans le système nerveux central empêchant ainsi le développement de la SEP (Hoel et al. 2016).

L'exposition aux agents viraux et bactériens tels que le virus Epstein Barr (EBV), le virus de l'herpès humain de type 6 et la pneumonie mycoplasma est très suspectée dans l'apparition de la SEP. En effet, les virus sont considérés comme un facteur environnemental capable d'engendrer des maladies auto-immunes par divers mécanismes comme le mimétisme moléculaire, l'activation de cellules (par exemple les cellules T) et l'infection persistante du virus (Fujinami et al. 2006; Virtanen and Jacobson 2012). La vaccination étant un moyen de contrôle de la prolifération virale, la communauté scientifique s'est interrogée sur son rôle éventuel comme facteur de risque dans le développement et la progression des maladies démyélinisantes dont la SEP. Toutefois, les données actuellement disponibles sont très contradictoires, ce qui laisse encore ouverte ou spéculative la question de la vaccination

considérée comme un facteur de risque de la SEP (Langer-Gould et al. 2014; Williamson et al. 2016; Mailand and Frederiksen 2017).

Le tabagisme actif ou passif au cours de l'enfance est également soupçonné d'intervenir dans le déclenchement de la maladie. L'oxyde nitrique (NO) contenu dans les cigarettes et la production de monoxyde de carbone (CO) joueraient un rôle important dans le déclenchement de la SEP (Shirani and Tremlett 2010). Des études ont montré que le NO à des concentrations élevées toxiques, peut endommager les neurones et les oligodendrocytes. En effet, la peroxydation des lipides et les dommages mitochondriaux qui résultent de l'action du NO peuvent conduire à une apoptose des oligodendrocytes, à une dégénérescence axonale et à une démyélinisation. De plus, des niveaux élevés de NO ont été observés dans le liquide céphalo-rachidien lors des rechutes de la SEP et pendant la progression de la maladie (Mandia et al. 2014).

La carence en vitamines, en particulier la vitamine B12, pourrait aussi être un facteur de risque. En effet, la carence en vitamine B12 empêche la méthylation des protéines de la myéline conduisant à une malformation de la gaine de myéline (Miller et al. 2005).

Plusieurs études ont montré des associations bénéfiques ou non entre le régime alimentaire et le risque de SEP. Par exemple, un apport élevé de poisson protégerait contre la maladie, alors qu'un taux calorique important de graisse animale augmenterait le risque de SEP (Riccio and Rossano 2015).

Enfin, l'obésité, en particulier chez les adolescents, pourrait être un facteur aggravant dans le développement de la SEP (Gianfrancesco and Barcellos 2016).

Parmi tous ces facteurs de risques environnementaux avérés ou suspectés, actuellement le «trio gagnant» est la vitamine D, le tabac, et le virus Epstein-Barr (Belbasis et al. 2015).

I.1.3 Les symptômes

Les symptômes dépendent de la localisation des plaques de démyélinisation et donc de la partie du système nerveux qui est touché par l'inflammation. Ils sont donc très variés et variables d'une personne à l'autre. La fatigue ou asthénie est un des symptômes les plus fréquents et invalidants qui touche 60 à 90% des patients même au début de la maladie et qui passe souvent inaperçu. C'est pourquoi ce paramètre est principalement évalué par des questionnaires tels que l'échelle de gravité de fatigue appelé FSS ("Fatigue Severity Scale") ou l'échelle d'impact de fatigue modifiée (MFIS, "Modified Fatigue Impact Scale") qui permettent de mesurer la fréquence et le type de fatigue (Flachenecker et al. 2002). Cependant, pour que la fatigue soit rattachée directement à la SEP, d'autres facteurs sont recherchés et les plus fréquemment pressentis se répartissent en troubles visuels, moteurs et/ou sensitifs. Les troubles de la vue constituent le premier symptôme dans environ 20 % des cas. Ces troubles sont causés par une névrite optique provoquant une vision trouble, une perte de la vision complète ou partielle, des mouvements oculaires involontaires plus ou moins douloureux (Galetta et al. 2012). Les troubles moteurs sont observés chez 80 à 90 % des malades. Ils se manifestent par une faiblesse ou un engourdissement musculaire dans un ou plusieurs membres, une spasticité musculaire, des tremblements, une difficulté dans la coordination des mouvements et/ou une perte de l'équilibre (Rieckmann et al. 2015). Les troubles sensitifs peuvent être également présents chez 1 personne sur 3. Cela se traduit par une paresthésie (trouble de la sensibilité tactile) avec des sensations de fourmillement et/ou d'engourdissement, de décharges électriques. Le malade peut également avoir des troubles de la sensibilité thermique (difficulté à reconnaître le chaud du froid), une diminution de la sensibilité cutanée au toucher (Frohman et al. 2011).

Lorsque la maladie évolue, d'autres symptômes, plus ou moins sévères, peuvent survenir tels que des difficultés d'élocution, des troubles urinaires (incontinence, envies

pressantes, difficultés à vider sa vessie, infections urinaires, etc.), des dysfonctions sexuelles et des troubles de la mémoire, de l'humeur ou de la concentration (Jongen 2017). De plus, 30 à 50% des patients déclenchent un trouble dépressif qui impacte leur qualité de vie mais qui n'augmente pas nécessairement le risque de poussée (Hart et al. 2005).

I.1.4 Evolution de la Sclérose en plaques

L'évolution de la maladie est très variable selon les personnes. Il existe deux formes cliniques majeures de SEP: les SEP à forme cyclique ou rémittente-récurrente (RR-MS) et les SEP progressives primaires (PP-MS). Ces deux formes présentent des différences sur le plan radiologique (McFarland 1999; Rovaris and Filippi 2003), histologique (Lucchinetti et al. 2000) et clinique (Sospedra and Martin 2005). La forme RR-MS est la plus fréquente et touche environ 85% des patients au début de la maladie. Elle se caractérise par des poussées qui perdurent dans le temps (entre une semaine et un mois). Ces poussées sont associées à l'apparition de lésions inflammatoires dans le SNC, visibles en IRM. Au début la maladie se caractérise par une rémission totale ou quasi totale entre les premières poussées, alternance dans le temps de poussées suivies de périodes de récupération plus ou moins longues. Lorsque les poussées deviennent plus fréquentes, la récupération devient partielle ce qui conduit à l'accumulation de dommages neurologiques (Thompson et al. 1990; Lublin and Reingold 1996). Dans la majorité des cas, les patients entrent dans une nouvelle phase de la maladie, appelée SEP progressive secondaire (SP-MS). A ce stade, la maladie n'évolue plus par poussées, et le handicap progresse de manière continue, il n'y a plus de phase de rémission.

Dans environ 15% des cas, la maladie débute par la forme progressive (PP-MS). Cette forme est caractérisée par une accumulation permanente des déficits neurologiques sans poussée ni rémission, le handicap s'installe progressivement et s'accroît avec le temps. La

forme dite progressive récurrente se présente comme la forme progressive mais sur laquelle se superpose des poussées (Fig. 2).

Quel que soit le mode d'évolution, il semblerait qu'il existe un seuil de progression du handicap clinique à partir duquel débiterait une neurodégénérescence.

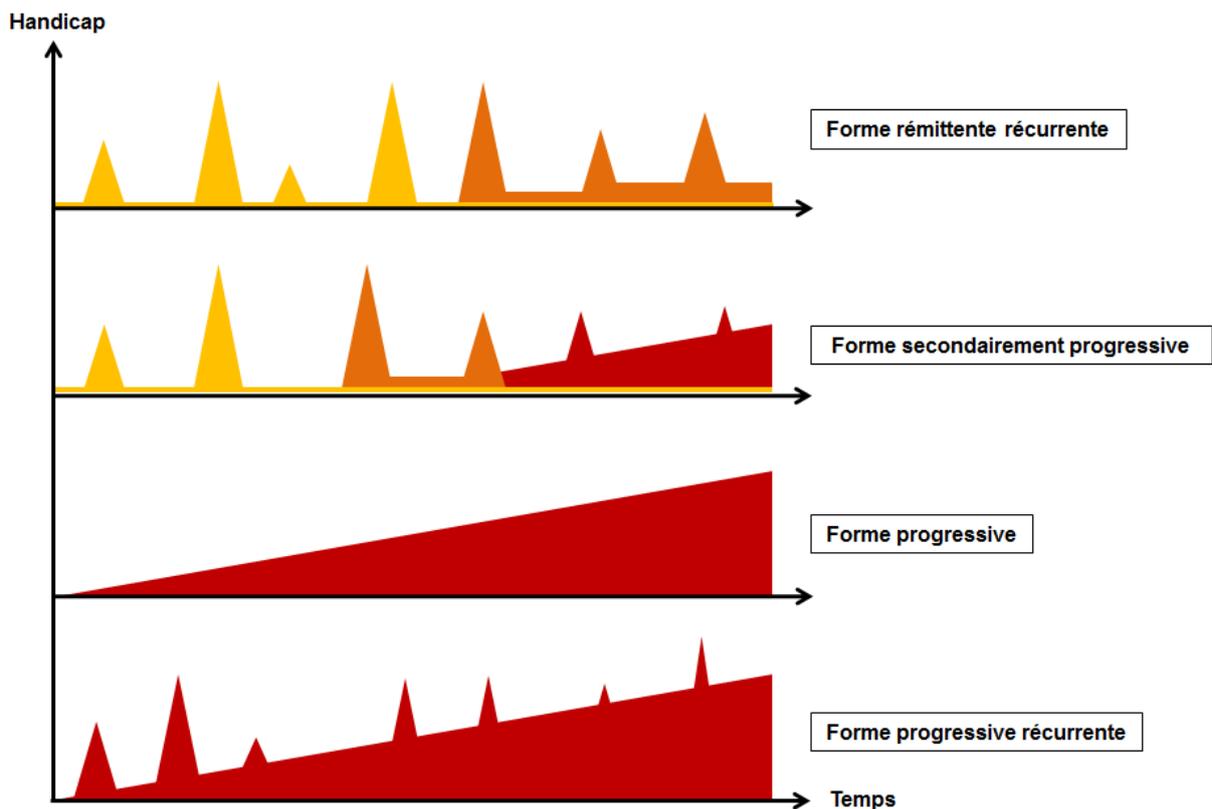


Fig. 2: Les principales formes de la sclérose en plaques.

Pic = poussée de la maladie. Code couleur indique la sévérité de la pathologie.

(Schéma d'après le site Midi Pyrénées Sclérose En Plaques (Midi_Pyrénées_Sclérose_En_Plaques)).

I.1.5 Le diagnostic

La SEP est une maladie du système nerveux central avec des symptômes neurologiques disséminés dans l'espace et dans le temps. Par conséquent, aucun symptôme,

considéré isolément, n'est spécifique de la SEP. Il n'existe pas de test diagnostique permettant de détecter la maladie de façon certaine, il n'y a pas de marqueurs biologiques visualisables dans le sang. Le diagnostic de cette pathologie est donc fondé sur un faisceau d'arguments cliniques, sur l'imagerie par résonance magnétique (IRM) et sur des tests para-cliniques (biologie du liquide céphalo-rachidien (LCR), mesure de la vitesse de conduction dans le SNC). Les critères de diagnostic ont évolué dans le temps, en particulier grâce au progrès de l'IRM. Les neurologues s'appuient sur les critères décrits par McDonald en 2001 (McDonald et al. 2001), révisés en 2010. Ces critères conservent la notion de dissémination spatio-temporelle de l'atteinte inflammatoire du SNC tout en intégrant l'IRM. En effet, l'examen IRM peut permettre de poser un diagnostic de SEP de manière très précoce, parfois même avant une deuxième poussée (Fig.3).

Actuellement, le diagnostic de SEP repose sur au moins 3 critères principaux :

- 1) La dissémination dans le temps, démontrée par la clinique. Il faut au moins deux poussées séparées d'au moins 1 mois ou une évolution progressive sur une période de 6 mois.
- 2) La dissémination dans l'espace, minimum 2 lésions distinctes du SNC, validées par IRM.
- 3) L'inflammation chronique du SNC révélée par l'analyse du LCR. En effet, cette analyse met en évidence une réaction inflammatoire du SNC. La présence d'un index augmenté d'immunoglobulines G démontre une dissémination spatiale de la maladie. De plus, une anomalie du LCR peut fournir une preuve de soutien de la nature immunitaire et inflammatoire des lésions, ce qui peut être utile lorsque les critères d'imagerie manquent de spécificité ou lorsque la présentation clinique est atypique.

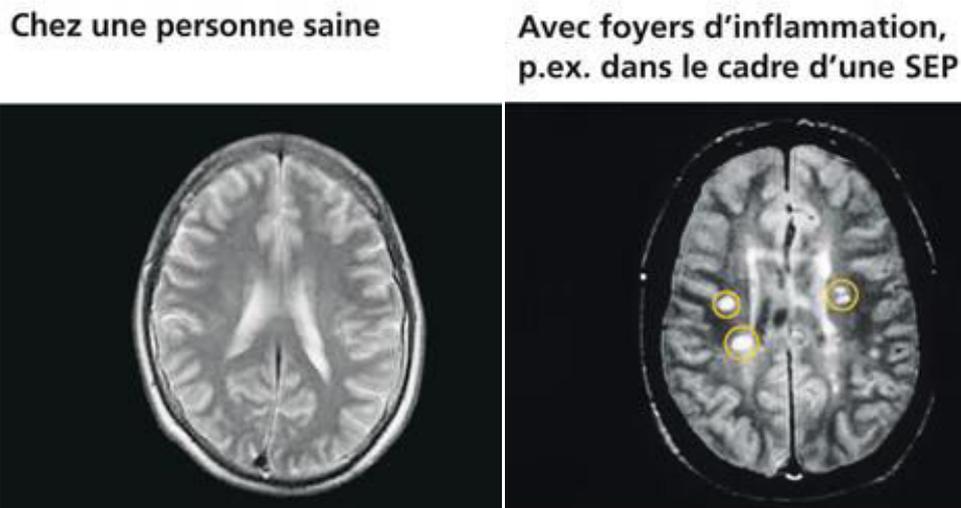


Fig. 3 : Visualisation des foyers d'inflammation dans le cerveau par IRM

Photo de gauche montre le cerveau d'une personne non atteinte par la maladie et la photo de droite représente la taille, le nombre et la répartition des lésions dans le cerveau d'une personne atteinte de sclérose en plaques (cercles).

D'après le site ms-diagnose.ch/fr/diagnostic/procedure-de-diagnostic (Bayer-AG)

I.2 Physiopathologie

La SEP est une maladie inflammatoire caractérisée par une infiltration lymphocytaire au niveau du SNC, provoquant des lésions à la fois de la myéline (démýélinisation) et des axones. La pathologie, inflammatoire et démýélinisante, détruit la substance blanche. La remýélinisation, spontanée ou non, permet d'atténuer les symptômes après une poussée. Cependant, au cours du temps, les lésions sont plus diffuses, se propagent sur les axones, principalement au niveau cortical, via une neurodégénérescence et une activation microgliale étendue. Cela se traduit cliniquement par l'aggravation des symptômes et l'installation progressive du handicap (Wu and Alvarez 2011; Lassmann et al. 2012; Dendrou et al. 2015; Mahad et al. 2015).

I.2.1 Les oligodendrocytes

Dans le SNC, les prolongements cytoplasmiques des oligodendrocytes s'enroulent autour des axones pour constituer la gaine de myéline (Fig. 4).

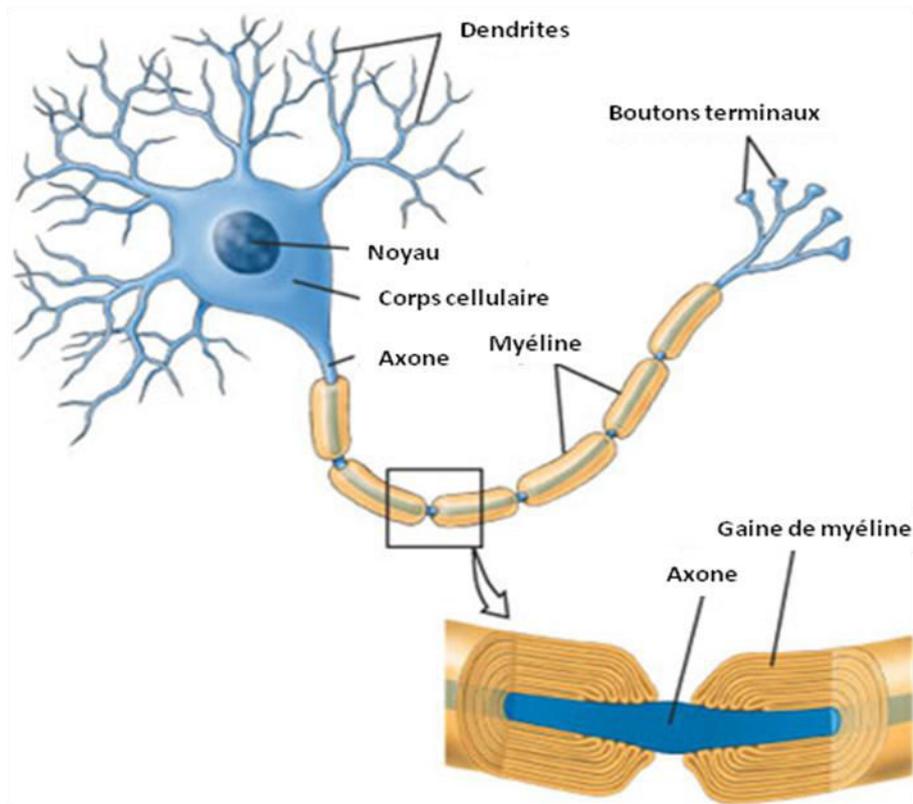
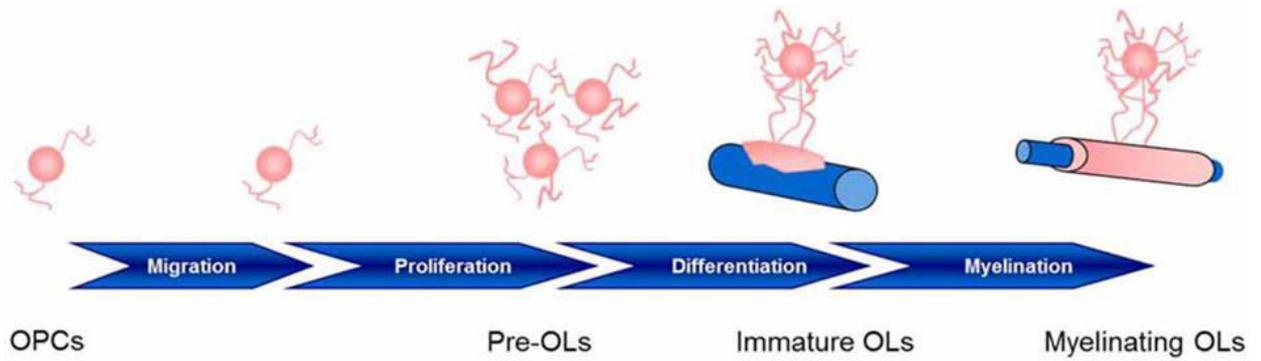


Fig. 4 : Structure d'un neurone

(Schéma provenant du site *Nieuw Unicum*)

Les oligodendrocytes sont le produit final d'une lignée cellulaire qui a subi une cascade d'étapes comprenant la prolifération, la migration, la différenciation et la myélinisation pour produire finalement la gaine isolante des axones (Marinelli et al. 2016). Pendant le développement embryonnaire, de nombreuses étapes sont nécessaires pour que les cellules évoluent du stade progéniteur, pré-oligodendrocyte puis oligodendrocyte immature, cellule qui a perdu sa capacité à se diviser (Fig.5). Cette étape est caractérisée par l'apparition du marqueur galactosylcéramide (GalC), lipide majoritaire de la myéline, ainsi que par la

synthèse d'une protéine myélinique, la (2'-3')-cyclique-nucléotide phosphodiesterase (CNPase). Enfin, d'oligodendrocyte immature, la cellule se transforme en oligodendrocyte mature non encore myélinisant. La dernière étape de maturation est caractérisée par l'apparition de nouvelles protéines myéliniques telles que la protéine basique de la myéline (MBP), la protéolipide protéine (PLP), la glycoprotéine associée à la myéline (MAG). Plusieurs études réalisées *in vitro* et *ex vivo* ont montré que leur apparition se fait de façon séquentielle au cours du développement (LeVine et al. 1990; Slavin et al. 1997; Liu et al. 2007; Fulton et al. 2010). Enfin, l'apparition de la glycoprotéine MOG (*myelin oligodendrocyte glycoprotein*) indique la dernière étape de la maturation oligodendrogliale et l'engagement de la cellule dans la voie de la myélinisation. L'étape ultime est l'élaboration de la gaine de myéline par enroulement des prolongements oligodendrogliaux autour de l'axone (Bradl and Lassmann 2010).



Differentiation markers:

PDGF-R α
A2B5
NG2
Olig1/2
Sox10

PDGF-R α
A2B5
NG2
O4
Olig1/2
Sox10

O4
Olig1/2
CNPase
GalC
Sox10

MBP
MAG
MOG
PLP
CNPase
O4
GalC
Olig1/2
Sox10

Fig.5 : Les différentes étapes de la maturation des oligodendrocytes

Des exemples de marqueurs de différenciation sont indiqués pour chaque étape.

Abréviations: OPC: Oligodendrocyte progenitor cells; OL: Oligodendrocyte

(Schéma de la publication de Marinelli (Marinelli et al. 2016))

I.2.2 La myéline

I.2.2.1 Structure et fonction de la myéline

La gaine de myéline se présente comme une structure lamellaire spiralée, régulièrement ordonnée. Elle forme une succession de manchons, encore appelés internodes (Fig. 6).

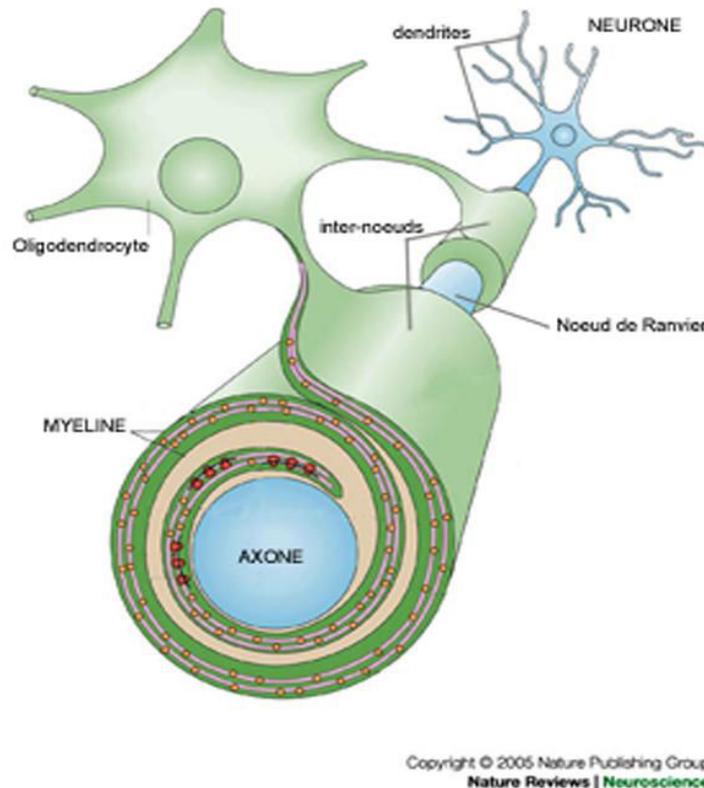


Fig.6 : Myélinisation d'un axone par l'oligodendrocyte

Schéma montrant l'enroulement de l'oligodendrocyte autour de l'axone.

La disposition périodique de la myéline résulte d'un phénomène complexe d'enroulement autour de l'axone et d'accolements de la membrane de la cellule myélinisante. Un oligodendrocyte myélinise en moyenne une quarantaine d'internodes qui sont situés sur des fibres nerveuses différentes dans le SNC. Les internodes adjacents sont séparés par les noeuds de Ranvier, zone dépourvue de myéline (Fig. 6). A cet endroit, la membrane de l'axone présente trois régions avec une organisation moléculaire différente. La région nodale très riche en canaux sodium, la région para-nodale où la myéline s'attachent fortement à l'axone grâce à des molécules d'adhérence et la région juxta-paranodale très riche en canaux potassium (Fig. 7).

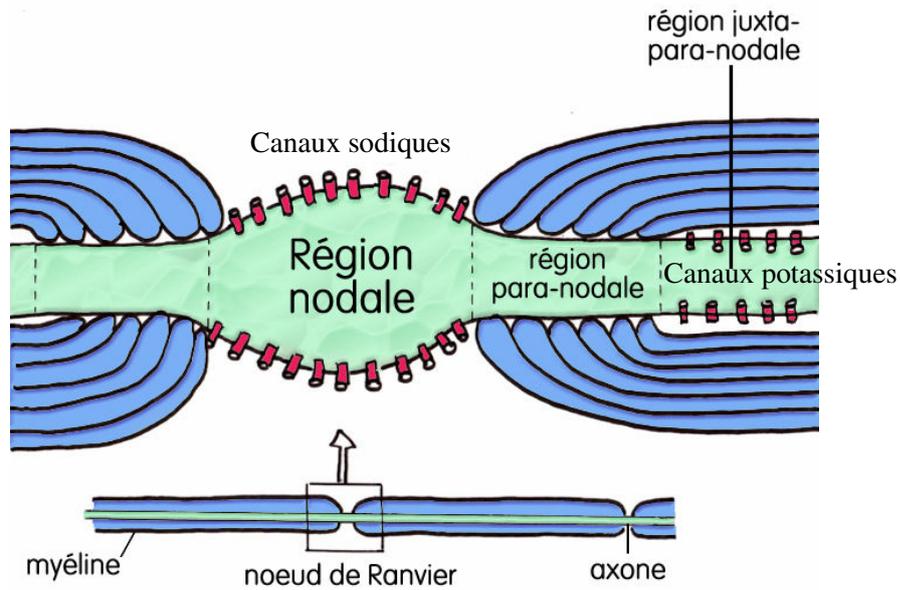


Fig.7 : Présentation d'un nœud de Ranvier qui permet la conduction de l'influx nerveux (figure du document " *Le système nerveux, central et périphérique : formation, fonction et rôle de Pr. Jacques POIRIER (Poirier ARSEP)*).

Zone de faible résistance électrique riche en canaux sodium, les nœuds de Ranvier représentent le secteur privilégié pour le déclenchement des potentiels d'action associés à la conduction de l'influx nerveux. Excellent isolant électrique, la gaine de myéline favorise la conduction nerveuse le long de l'axone de façon saltatoire d'un nœud de Ranvier à l'autre (Nelson and Jenkins 2017). La vitesse de la conduction nerveuse dépend du diamètre, donc de l'épaisseur, de la gaine de myéline. En effet, plus le diamètre est important, plus la gaine de myéline est épaisse et plus la vitesse de conduction est élevée. Donc, la myélinisation des axones accélère la conduction de l'influx nerveux (Griggs et al. 2017).

I.2.2.2 Les protéines de la myéline

Dans le SNC, la myéline contient 70% de lipides et 30% de protéines (Fig. 8).

La protéine protéolipidique (PLP) de 26,6 kDa est la plus abondante des protéines de la myéline dans le SNC. La PLP est codée par un gène de 17 kb hautement conservé au cours de l'évolution, localisé sur le chromosome X dans la bande Xq22. Ce gène comprend sept exons et l'épissage alternatif génère une deuxième protéine, DM-20 (LeVine et al. 1990; Sporkel et al. 2002). PLP, bien que peu active pendant le développement embryonnaire, est fortement exprimée dans les cellules myélinisantes matures. En revanche, DM-20 est exprimée plus tôt au cours du développement embryonnaire chez les progéniteurs neuronaux puis par les oligodendrocytes. Ensemble, PLP et DM-20 jouent un rôle important dans la régulation de la maturation des oligodendrocytes et du compactage de la myéline (Michalski et al. 2011).

La deuxième protéine la plus abondante de la myéline est la protéine basique de la myéline (MBP). Les isoformes classiques de MBP varient de 14 à 21,5 kDa, avec de nombreuses modifications post-traductionnelles, ce qui entraîne un protéome basique myélinique complexe, diversifié et dynamique. Dans le cerveau humain adulte, l'isoforme nominale de 18,5-kDa prédomine (Vassall et al. 2015). Elle est codée par un gène de 45 kb localisé sur le chromosome 18. La MBP est une protéine cytosolique, liée à la membrane plasmique. L'ARNm codant la MBP est transporté à proximité du cytoplasme de la gaine de myéline où la MBP est synthétisée par des ribosomes libres et incorporée rapidement dans la myéline (Griffiths et al. 1989). Il s'agit d'une protéine multifonctionnelle qui se lie à des lipides à charge négative sur les surfaces cytoplasmiques de la myéline et entraîne une adhérence pour maintenir l'assemblage compact de la gaine de myéline (Lang and Prayson 2016). Dans la séquence d'acides aminés de MBP, les techniques de résonance

paramagnétique électronique et de spectroscopie RMN ont révélé trois régions fortement amphipathiques pouvant former des hélices α . Ces régions, situées dans les parties centrales, N- et C-terminales de la protéine, favorisent les interactions de MBP avec les protéines du cytosquelette (Bamm et al. 2011). L'intérêt pour MBP est centré sur son rôle dans les maladies démyélinisantes, en particulier, dans la SEP (Meinl and Hohlfeld 2002).

La glycoprotéine MOG, protéine de 25 kDa, est uniquement exprimée à la surface des membranes des oligodendrocytes. Elle est codée par un gène de 60 kb localisé sur le chromosome 17. En raison de son expression tardive au cours du développement postnatal, MOG est un marqueur important de la maturation des oligodendrocytes (Peschl et al. 2017). Elle appartient à la superfamille des immunoglobulines. Cela fait de MOG une cible potentielle des réponses immunitaires cellulaires et humorales dans les maladies inflammatoires démyélinisantes.

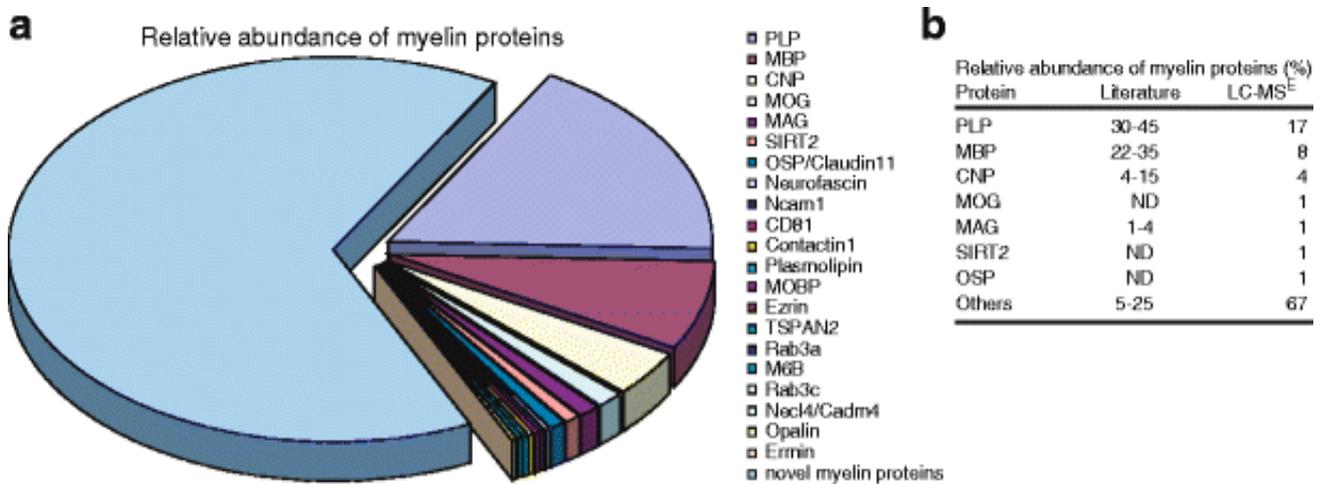


Fig.8 : Protéines de la myéline

Répartition relative des protéines de la myéline, exprimée en pourcentage.

(Jahn et al. 2009)

I.2.2.3 Les maladies de la myéline

Les maladies touchant la myéline sont nombreuses et variées. Ceci pourrait se justifier par la forte disparité de la nature et la proportion des protéines constitutives de la myéline du SNP et du SNC. En effet, ces différences pourraient expliquer que la myéline du SNC et celle du SNP soient l'objet de pathologies différentes (Herbert and Monk 2017). Pour autant, il est rare que les deux types de myélines soient atteintes (certains cas d'adrénoleucodystrophie). Il existe plusieurs types de pathologies : les pathologies dysmyélinisantes, la myéline n'est pas formée correctement (Chew and DeBoy 2016) et les pathologies démyélinisantes avec altération et/ou perte de la myéline (fig. 9). La pathologie dysmyélinisante de Pelizaeus-Merzbacher est une maladie rare du SNC causée par des mutations du gène responsable de la synthèse de la PLP (Osorio et al. 2017). D'autres pathologies de la myéline sont démyélinisantes. La gaine de myéline est détruite puis progressivement supprimée par l'action des cellules microgliales activées par les cytokines pro-inflammatoires sécrétées par les lymphocytes qui pénètrent dans le SNC en franchissant la barrière hémato-encéphalique (BHE) (Goldmann and Prinz 2013). Parmi les pathologies démyélinisantes, la SEP est la plus fréquente dans le SNC (Rahmlow and Kantarci 2013). La neuromyéélite optique est une maladie rare qui provoque une démyélinisation du SNC et qui atteint principalement la ME et les nerfs optiques (de Seze 2013; Trebst et al. 2014). La sclérose concentrique de Balo (BCS) est une maladie démyélinisante monophasique rare et sévère, considérée comme un sous-type de la SEP (Purohit et al. 2015). Les maladies de Charcot-Marie-Tooth (CMT) sont les maladies neurologiques héréditaires les plus fréquentes dans le SNP. Cette pathologie touche les nerfs périphériques qui entraînent principalement un manque de force musculaire, des troubles de la sensibilité des extrémités des membres, et des troubles de l'équilibre. Les individus souffrant de CMT ont une neuropathie motrice distale lentement progressive (Bird 1993).

SNC		SNP
Démyélinisation	Dysmyélinisation	Démyélinisation
- Sclérose en plaques (Rahmlow and Kantarci 2013)	- Maladie de Pelizaeus-Merzbacher (Osorio et al. 2017)	- Syndrôme de Guillain Barré (Mehndiratta and Gulati 2014)
- Neuromyéélite optique (de Seze 2013; Trebst et al. 2014)		- Maladie de Charcot-Marie-Tooth (Bird 1993)
- Sclérose concentrique de Baló (Purohit et al. 2015)		

Fig.9 : Tableau présentant les principales pathologies de la myéline du SNC et du SNP

I.2.2.4 Dommage axonal

La démyélinisation est souvent associée à un dommage axonal. C'est ce que l'on observe dans plusieurs pathologies comme la SEP, la maladie d'Alzheimer, ou la maladie de Parkinson (Stadelmann et al. 2011; Lingor et al. 2012; Simons et al. 2014; Barnett et al. 2016). La corrélation entre les dommages axonaux et la démyélinisation a été démontrée dans la SEP (Dutta and Trapp 2011; Haines et al. 2011). La perte de la myéline provoque la neurodégénérescence (Budde et al. 2008; Bankston et al. 2013; Alizadeh et al. 2015). En effet, dans le modèle EAE, la démyélinisation provoque à long terme un dommage axonal. Les lésions axonales, évaluées par la méthode d'imprégnation argentique de Bielschowsky, ont été observées dans les zones de démyélinisation de l'EAE alors qu'à l'inverse dans les zones sans démyélinisation, les lésions axonales sont beaucoup plus rares (Kornek et al. 2000). De plus, dans le modèle cuprizone, il a été montré, par une technique de coloration,

que lors de la phase de remyélinisation, il y a moins d'axones endommagés. La remyélinisation réduit l'incidence de la dégénération axonale (Irvine and Blakemore 2008) et constitue un effet protecteur des axones (Zendedel et al. 2013). Outre la perte de la myéline, d'autres facteurs peuvent conduire à des dommages axonaux. Parmi ces facteurs, des études ont montré que la dérégulation du transport mitochondrial, en perturbant le bilan énergétique des axones, entraîne une dégénérescence axonale dans des modèles de SEP (Su et al. 2009). De plus, les récentes techniques d'imagerie *in vivo* appliquées à un modèle de souris EAE, ont révélé des défauts fonctionnels dans les mitochondries intra-axonales, même avant la démyélinisation. Ce dysfonctionnement des mitochondries provoque un déséquilibre énergétique des axones qui pourrait être le facteur déclenchant de la phase dégénérative axo-gliaire. En effet, d'autres études, réalisées sur le modèle EAE, ont montré que les déficits mitochondriaux favorisent la génération des dérivés réactifs de l'oxygène (ROS) et de l'azote (RNS) conduisant à une perte de l'intégrité axonale (Lee et al. 2014).

I.2.2.5 Remyélinisation

Après une perte pathologique de la myéline, il est possible de reconstruire une nouvelle gaine de myéline autour des axones. Cette remyélinisation restaure la conduction nerveuse et exerce un rôle protecteur sur ces axones en empêchant leur dégénérescence, même si cette nouvelle gaine est moins épaisse et les internodes plus courts. Le mécanisme de remyélinisation est complexe et s'effectue en plusieurs étapes. La première étape concerne l'initiation du processus. En effet, la perte de la gaine de myéline déclenche la disparition des nœuds de Ranvier, il s'en suit une diffusion le long de l'axone dénudé de toutes les molécules localisées dans le nœud (canaux sodiques et potassiques, entre autres). Ces molécules doivent donc migrer pour venir se concentrer aux futurs emplacements des nœuds de Ranvier. C'est une étape clé du mécanisme de remyélinisation car tout manquement empêcherait la

réparation de la myéline (Podbielska et al. 2013). La deuxième étape concerne la mise en place des oligodendrocytes pour restaurer la gaine de myéline. Pour cela, les cellules précurseurs des oligodendrocytes prolifèrent et migrent vers la zone démyélinisée, puis les cellules se différencient en oligodendrocytes et reconstituent la gaine de myéline fonctionnelle en entourant l'axone (Munzel and Williams 2013; Khalaj et al. 2016). Dans la SEP, il est possible d'observer une remyélinisation spontanée des plaques soit dans leur totalité, soit, le plus souvent, de façon fragmentaire. C'est pourquoi la récupération fonctionnelle après une poussée peut être complète ou partielle, entraînant alors des séquelles. En effet, en absence de remyélinisation, les axones dégénèrent de façon irréversible et les troubles neurologiques s'aggravent. Dans cette maladie, le mécanisme de remyélinisation est extrêmement compliqué car non seulement les étapes citées plus haut doivent être respectées mais se rajoute l'intervention d'autres facteurs cellulaires et extracellulaires, comme par exemple les lymphocytes T régulateurs (Tregs) qui stimulent directement la remyélinisation indépendamment de l'immunomodulation. Effectivement, outre les oligodendrocytes, les cellules inflammatoires et les astrocytes jouent également un rôle dans le processus de remyélinisation (Miron 2017).

1.2.3 L'inflammation dans la SEP

La SEP est une maladie inflammatoire auto-immune caractérisée par une infiltration lymphocytaire au niveau du système nerveux central, ciblant des antigènes de la myéline et entraînant des lésions à la fois de la myéline et des axones.

Comme le montre la figure 10, l'inflammation s'effectue selon plusieurs étapes :

1. La première étape du processus est la présentation de l'antigène au lymphocyte T (LT) et la sortie du LT du ganglion lymphatique. Dans le cas de la SEP, l'antigène peut être une protéine de la myéline (maladie auto-immune) ou un facteur extérieur (virus, bactéries,...)

(Fujinami et al. 2006; Androutsou et al. 2017). Les lymphocytes T jouent un rôle essentiel puisqu'ils servent à protéger les cellules des agents pathogènes. En présence d'un agent pathogène, les lymphocytes T se multiplient et s'associent avec d'autres types de cellules pour éliminer l'antigène. Lors d'une réaction immunitaire, un LT naïf est activé par la reconnaissance d'un antigène via son récepteur antigénique de surface (ou TCR, T Cell Receptor). L'antigène est lié à des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I (lymphocyte de type CD8+) ou de classe II (lymphocyte de type CD4+). Ils sont exprimés à la surface des Cellules Présentatrices d'Antigènes (CPA).

2. Les deux étapes suivantes du processus sont la prolifération et la différenciation des LT. Selon les cytokines sécrétées par les CPA et le contexte inflammatoire, la différenciation des CD4+ leur permet de passer d'un état naïf mature vers différents stades de cellules T auxiliaires appelées aussi T helper (Th). Les LT CD4+ naïfs peuvent alors se différencier en 5 sous-types cellulaires, les lymphocytes Th1, Th2, Treg, TFH et Th17. Les lymphocytes Th1 et Th17 sont des stimulateurs de l'inflammation puisqu'ils produisent des cytokines pro-inflammatoires. En revanche, les lymphocytes Th2 et Treg inhibent l'inflammation, en libérant des cytokines anti-inflammatoires. Enfin les lymphocytes TFH (T Follicular Helper) sont utiles à la génération de la plupart des lymphocytes B mémoires.

3. Après activation, les lymphocytes T migrent à travers la BHE et se différencient dans le SNC. Il y a une infiltration massive de LT autoréactifs dans le SNC. Ces LT autoréactifs sont activées en périphérie par un processus qui implique une interaction entre les facteurs génétiques et environnementaux (voir paragraphes I.1.2.2. p. 32 et I.1.2.3. p.35).

4. L'activation des Th1 et des Th17 stimulent la production de cytokines pro-inflammatoires. Par exemple, Th1 sécrètent l'interféron γ (IFN- γ) alors que Th17 libèrent l'IL-17 (Dolati et al. 2017).

Dans la pathophysiologie de la SEP, il a été montré une différenciation préférentielle des lymphocytes T CD4+ vers les voies pro-inflammatoires Th1 et Th17 conjointement à un dysfonctionnement des mécanismes régulateurs impliquant les Treg (Han et al. 2016). De plus, le rôle des lymphocytes Th1 et Th17 a été montré dans de nombreuses publications. Ces cellules pro-inflammatoires sont présentes dans le cerveau des patients atteints de SEP (Grigoriadis et al. 2015). De plus, lors d'une rechute, la proportion de cellules Th17 est fortement augmentée dans le sang périphérique (Durelli et al. 2009; Muls et al. 2012). Par ailleurs, dans les modèles de souris EAE, l'administration d'anticorps monoclonaux contre IL-17 bloque le développement de la maladie montrant l'importance du rôle de IL-17 dans la pathologie (Hofstetter et al. 2005).

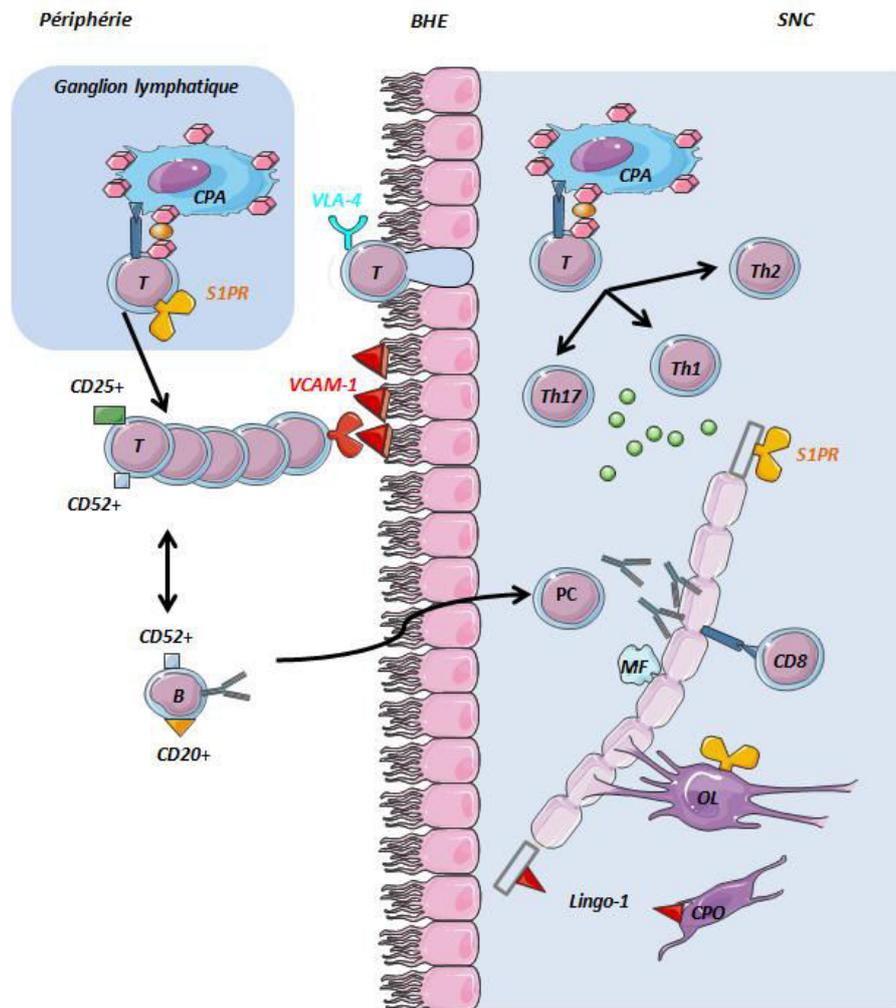


Fig. 10: Les grandes étapes de la physiopathologie de la SEP:

D'après Louapre (Louapre et al. 2013) (Schéma modifié)

1. présentation de l'antigène au lymphocyte T (LT) et la sortie du LT du ganglion lymphatique
2. prolifération des lymphocytes T
3. passage de la barrière hémato-encéphalique
4. activation des Th1 et Th17 - sécrétion de cytokines pro-inflammatoires
5. étape de remyélinisation et protection axonale

Abbréviations: CPA : cellule présentatrice d'antigènes; OG : oligodendrocyte; CPO : cellule précurseur d'oligodendrocyte; BHE : barrière hémato-encéphalique; S1PR : récepteur de la sphingosine 1-phosphate; SNC : système nerveux central; Mab : monoclonal antibody.

I.3 Les traitements actuels

A ce jour, il n'existe aucun traitement curatif de la SEP, les seuls médicaments prescrits traitent la partie inflammatoire de la pathologie. Ils ne guérissent pas, ils ralentissent l'évolution de la pathologie. Il s'agit principalement d'immunomodulateurs et d'immunosuppresseurs (Aharoni 2010; Stankiewicz et al. 2013; Gajofatto and Benedetti 2015). Ces derniers sont des agents qui ciblent la prolifération des cellules immunitaires. Ils sont recommandés en traitement de fond ou au moment des poussées. Plus efficaces que les immunomodulateurs, ils sont utilisés pour les formes les plus graves de la SEP. Ils agissent au niveau inflammatoire ce qui permet de diminuer les poussées. Cependant, ils n'ont aucun effet ni sur la neurodégénérescence, ni sur le handicap qui s'installe au cours du temps. Dans la plupart des cas, les médecins sont obligés de limiter leur administration suite aux nombreux effets secondaires de ces médicaments et le risque élevé de développer un cancer probablement en raison d'une immunodéficience (Weiner 2004; Stankiewicz et al. 2013; Gaindh et al. 2016; Grigoriadis et al. 2016). Les immunomodulateurs, les premiers utilisés, sont aussi administrés en traitement de fond notamment pour les personnes développant la forme rémittente récurrente de la pathologie. Ils produisent également de nombreux effets secondaires propres à chaque immunomodulateurs, comme par exemple l'interféron beta qui peut conduire à des syndromes pseudo-grippaux (Filipi et al. 2014). Par ailleurs, le patient peut développer des douleurs au site d'injection du traitement (Lebrun et al. 2011).

Pour traiter les poussées, les médecins prescrivent principalement des anti-inflammatoires (Corticoïdes) comme par exemple le solu-médrol[®] (Martinez-Caceres et al. 2002). Les corticoïdes agissent principalement par des effets génomiques (récepteur nucléaire aux glucocorticoïdes) pour réprimer la synthèse des cytokines pro-inflammatoires et stimuler celles des cytokines anti-inflammatoires (Guyre et al. 1988; Kaiser 2003). S'ajoutent à cela des traitements symptomatiques, conseillés pour améliorer la qualité de vie des patients, par

exemple pour soulager la douleur ou pour remédier à la fatigue chronique qui peut s'installer dès le début de la maladie.

I.3.1 Exemples d'immunomodulateurs

I.3.1.1 l'Interféron bêta

L'interféron bêta (IFN- β) est un polypeptide naturel produit principalement par les fibroblastes. Les interférons sont des cytokines ayant une activité antivirale, immunomodulatrice et antiproliférative. Ses effets anti-inflammatoires résultent de l'inhibition de la prolifération des lymphocytes T et d'une réduction de la migration des cellules inflammatoires à travers la BHE (Lopez De Padilla et al. 2015). L'IFN- β a prouvé son efficacité dans de nombreux essais cliniques. En 1995, cette molécule obtient une autorisation de mise sur le marché (AMM) pour 3 formulations différentes d'IFN- β dont le premier à obtenir l'AMM est le Bêtaféron® (IFN- β -1b). La dose recommandée est de 8 MUI (millions d'unités internationales), injectée tous les deux jours par voie sous-cutanée. L'Avonex® et le Rebif® (IFN- β -1a) sont également prescrits et utilisés par voie intramusculaire et sous-cutanée, respectivement (Marziniak and Meuth 2014). Des essais cliniques de phase III, ont montré que les différentes formes d'IFN- β diminuent les poussées d'environ 30% (Prisms_Study_Group et al. 2001). Plus récemment, une étude a révélé que l'IFN- β -1a pégylé (pegIFN β -1a, Plegridy®) réduit le taux de rechute de 36% chez les patients ayant la forme rémittente récurrente de la SEP (Calabresi et al. 2014). Cependant, les effets secondaires sont lourds et nombreux, symptômes grippal, douleurs musculaires, maux de tête et de dos, qui obligent les patients à une surveillance intense et périodique portant encore atteinte à leur qualité de vie (Torkildsen et al. 2016).

I.3.1.2 l'Acétate de Glatiramer

L'acétate de Glatiramer (Copaxone[®]) est un ensemble de peptides synthétiques, ressemblant à des séquences de protéines basiques de la myéline. Bien que les mécanismes d'action de l'acétate de Glatiramère ne soient pas entièrement clarifiés, ce composé agit comme un anti-inflammatoire. Testé dans la forme rémittente récurrente, le traitement montre une réduction significative du taux de rechute d'environ 30% (Johnson et al. 1995; Weinstock-Guttman et al. 2017). Bien qu'il soit relativement bien toléré par les patients, l'acétate de Glatiramer provoque également des effets secondaires (Torkildsen et al. 2016).

I.3.2 Exemples d'immunosuppresseurs

En cas d'échec du traitement immunomodulateur, c'est-à-dire persistance et/ou réapparition des poussées avec apparition de nouvelles lésions sur l'IRM, une médication plus agressive est proposée aux patients. Actuellement les traitements les plus disponibles sont le Fingolimod (Gilenya[®]) et le Natalizumab (Tysabri[®]).

I.3.2.1 Le Fingolimod

Le fingolimod est un modulateur du récepteur de la sphingosine 1-phosphate (S1PR). Il se lie avec une forte affinité au S1PR, ce qui provoque une dégradation du récepteur dans différents tissus et types de cellules, y compris les lymphocytes. En conséquence, le fingolimod inhibe la capacité des lymphocytes autoréactifs à sortir des ganglions lymphatiques et franchir la BHE vers le SNC. Des essais cliniques de phase III ont montré chez les patients développant la forme rémittente récurrente (RR-MS) que le fingolimod

réduit le taux de rechute de 48% à 55% (Kappos et al. 2010). Comme les autres médicaments, le fingolimod produits des effets indésirables. Parmi les plus courants, infection des voies respiratoires, maux de tête, toux, diarrhée et maux de dos sont les plus décrits (Calabresi et al. 2014; Torkildsen et al. 2016).

I.3.2.2 Le Natalizumab

Le natalizumab est un anticorps monoclonal dirigé contre l'intégrine $\alpha 4$, bloquant l'interaction avec ses ligands. Le mécanisme d'action est principalement d'empêcher l'adhérence des leucocytes activés à l'endothélium inflammé, ce qui inhibe la migration des cellules inflammatoires dans le SNC (Bornsen et al. 2012). L'essai clinique de phase III réalisé dans la forme rémittente récurrente a montré que la natalizumab réduisait le taux de rechute de 68% (Polman et al. 2006). Bien que le natalizumab soit généralement bien toléré, le traitement est associé à un risque de développer une leucoencéphalopathie multifocale progressive (infection des oligodendrocytes) provoquant une démyélinisation (Torkildsen et al. 2016).

I.4 Pistes thérapeutiques actuellement explorées

I.4.1 Thérapie génique

Plusieurs études, réalisées dans le modèle de souris EAE, décrivent un certain niveau d'efficacité de la thérapie génique dans la médication de la maladie. Il existe plusieurs stratégies de thérapie génique pour le traitement des maladies auto-immunes. Toutefois, la plus couramment utilisée est le vaccin à ADN codant des antigènes spécifiques. Dans un modèle rémittent récurrent d'EAE, l'injection d'ADN plasmidique codant l'INF- β a entraîné

une amélioration significative des symptômes (Schaefer et al. 2006). Des études similaires ont été réalisées dans la forme progressive d'EAE. L'administration intrathécale d'ADN plasmidique codant une protéine de fusion immunomodulatrice, OX40-TRAIL (OX40, récepteur du facteur de nécrose tumorale, et TRAIL, ligand induisant l'apoptose associé au facteur de nécrose tumorale), a montré une diminution de la gravité de la maladie (Yellayi et al. 2011). Plus récemment, une étude a évalué l'effet d'un vaccin génétique contenant le gène mycobactérien hsp65 sur le développement de l'EAE. Dans la pathologie, les protéines hsp sont la cible d'une réponse immunitaire car ces protéines possèdent un potentiel immunorégulateur. Les souris recevant pVAXhsp65 ont des scores cliniques significativement plus faibles et perdent moins de poids que les souris EAE. De plus, la vaccination avec pVAXhsp65 a également permis une augmentation de la production de la cytokine anti-inflammatoire IL-10 dans le SNC (Zorzella-Pezavento et al. 2017).

Cependant, malgré ces résultats, la thérapie génique n'est pas encore à l'ordre du jour pour traiter la SEP.

I.4.2 Implantation de cellules souches

L'implantation des cellules souches pour traiter la SEP suscite un grand intérêt scientifique. Cette perspective thérapeutique est encore au stade expérimentale, aucune thérapie par implantation de cellules souches n'est disponible pour les patients SEP. Par contre, plusieurs publications scientifiques montrent des résultats encourageants (Morando et al. 2012; Dulamea 2015; Bakhuraysah et al. 2016; Meamar et al. 2016). La thérapie par cellules souches consiste soit à transplanter des cellules souches, soit à cibler les cellules souches présentes dans l'organisme et qui sont dysfonctionnelles. Différentes sortes de cellules souches ont montré un effet bénéfique dans des modèles animaux d'EAE. Par exemple, les cellules souches hématopoïétiques (HSC), déjà utilisées pour traiter les

leucémies, les lymphomes et plusieurs maladies héréditaires du sang, sont actuellement testées dans les formes très actives de SEP. Les HSC pourraient prévenir la dégradation de la myéline en modifiant certaines fonctions du système immunitaire (immunomodulation) (Bakhuraysah et al. 2016).

Les cellules souches mésenchymateuses (MSCs) présentent des effets anti-prolifératifs, anti-inflammatoires et anti-apoptotiques sur les neurones. Par conséquent, elles ont été testées avec succès dans le modèle EAE. En effet, les MSCs inhibent les fonctions des cellules T autoréactives et cette immunomodulation est neuroprotectrice. De plus, l'administration intraveineuse des cellules MSCs améliore les symptômes cliniques en diminuant l'inflammation et en empêchant la démyélinisation et la perte axonale au niveau du SNC (Al Jumah and Abumaree 2012; Castro-Manrreza and Montesinos 2015). Une autre étude a montré que les cellules MSCs bloquent l'infiltration des cellules T CD3+ et des macrophages dans le SNC (Zappia et al. 2005).

Les cellules souches neurales (NSCs) sont responsables de la remyélinisation dans le cerveau. Les NSCs semblent être non fonctionnelles chez les personnes atteintes de SEP, il y a donc absence de régénération de la myéline et lésions axonales. La transplantation des NSCs pourraient être testées dans la SEP dans un avenir proche. On pense que ces cellules peuvent avoir à la fois un effet immunomodulateur et un effet direct sur la remyélinisation. Les NSCs sont naturellement présentes dans le cerveau, mais en raison des difficultés pour les obtenir, ce sont des cellules souches foetales qui sont actuellement utilisées dans les études *in vivo*. Les cellules précurseurs neuronales peuvent induire des effets bénéfiques dans la SEP, dû à leur potentiel de régénération, leurs propriétés trophiques, immunomodulatrices et neuroprotectrices (Meamar et al. 2016). Certains types de cellules souches, comme par exemple les cellules souches mésenchymateuses font l'objet d'essais cliniques (Dulamea 2015; Xie et al. 2016).

II LES MODELES ANIMAUX

L'étude de la SEP, comme d'autres types de pathologie, nécessite l'utilisation de modèles expérimentaux animaux. Plusieurs stratégies ont été mises en place pour favoriser le déclenchement chez l'animal des symptômes caractéristiques de ceux observés chez l'Homme. Ainsi, plusieurs pistes permettent de stimuler le déclenchement des symptômes. Le modèle le plus utilisé est réalisé par l'immunisation de l'animal par un agent pathogène, il s'agit du modèle de l'encéphalomyélite autoimmune expérimentale (EAE). Les modèles de SEP peuvent aussi être obtenus par injection de toxines (cuprizone) ou de virus ou par modifications géniques (modèles transgéniques).

II.1 L'Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE)

II.1.1 L'historique

Au début du XXème siècle, la SEP est présentée comme une complication «allergique» observée chez les individus ayant reçu le vaccin antirabique de Pasteur. Décrite comme une encéphalomyélite aiguë disséminée (ADE), elle se caractérisait par une paralysie monophasique, des infiltrations périvasculaires de cellules mononucléées et des foyers de démyélinisation dans le SNC (Stuart and Krikorian 1928). Des préparations de moelle épinière (ME) provenant de lapins ou d'êtres humains pouvaient induire l'ADE lorsqu'elles étaient transférées à d'autres lapins. Il avait donc été spéculé que le tissu du SNC et non pas le vaccin antirabique était responsable de la paralysie observée. L'introduction des adjuvants a permis d'induire pour la première fois et de manière reproductible l'encéphalomyélite autoimmune expérimentale dans des modèles animaux (Kabat 1947). Depuis, l'EAE a été induite avec succès dans un grand nombre d'espèces animales comprenant la souris, le rat, le

cochon d'Inde, le lapin, le poulet, la chèvre et le singe (Paterson 1976) et représente donc le modèle auto-immun préférentiel de la SEP (Steinman 1999).

Aujourd'hui, l'EAE peut être induite de différentes façons, par immunisation avec des extraits de SNC ou des antigènes purifiés administrés sous forme d'émulsion avec un adjuvant (EAE active); par transferts de LT auto-réactifs activés *in vitro* ou issus d'un animal malade à des individus naïfs (EAE passive) (Schroeter et al. 2003). La démyélinisation et les épisodes de paralysie sont associés à l'infiltrat des lymphocytes T CD4+ de type Th1 au niveau du SNC (Fletcher et al. 2010).

II.1.2 Généralités

Il faut savoir qu'aucun modèle d'EAE ne mime pas à lui seul toutes les caractéristiques de la maladie humaine. En effet, selon les souches animales et le mode d'induction, l'encéphalomyélite présente une démyélinisation, une atteinte axonale et une évolution variable (Kipp et al. 2017). Cependant, les principales caractéristiques de la maladie sont communes entre le modèle animal et la pathologie humaine. En effet, la destruction de la gaine de myéline des fibres nerveuses et les lésions du SNC, plus prononcées dans le tronc cérébral et la ME, apparaissent au même stade de la pathologie. De même, la maturation temporelle des lésions, de l'inflammation à la démyélinisation puis la remyélinisation partielle et la présence d'immunoglobulines dans le SNC et dans le LCR, est semblable entre la SEP et l'EAE (Baxter 2007).

L'intérêt des modèles EAE est de décrypter des mécanismes cellulaires lésionnels et pathologiques de l'auto-immunité difficilement observables chez l'Homme. Par exemple, le phénomène d' "épitope spreading" a pu être révélé dans le modèle de souris SJL/J RJ immunisée avec le peptide PLP₁₃₉₋₁₅₁. Cela signifie que les épitopes reconnus par les LT changent à chaque événement de poussée induisant ainsi une modification des réactivités. Par

exemple, lors de la deuxième poussée de la maladie, l'épitope reconnu est PLP₁₇₈₋₁₉₁ alors qu'à la troisième poussée l'épitope provient d'une autre protéine de la myéline MBP₈₄₋₁₀₄. La caractérisation des bases cellulaires et moléculaires de l'épitope est extrêmement importante à la fois pour comprendre la pathogenèse de ces maladies et pour atteindre l'objectif ultime de concevoir des traitements spécifiques à l'antigène pour les maladies auto-immunes humaines. Plusieurs chercheurs ont caractérisé un ordre hiérarchique de propagation d'épitopes dans différents modèles EAE et ont montré un rôle pathologique de ce processus dans la forme progressive (Vanderlugt and Miller 2002).

Afin d'appréhender les mécanismes moléculaires mis en jeu au cours du développement de la SEP, les modèles EAE ont aussi été associés à l'utilisation d'animaux transgéniques. Les souris transgéniques surexprimant l'IL-10 deviennent résistante à l'induction de l'EAE (Bettelli et al. 1998; Cua et al. 1999) alors que les souris KO pour le gène de l'IFN- γ développent une forte sensibilité à l'EAE (Ferber et al. 1996; Teige et al. 2003). Les souris transgéniques qui produisent trop de TNF- α ont une aggravation de la démyélinisation (McCoy and Tansey 2008). Les souris transgéniques dont la majorité des TCR spécifique de la protéine basique de la myéline (MBP), développent spontanément la maladie (Goverman et al. 1993). Les études réalisées par injection de lymphocytes T auto-réactifs contre des antigènes de la myéline ont permis de montrer leur implication dans l'induction des encéphalomyélites, étayant ainsi le concept d'auto-immunité évoqué dans la SEP (Steinman and Zamvil 2006).

Grâce aux modèles EAE, de nouveaux traitements comme l'acétate de glatiramère ont pu accompagner les patients. En revanche, certaines molécules, efficaces dans le modèle EAE ont eu des effets délétères chez l'homme comme l'anti TNF- α (Constantinescu et al. 2011). Toutefois, le modèle EAE reste un modèle de choix pour tester de nouvelles molécules.

II.1.3 Immunisation des animaux

L'immunisation des animaux, pour induire une EAE, se fait par injection sous cutanée d'une émulsion contenant l'adjuvant complet de Freund (Adjuvant incomplet de Freund et *Mycobacterium tuberculosis*) et le peptide choisi. Le plus souvent deux points d'injections sont réalisés. Ensuite, le protocole prévoit une injection intra péritonéale de Pertussis Toxine (PT), réinjectée en rappel 24 ou 48h après la primo-injection (Miller et al. 2010; Bittner et al. 2014).

Divers adjuvants sont aussi décrits pour doper le système immunitaire. Néanmoins, l'adjuvant complet de Freund est le plus couramment utilisé puisqu'il permet une libération prolongée de l'antigène dans l'organisme, une augmentation des réponses immunes en élevant le niveau de maturation des CPA.

La PT, quand à elle, est un produit microbien qui favorise l'EAE en ouvrant la BHE et facilite ainsi la migration des cellules T pathogènes vers le SNC. Cependant, la PT possède d'autres effets biologiques qui pourraient également contribuer à son activité dans l'EAE, comme l'amélioration de la production de cytokines par les lymphocytes T et l'induction de la lymphocytose (Hofstetter et al. 2002).

II.1.4 Le modèle EAE induit par les peptides PLP-MOG ou MBP

L'EAE peut être induite par plusieurs antigènes de la substance blanche du SNC. Les deux protéines de la myéline les plus abondantes étant PLP et MBP (environ 50% et 25% respectivement) ont donc été les premiers antigènes encéphalitogènes à être identifiés (Folch and Lees 1951; Einstein et al. 1962; Robinson et al. 2014). La protéine MOG a aussi été identifiée comme encéphalithogène même si elle ne représente que 0.01 à 0.05% des protéines constitutives de la myéline (Mendel et al. 1995). Ces antigènes ne diffèrent pas seulement par

leur représentation mais aussi par leur localisation dans la gaine de myéline (Fig. 11). MBP est localisée sur la face interne de la membrane plasmique, PLP est intégralement membranaire dans la partie internodale compacte et MOG se situe sur la face externe de la membrane plasmique et est donc en contact directe avec le milieu extracellulaire (Linington et al. 1988; Morell and Quarles 1999). Au cours du processus de démyélinisation, l'intégrité de la gaine de myéline est perturbée et l'antigène PLP peut être exposé.

Les modèles d'EAE les plus développés l'ont été chez le rat et la souris mais nous nous focaliserons sur le modèle EAE chez la souris. En fonction de l'antigène choisi et la souche de souris utilisée pour induire l'EAE, trois formes cliniques distincts d'EAE peuvent se développer, aiguë, chronique ou récurrente-rémittente (Constantinescu et al. 2011). La forme aiguë est obtenue par immunisation avec le peptide MPB₁₋₁₁ des souris portant le locus CMH-H-2u. Ces animaux présentent une paralysie qui disparaît peu à peu avec le temps pour retrouver l'usage complet ou partiel de leurs membres postérieurs (Zamvil et al. 1986). La maladie chronique est obtenue par immunisation des souris C57BL/6J (H-2b) avec le peptide MOG₃₅₋₅₅. La condition des animaux s'aggrave progressivement après les premiers signes cliniques de paralysie sans amélioration possible (Mendel et al. 1995; Bittner et al. 2014). La forme récurrente-rémittente est observée chez les souris SJL/J RJ immunisées avec le peptide PLP₁₃₉₋₁₅₁ (Tuohy et al. 1989). Quelle que soit la forme de l'EAE considérée, les symptômes cliniques sont similaires et classés sur une échelle de 0 à 10 (voir tableau 1 dans la partie Matériels et Méthodes, p.105). Brièvement, aucun symptôme visible représente le stade 0, les premiers signes de paralysie sont observés au niveau de la queue (stade 2), le grade augmente avec l'évolution de la paralysie. Au stade 5, les membres postérieurs sont entièrement paralysés, au stade 8 tous les membres sont atteints et le stade 10 est l'état moribond de la souris (Bittner et al. 2014).

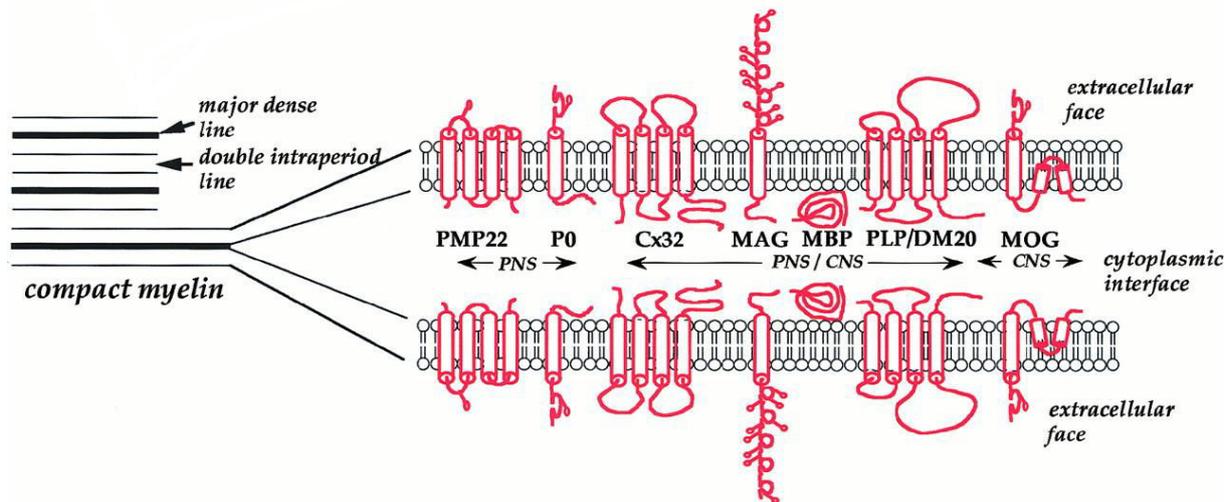


Fig. 11: Localisation de quelques protéines de la myéline

(Baumann and Pham-Dinh 2001)

Abbréviations: PNS: peripheral nervous system; CNS: central nervous system; PMP22: peripheral myelin protein 22; P0: myelin protein zero; MAG: myelin-associated glycoprotein; MBP: myelin basic protein; PLP: Myelin proteolipid protein; MOG: myelin oligodendrocyte glycoprotein.

II.1.4.1 La souris SJL/J RJ

La souris SJL/J Rj est couramment utilisée pour étudier le modèle récurrent-rémittent de l'EAE induit par le peptide PLP. L'immunisation se fait majoritairement chez l'animal entre 8 et 12 semaines. Cette lignée a été produite à partir de 3 sources différentes de souris SWISS Webster et développée par Jackson Laboratory dans les années 1950 par accouplement frère-sœur. Les souris SJL/J RJ se caractérisent par une extrême agressivité des mâles et une forte sensibilité à l'EAE. Cette sensibilité peut s'expliquer par le fait que les souris SJL/J RJ sont immunocompétentes c'est-à-dire qu'elles présentent une diminution de l'activité des cellules NK ("Natural Killer") et un taux élevé de cellules T (Spindler et al. 2001). Par ailleurs, ces animaux possèdent une mutation dans le gène de la dysferline

favorisant l'apparition spontanée d'une myopathie. En effet, la mutation du gène entraîne une diminution du taux de la protéine dysferline présente dans la membrane musculaire. De ce fait, cette lignée est également un bon modèle pour étudier la myopathie liée à un déficit de la dystrophie. La faiblesse musculaire peut être détectée dès l'âge de 3 semaines mais le pic de la pathologie se situe à l'âge de 6 mois (Rayavarapu et al. 2010).

II.1.4.2 La souris C57BL/6J

La souris C57BL/6J permet d'étudier le modèle chronique de l'EAE induit par le peptide MOG. L'immunisation se fait majoritairement chez l'animal entre 8 et 12 semaines. Cette souche est couramment utilisée surtout dans les modèles transgéniques car elle permet l'expression d'un grand nombre de mutations. Outre sa sensibilité à l'EAE, les souris C57BL/6J présentent aussi une réceptivité aux régimes alimentaires d'induction au diabète de type II et à l'athérosclérose (Parekh et al. 1998; Whitman 2004). La dépilation, une autre caractéristique de ces souris, est attribuée à des phénomènes comportementaux de type overgrooming/barbering (JAX-Notes. 1987; Sundberg et al. 2011) ou à un comportement anormal de type TOC (Proietti Onori et al. 2014). Bien que cette lignée soit très active et assez agressive, les souris sont toutefois faciles à manipuler. Cette souche possède une longue espérance de vie (environ 2 ans) qui permet son utilisation dans les études sur le vieillissement et la maladie d'Alzheimer.

II.1.5 Le modèle EAE induit chez la souris Biozzi

Guido Biozzi a créé une lignée de souris sélectionnées pour produire des hautes (ABH) ou des faibles (ABL) quantités d'anticorps en réponse à différents antigènes (originellement des érythrocytes de mouton) à partir de populations de souris Swiss albinos

(Biozzi et al. 1972). Ainsi, les deux lignées ont été considérées comme idéales pour comprendre les facteurs qui contrôlent la résistance ou la susceptibilité aux infections. Des lignées consanguines de ces souris ont ensuite été générées (Baker et al. 1990). En ce qui concerne les affections polygéniques, les souris Biozzi ABH sont sensibles à une gamme de maladies induites expérimentalement, y compris les maladies neurologiques auto-immunes. De ce fait, plusieurs modèles expérimentaux de SEP sont possibles en utilisant la souris Biozzi. Par exemple, la forme récurrente-rémittente peut être obtenue par immunisation des souris avec le peptide PLP₁₃₉₋₁₅₁, comme dans d'autres lignées, et plus spécifiquement avec le peptide MOG₈₋₂₁ (Amor et al. 2005). L'immunisation avec le fragment MOG₃₃₋₅₅ conduit à la forme chronique de l'EAE, développée aussi dans d'autres lignées. Dans tous les cas, l'immunisation entraîne une démyélinisation sévère et une infiltration des lymphocytes dans le SNC (rupture de la BHE) (McCarthy et al. 2012). La souris Biozzi entre donc dans le cadre des modèles animaux prometteurs pour développer des stratégies thérapeutiques pour les patients, en particulier ceux atteints de SEP.

II.1.6 Limites et avantages du modèle EAE

Ce modèle présente des limites puisque certaines molécules prometteuses dans l'EAE n'ont eu aucun impact bénéfique en clinique voire même des effets délétères. Par exemple, au début des années 1990, une équipe a montré l'efficacité de la déoxyspergualine, un xénobiotique avec des propriétés immunosuppressives, dans le modèle EAE (Schorlemmer and Seiler 1991). Cependant, lorsque cette molécule a été appliquée à un essai clinique chez des patients SEP, le traitement a été inefficace (Bashir and Whitaker 1998; Constantinescu et al. 2011).

L'EAE est initiée par immunisation avec des antigènes présentés aux cellules Th CD4+, ce qui permet d'étudier le développement des cellules Th, les fonctions effectrices et la

signalisation médiée par les lymphocytes T *in vivo*. En effet, les cellules Th1 et Th17 sont toutes deux présentes dans le SNC des souris EAE, même si leur proportion diffère entre les différentes souches de souris (Langrish et al. 2005; Korn et al. 2007). Cependant, il a été montré que les cytokines produites par les cellules Th17, comme IL-17A, IL-17F ou encore IL-22 ne sont pas requises pour l'induction de l'EAE, tout comme les cytokines Th1 comme, IL-12, TNF- α alors que leur implication dans le développement de la SEP est bien connue (Willenborg et al. 1996; Frei et al. 1997; Becher et al. 2002; Kebir et al. 2007). Les contributions exactes des différentes cytokines peuvent varier entre la pathologie humaine et l'EAE, et de ce fait les molécules potentielles testées dans le modèle EAE et jouant un rôle sur l'inflammation peuvent être efficaces dans le modèle animal et pas en clinique humaine. La SEP est une pathologie avec de multiples facettes, qui est difficilement explicable avec un seul modèle expérimental (Robinson et al. 2014).

Toutefois, le modèle EAE est un modèle exploratoire intéressant et très utilisé pour la recherche préclinique. En effet, il a permis de révéler des médicaments utilisables en clinique, comme l'interféron bêta ou encore le natalizumab (Constantinescu et al. 2011; Kappos et al. 2013; Marziniak and Meuth 2014; Robinson et al. 2014). Rappelons que ce modèle animal permet de mimer les différentes formes de la pathologie en fonction de l'antigène choisi et la souche de souris utilisée pour induire l'EAE. C'est un modèle qui mime tous les symptômes observés chez l'Homme. En effet, la composante inflammatoire est présente dans le modèle EAE ainsi que la phase de neurodégénérescence puisqu'une démyélinisation et des dommages axonaux sont observés chez les souris EAE (Daugherty et al. 2013; Moore et al. 2014). C'est un modèle très représentatif de la physiopathologie de la SEP chez l'humain. C'est pourquoi il s'agit d'un modèle très répandu en recherche pré-clinique.

II.2 Le modèle cuprizone

Parmi les modèles de SEP induits par les toxines, le plus couramment utilisé est celui de la cuprizone, agent chélatant du cuivre. Ce modèle est particulièrement adapté pour étudier les mécanismes de remyélinisation (Torkildsen et al. 2008; Praet et al. 2014; Vega-Riquer et al. 2017). La cuprizone est administrée par voie orale à des souris d'une souche sensible C57BL/6J pendant 4 à 6 semaines ce qui induit des lésions dans le cerveau accompagnées d'un œdème, d'une hydrocéphalie, d'une démyélinisation et d'astrogliose. La cuprizone provoque un dysfonctionnement du complexe mitochondrial IV avec une toxicité sélective pour les oligodendrocytes. A partir de la 3^{ème} semaine de traitement d'administration de cuprizone, les oligodendrocytes présents dans le corps calleux et l'hippocampe dégénèrent. Dès l'arrêt de la cuprizone, le processus de remyélinisation commence. Ce modèle donne donc un aperçu du mécanisme d'apoptose des oligodendrocytes et de la remyélinisation (Ransohoff 2012).

Le modèle de démyélinisation induite par la cuprizone a suscité un intérêt croissant pendant la dernière décennie car ce modèle procure un système reproductible d'apoptose primaire des oligodendrocytes et de démyélinisation secondaire (Skripuletz et al. 2011; Praet et al. 2014). L'administration de cuprizone induit des perturbations métaboliques dans les oligodendrocytes qui conduisent à l'apoptose de ces cellules (Gudi et al. 2014). Des études récentes révèlent que la démyélinisation intervient dans le corps calleux, l'hippocampe, le cervelet et même dans le cortex. Après six semaines d'exposition au traitement, la démyélinisation est suivie d'une remyélinisation spontanée et complète. Cependant, si le traitement à la cuprizone est prolongé, la remyélinisation peut être incomplète ou même ne plus se produire (Praet et al. 2014). Le modèle cuprizone est donc approprié pour étudier les mécanismes de la démyélinisation aiguë et chronique et les processus impliqués dans la remyélinisation (Péter 2012).

De nombreuses molécules sont actuellement testées dans ce modèle afin d'essayer de contrecarrer les effets de la SEP, comme par exemple la myricétine, ou encore un anticorps monoclonal recombinant humain rHlgM22 (Zhang et al. 2016; Komegae et al. 2017; Mullin et al. 2017).

Toutefois ce modèle n'est pas complet car il n'est pas spécifique des caractéristiques inflammatoires de la pathologie. Ce modèle permet surtout d'étudier les phases de démyélinisation et remyélinisation qu'on retrouve dans la SEP.

II.3 Les autres modèles

II.3.1 Les modèles transgéniques

Le développement des techniques de clonage des LT et de transgénèse a permis de générer des lignées de souris exprimant un TCR spécifique d'un peptide ou d'une protéine de la myéline (Scheikl et al. 2010). Ainsi, ces lignées constituent une mine de LT auto-réactifs, homogènes et de spécificité connue exprimant le TCR spécifique d'un auto-antigène myélinique. Ces animaux sont donc utilisables dans des expériences d'induction d'EAE. Par exemple, il existe des souris transgéniques appelées PLP-TCR parce qu'elles ont été générées en introduisant par transgénèse le fragment PLP₁₃₉₋₁₅₁ (Waldner et al. 2000). Environ 40% de ces animaux développent une EAE spontanée sévère dès l'âge de 6 semaines. Ces modèles permettent d'étudier les conditions de rupture de la tolérance immune vis-à-vis d'auto-antigènes spécifiques du SNC. Ces animaux TCR transgéniques sont également utilisés dans le but de tester de nouvelles stratégies thérapeutiques, en particulier celles basées sur l'élimination sélective d'une population de LT auto-réactifs de spécificité connue au cours d'une maladie auto-immune.

Une autre approche consiste à créer des souris transgéniques exprimant une protéine exogène sous le contrôle du promoteur d'une protéine spécifique du SNC. Cette lignée permet d'étudier les mécanismes d'induction de la tolérance au soi et les conditions de rupture de cet état de tolérance. Ce modèle a également permis de tester l'hypothèse selon laquelle une atteinte auto-immune du SNC peut être induite à la suite d'une infection virale. En effet, cela est possible si le virus exprime un épitope présentant des similitudes structurelles avec un épitope du soi (phénomène de mimétisme moléculaire) (Evans et al. 1996).

Les modèles transgéniques permettent notamment de déterminer les mécanismes cellulaires et moléculaires liés à l'étiologie de la maladie. Toutefois certains modèles transgéniques vont par exemple conduire à une EAE, et permettre de tester de nouvelles stratégies thérapeutiques mais la création d'un animal génétiquement modifié est longue et complexe. De plus, l'induction de la pathologie diffère complètement de celle observée chez l'Homme.

II.3.2 Les modèles viraux

Les antécédents génétiques et les facteurs environnementaux, comme les virus, semblent jouer un rôle important dans l'étiologie de la SEP (voir paragraphe I.1.2.3 Facteurs environnementaux p.35). Les modèles expérimentaux viraux suggèrent que différents types de virus peuvent déclencher des maladies démyélinisantes inflammatoires ressemblant à la SEP. En effet, les infections virales du SNC peuvent induire une démyélinisation chez la souris, habituellement après une encéphalite résolue (Virtanen and Jacobson 2012). Parmi les différents types de virus, les plus utilisés pour induire une encéphalomyélite sont le picornavirus, modèle de l'encéphalomyélite murine de Theiler (TMEV), le virus de l'hépatite murine (MHV), le coronavirus et le SFV, un alphavirus neurotrope de la famille des *Togaviridae*.

Le virus de Theiler induit chez des souris SLJ/J une maladie aigüe précoce ressemblant à une encéphalomyélite suivie d'une maladie démyélinisante chronique tardive. La maladie démyélinisante chronique tardive se caractérise par de longues lésions démyélinisantes, des infiltrats de cellules mononucléaires, une atrophie progressive de la ME et des dommages axonaux. Des similitudes étroites existent entre la maladie démyélinisante induite par le virus de Theiler chez la souris et la SEP chez l'homme (Oleszak et al. 2004; Mecha et al. 2013).

Le MHV est un agent pathogène naturel qui infecte tous les types de cellules dans le SNC (Bergmann et al. 2006). Contrairement au TMEV, les souris sensibles C57BL/6J infectées par MHV développent un seul épisode symptomatique majeur (ataxie, parésie des membres postérieurs, paralysie). La démyélinisation commence environ une semaine après l'infection, atteignant un sommet à la semaine 3-4, après quoi la remyélinisation des lésions peut survenir (Jordan et al. 1989).

Le SFV infecte les neurones du SNC et les oligodendrocytes induisant une démyélinisation (Pathak and Webb 1983; Fazakerley and Buchmeier 1993; Fazakerley et al. 2006).

Les modèles viraux permettent de comprendre comment une infection virale pourrait déclencher les processus pathogènes conduisant à la SEP en étudiant les mécanismes mis en jeu au cours de l'induction des réactions auto-immunitaires.

Cependant, ces modèles sont peu répandus en recherche pré-clinique. Effectivement, l'utilisation des modèles viraux conduit à manipuler des agents pathogènes sévères et difficiles à mettre en place. De plus, selon le virus utilisé, le modèle ne mime pas toutes les caractéristiques de la pathologie.

III LE TSPO ET SES LIGANDS

III.1 Structure du récepteur TSPO

La protéine translocatrice (TSPO), anciennement dénommée récepteur périphérique des benzodiazépines (PBR), est une protéine mitochondriale ubiquiste de 18 kDa comprenant 5 domaines transmembranaires. Ce récepteur permet la translocation du cholestérol de la membrane mitochondriale externe vers la membrane interne (Papadopoulos et al. 2017). Très conservée au cours de l'évolution, le TSPO est localisé dans de nombreux tissus (cerveau, cœur, poumon, foie, reins, tractus digestif) (Taliani et al. 2011; Morin et al. 2016), mais son expression est majoritaire dans les tissus stéroïdogéniques. Ce récepteur est présent dans les cellules nerveuses, hématopoïétiques et lymphatiques (Papadopoulos and Lecanu 2009; Harberts et al. 2013). Au niveau subcellulaire, le TSPO est localisé au niveau des zones de contact entre la membrane externe et la membrane interne mitochondriale (Chen and Guilarte 2008). Récemment, la TSPO murine a été cristallisée, ce qui a permis de déterminer sa structure 3D (Fig. 12) (Jaremko et al. 2015).

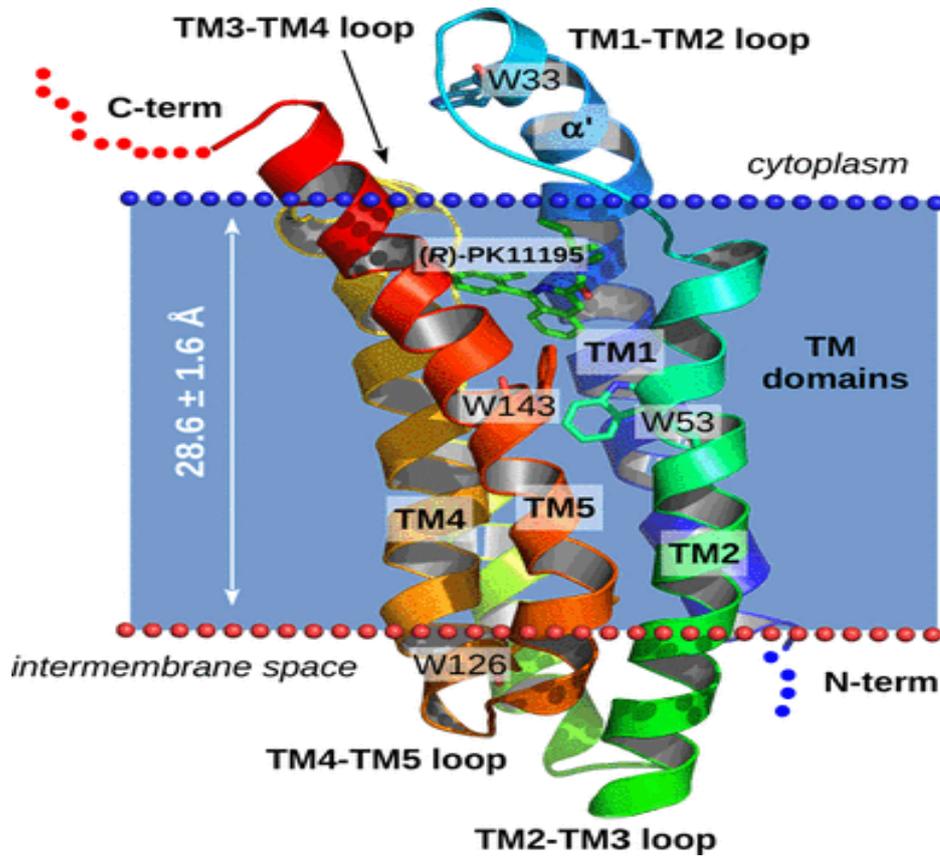


Fig. 12: Structure 3D du TSPO en présence du ligand PK-11195

Abréviations: C-term = partie C terminale de la protéine ; N-term = partie N terminale de la protéine ; loop = boucle ; TM domains = domaines transmembranaires

(Jaremko et al. 2015)

Cette protéine possède une structure tertiaire extrêmement dynamique stabilisée sous forme de canal transmembranaire. La partie C-terminale se situe dans le cytoplasme et la partie N-terminale dans l'espace intermembranaire. Le site de fixation du cholestérol ou CRAC (Cholesterol Recognition Aminoacid Consensus) est localisé dans la partie C-terminale du domaine TM5 (Fig. 12). Des études de RMN ont montré que le cholestérol se fixe avec une affinité nanomolaire à cette séquence (Jaipuria et al. 2017).

Le TSPO appartient à un complexe multiprotéique (Fig. 13), encore appelé "transductosome", qui est impliqué dans la régulation de la stéroïdogénèse (Papadopoulos et

al. 2015). Parmi les protéines présentes dans ce complexe, le VDAC (Voltage Dependent Anion Channel) est une protéine de 32KDa associée à l'Adénine nucléotide Translocase (ANT) pour former une porine, le MPTP ("mitochondrial permeability transition pore") (Karch and Molkenin 2014). La zone d'interaction entre VDAC et TSPO forme le site de fixation des benzodiazépines et de leurs analogues.

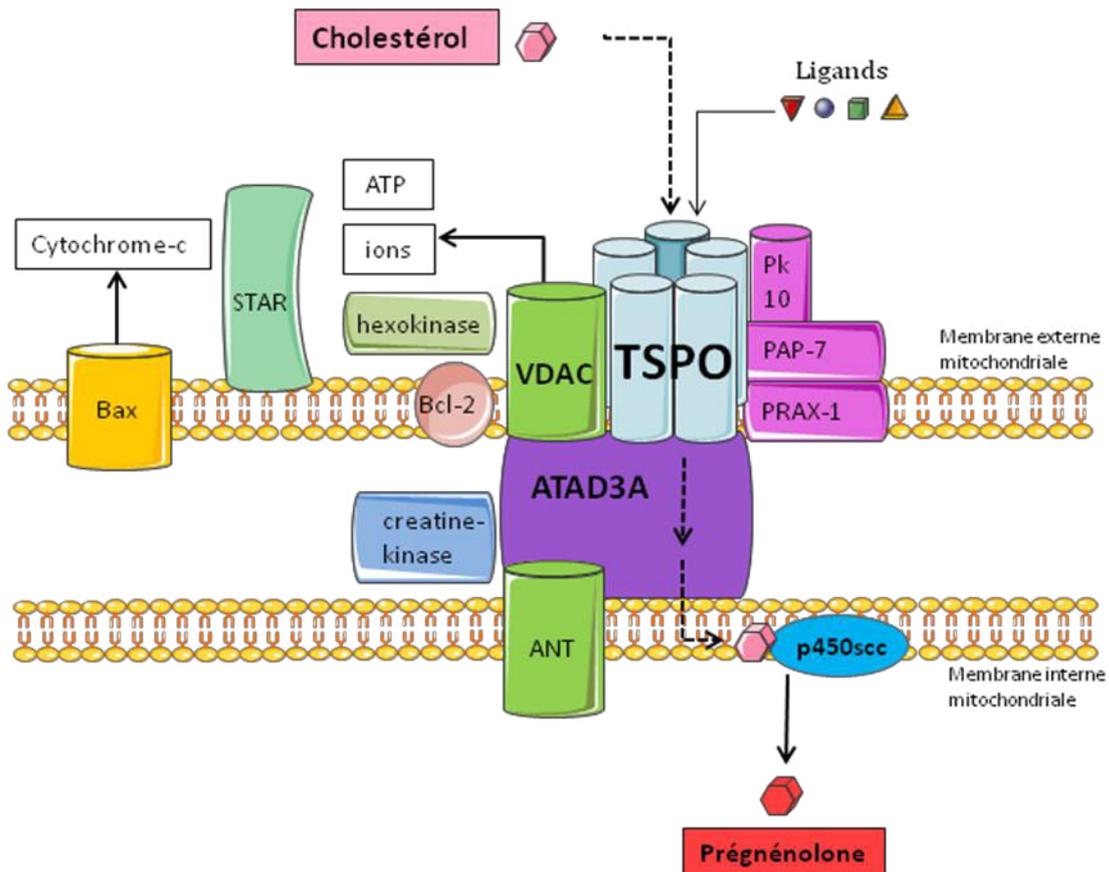


Fig. 13: Les différentes protéines formant le transductosome

Schéma représentant la translocation du cholestérol via le transductosome.

Schéma reconstitué d'après Dimitrova-Shumkovska et Papadopoulos (Dimitrova-Shumkovska et al. 2015; Papadopoulos et al. 2015)

Abréviations: ANT: Adénine Nucleotide Transporter; ATP: Adénosine Triphosphate; VDAC: Voltage-Dependent Anion Channel; STAR: steroidogenic acute regulatory protein; P450scc: Cholesterol side-chain cleavage enzyme.

III.1.1 Implications physiopathologiques du TSPO

Les études réalisées avec différentes techniques de biochimie (utilisation des ligands TSPO) ou de biologie moléculaire (Knock-Out, vecteurs ou oligonucléotides antisens, ARN interférents) montrent une implication directe ou indirecte du TSPO dans de nombreuses fonctions biologiques (Li et al. 2015). En effet, il intervient comme modulateur dans différentes fonctions mitochondriales comme le transport du cholestérol, la synthèse d'hormones stéroïdes et la respiration mitochondriale. Le TSPO est impliqué, directement ou non, dans les mécanismes de prolifération cellulaire, de différenciation, d'adhésion, de migration, d'apoptose mais aussi dans les processus de tumorigénèse et d'angiogénèse (Papadopoulos et al. 2017; Yasin et al. 2017).

Dans des conditions physiologiques, les concentrations de TSPO dans le SNC sont très faibles. En revanche, suite à une lésion cérébrale ou une inflammation, les niveaux de TSPO, dans les cellules gliales, augmentent très fortement (Chen and Guilarte 2008). Depuis plusieurs années, chez l'homme, la distribution de TSPO peut être visualisée par tomographie à émission de positons (TEP) en utilisant des ligands hautement sélectifs marqués, le plus souvent au fluor 18. Cette technique a permis de mettre en évidence une surexpression de TSPO dans les cas de neuroinflammation et de maladies neurodégénératives (Ching et al. 2012; Suridjan et al. 2014). De ce fait, le TSPO peut être considéré comme un biomarqueur des lésions cérébrales et d'inflammation dans les maladies neurodégénératives (Ouchi et al. 2005; Papadopoulos and Lecanu 2009; Dupont et al. 2017), comme la maladie d'Alzheimer (Lagarde et al. 2017), mais aussi dans le cas d'ischémie ou d'accident vasculaire cérébral (Gerhard et al. 2000). Son implication dans les maladies inflammatoires telles que la SEP (Debruyne et al. 2003; Versijpt et al. 2005; Harberts et al. 2013) ou chez les patients présentant des douleurs chroniques (Loggia et al. 2015) est désormais bien établie. Les analyses de tomographie par émission de positons avec des ligands pour ce récepteur, comme

par exemple le [¹¹C] PK11195, montrent une augmentation de l'expression de TSPO dans de nombreuses affections neuropathologiques. Le TSPO est sur-régulé après une lésion neuronale dans la SEP (Debruyne et al. 2003; Harberts et al. 2013).

Le TSPO peut donc être utilisé comme un marqueur de diagnostique de différents types de pathologie.

III.1.2 Mécanisme d'action du TSPO

L'implication du TSPO dans de nombreuses fonctions biologiques est bien établie, en revanche son mécanisme d'action n'est pas explicitement détaillé. En effet, la cascade des événements, en particulier les messagers mis en jeu après l'activation du récepteur, n'est pas clairement élucidée même si plusieurs pistes sont envisagées.

La piste la plus étudiée est bien sûr celle de la biosynthèse des stéroïdes. La fixation du ligand sur le récepteur TSPO permet la translocation du cholestérol du cytosol vers la membrane mitochondriale interne. Le cholestérol traverse la matrice grâce à l'ATAD3A (ATPase family AAA Domain-containing protein 3) qui fait le lien entre les membranes externe et interne de la mitochondrie. Le cholestérol est ensuite converti en prégnénolone (PREG) par le cytochrome P450 side-chain cleavage, début de la synthèse des stéroïdes (voir partie 4: Les neurostéroïdes).

Pour autant, la fixation du ligand sur TSPO ne stimule pas seulement la stéroïdogénèse, mais permet aussi la régulation de l'expression de gènes nucléaires. Cela pourrait expliquer les nombreux effets fonctionnels de TSPO (Veenman et al. 2016). De plus, il est bien établi que les mitochondries sont capables de réguler l'expression des gènes nucléaires par des mécanismes rétrogrades (Biswas et al. 2008; Quiros et al. 2016). L'activation de TSPO par le PK 11195 contrôle la régulation des fonctions mitochondriales

telles que la production de calcium, d'ATP et la génération de ROS par modulation de protéines mitochondriales telles que le VDAC, l'ANT et le complexe V. La libération de Ca^{2+} , la production d'ATP et des ROS appartiennent à la voie de signalisation mitochondriale qui régule l'expression des gènes nucléaires. Dans cette voie, les protéines telles que la calcineurine et la calmoduline contribuent à l'induction de l'expression de gènes précoces. Une étude très récente, réalisée sur des cellules de gliome malin (U-118MG), montre que l'activation de TSPO par le PK 11195 induit des changements dans l'expression d'un grand nombre de gènes comme ceux codant les protéines FOS, EGR1 (Early growth response protein 1) ou encore OSR1 (odd-skipped-related 1, facteur de transcription) qui sont fortement stimulés (Yasin et al. 2017).

Ces cascades pourraient aussi expliquer les nombreux effets de TSPO sur la prolifération cellulaire, la migration, la différenciation, la mort cellulaire, l'inflammation, la réponse immunitaire et la tumorigénicité (Yasin et al. 2017) (Fig. 14).

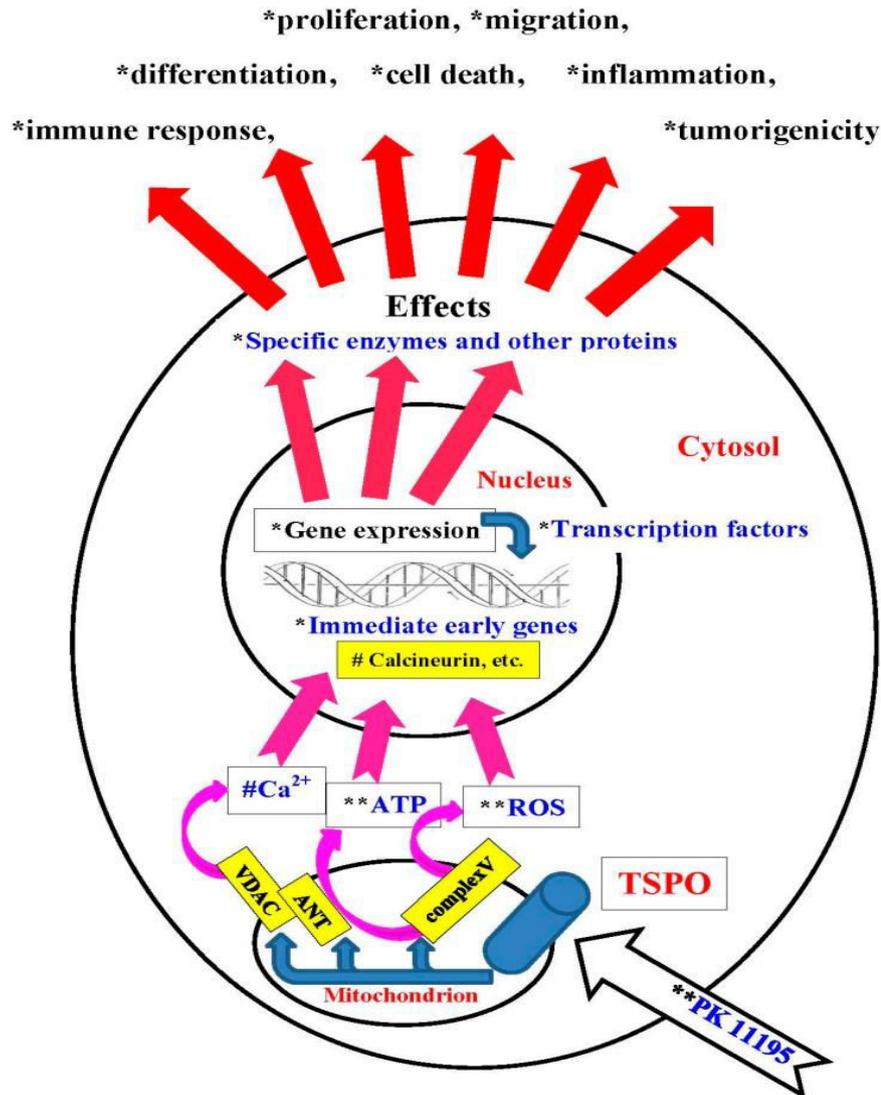


Fig. 14: Régulation de l'expression des gènes après activation du récepteur TSPO par le ligand PK11195

(Yasin et al. 2017)

Abréviations: ANT: Adenine Nucleotide Transporter; ATP: Adenosine Triphosphate; TSPO: Translocator Protein (18 kDa); VDAC: Voltage-Dependent Anion Channel; ROS: reactive oxygen species.

III.2 Les ligands TSPO

III.2.1 Généralités

Le récepteur TSPO possède des sites de fixation distincts pour le cholestérol et ses ligands. Les ligands endogènes du TSPO sont les endozépines dont le représentant majoritaire est le DBI (diazepam binding inhibitor) qui présente une affinité de l'ordre du nanomolaire pour le TSPO (Costa and Guidotti 1991; Li et al. 2016). Les endozépines stimulent le transport du cholestérol et favorisent la synthèse des stéroïdes. Les porphyrines sont également des ligands endogènes qui se lient avec une affinité nanomolaire au niveau de la zone N-terminale. Parmi ces composés, on retrouve la protoporphyrine IX, la deuteroporphyrine IX, la mesoporphyrine IX, et l'Hémine (Verma and Snyder 1988; Gatliff and Campanella 2016). Le site de liaison de ces porphyrines sur le TSPO semble être le même que celui du ligand pharmacologique spécifique, le PK11195 (Li et al. 2015).

III.2.2 Implication du récepteur TSPO et de ses ligands dans les maladies psychiatriques et neurodégénératives

L'augmentation de l'expression de TSPO est observée chez les patients souffrant d'affections chroniques et aiguës caractérisées par la perte de cellules neuronales et gliales, telles que la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson, la maladie de Huntington, la SEP et la sclérose latérale amyotrophique (Arbo et al. 2015). Une constatation identique est décrite chez les patients dépressifs sévères (Setiawan et al. 2015). En revanche, dans les plaquettes et les lymphocytes de patients schizophrènes suicidaires présentant des troubles de l'anxiété ou souffrant de stress post-traumatique, le taux de TSPO est fortement diminué (Arbo et al. 2015). Ainsi, la mise en évidence des modifications de l'expression de TSPO dans les

maladies neurodégénératives et les troubles psychiatriques a conduit depuis ces 25 dernières années, à développer la synthèse de molécules spécifiques ayant une forte affinité pour TSPO (Chen and Guilarte 2008). Ces ligands se regroupent en différentes classes de molécules.

Les benzodiazépines (BZ) et les isoquinolines ont une structure qui comporte des assemblages polycycliques (Cinone et al. 2000; Cappelli et al. 2008; Scarf et al. 2012). Les BZ appartiennent à la classe des médicaments psychotropes de part leur effet anxiolytique *via* le récepteur GABA_A (Tan et al. 2011; Kronenfeld et al. 2017). Le plus connu de cette famille est le diazépam, commercialisé sous le nom de valium, et utilisé pour soulager à court terme des symptômes de grande anxiété, des convulsions ou des spasmes musculaires, survenant par exemple en cas de sevrage alcoolique, ou encore dans certaines pathologies psychiatriques (Dean 2012). L'addition d'un atome de chlore au diazépam permet de former le 4-chlorodiazépam, ou Ro5-4864, qui possède une meilleure affinité pour le TSPO (Skolnick et al. 1979). Le Ro5-4864 a été testé dans un modèle animal de la maladie d'Alzheimer où il agit en diminuant l'accumulation des peptides β amyloïdes (A β) et la gliose réactionnelle, il augmente les performances mnésiques et diminue l'anxiété (Barron et al. 2013). Dans les lésions cérébrales traumatiques, le Ro 5-4864 favorise la survie des neurones, en augmentant l'expression des neurofilaments et en diminuant l'activité des caspases 9 et 3, impliquées dans l'apoptose (Soustiel et al. 2008). Au niveau de l'hippocampe, le Ro5-48-64 prévient la perte neuronale, diminue l'astrogliose réactionnelle et la microgliose dans un modèle d'excitotoxicité induite par l'acide kaïnique (Veiga et al. 2005).

La seconde classe de molécules est celle des isoquinolines, à laquelle appartient le PK11195 (1-(2-chlorophenyl)-N-(1 methylpropyl)-3-isoquinoline carboxamide). Le PK11195 est le 1^{er} ligand n'appartenant pas à la famille des BZ capable de se fixer exclusivement au TSPO avec une affinité de l'ordre du nM (\sim 0,5 nM) (Le Fur et al. 1983; Awad and Gavish 1987; Hatty et al. 2014). Le PK11195 est capable de déplacer le Ro5-4864 de son site de

liaison (Le Fur et al. 1983) car leurs sites de liaison se chevauchent mais ne sont pas identiques (Farges et al. 1994; Liu et al. 2014) (Fig. 15). Dans un modèle expérimental de la maladie d'Alzheimer, le PK11195 diminue le taux d'A β (Barron et al. 2013). Utilisé dans des modèles de lésions cérébrales traumatiques, il permet de diminuer la neuroinflammation, en réduisant le taux de cytokines pro-inflammatoires et de ROS (Veiga et al. 2005).

Parmi les nouveaux ligands synthétiques récemment mis en évidence, le PBR28 est un composé aryloxyanilide, qui présente une affinité pour la TSPO comparable au PK11195 mais dont la forme radio-marquée présente une meilleure spécificité que le PK11195, d'où son utilisation en imagerie médicale (Harberts et al. 2013; Owen et al. 2014). D'autres ligands comme les benzoxazolones et leurs dérivés (Fukaya et al. 2013) ont été développées pour le traitement des troubles psychiatriques comme par exemple l'étifoxine et le XBD173 (voir paragraphes III.2.3 p. 86 et III.2.4 p.89).

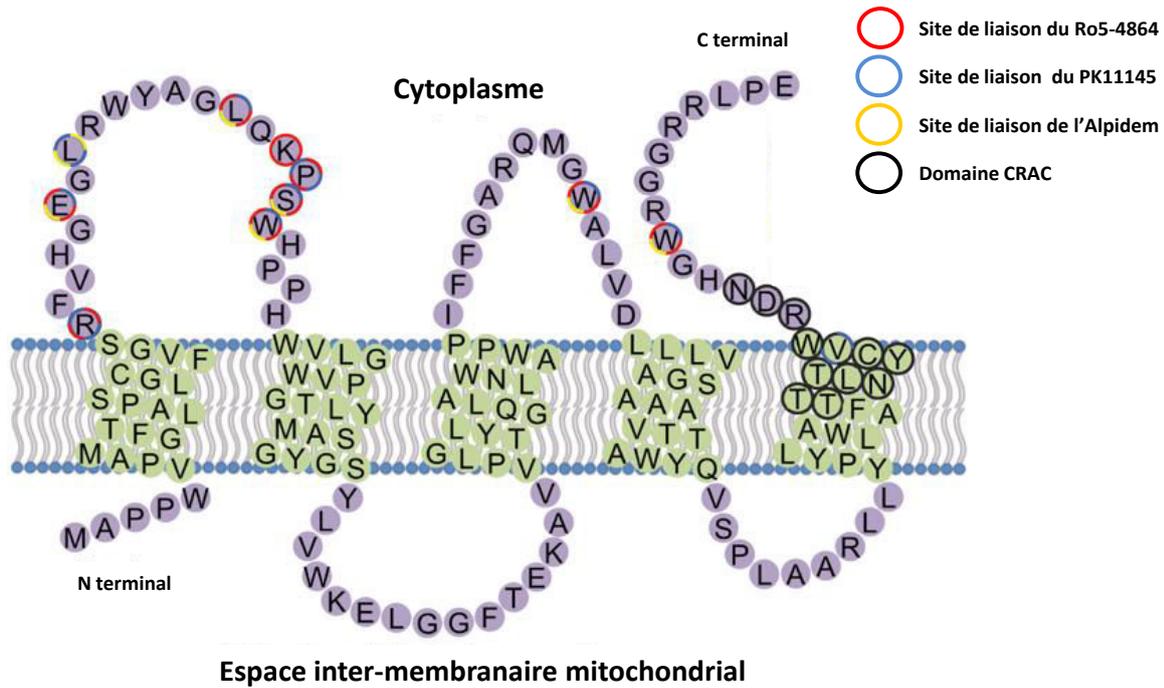


Fig. 15: Sites de liaison de ligands sur le récepteur TSPO

Schéma représentant la topologie du TSPO dans la membrane avec les acides aminés impliqués dans la liaison de certains ligands (Ro5-4864, PK11195, Alpidem et du domaine CRAC).

(Liu et al. 2014)

III.2.3 L'étifoxine

L'étifoxine appartient au benzoxazine, une famille proche des BZ, ayant des effets semblables mais structurellement différente (Fig. 16). L'avantage de l'utilisation de l'étifoxine permet d'éviter les effets secondaires des BZ. L'étifoxine a un profil pharmacologique distinct des BZ, en agissant par exemple, sur des sous-unités du récepteur GABA_A différentes par rapport aux BZ. De ce fait, l'étifoxine a des effets cliniques distincts comparés au BZ (Nguyen et al. 2006).

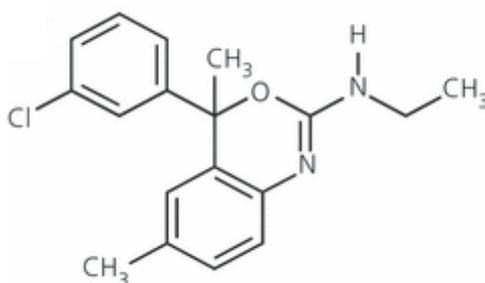


Fig. 16: Structure de l'étifoxine

L'étifoxine (etafenoxine, Stresam®) est un anxiolytique non benzodiazépine avec un effet anticonvulsivant. Développée dans les années 1960 pour lutter contre les troubles anxieux, cette molécule fait l'objet de nombreuses études pour traiter d'autres pathologies.

L'étifoxine benzoxazine a été le premier ligand TSPO qui a révélé des effets anxiolytiques dans un essai clinique chez des personnes anxieuses: (adjustment disorder with anxiety: ADWA) (Nguyen et al. 2006; Stein 2015). Le but d'une étude était de comparer l'efficacité de l'étifoxine, et du lorazépam, une benzodiazépine. Les deux médicaments ont montré une efficacité équivalente après 28 jours de traitement. L'amélioration clinique (basée sur l'échelle de l'empreinte clinique globale CGI, l'auto-évaluation de l'échelle d'ajustement social SAS-SR et les scores de Sheehan) a été observée chez les patients traités avec ces deux molécules, mais les patients recevant l'étifoxine ont eu un effet thérapeutique positif sans effets secondaires évalués par CGI. De plus, 1 semaine après l'arrêt du traitement, moins de patients recevant l'étifoxine ont connu un rebond d'anxiété par rapport à ceux traités avec le lorazepam (Nguyen et al. 2006). Une autre étude a comparé l'étifoxine à l'alprazolam, une benzodiazépine, dans un essai clinique (Stein 2015). Un groupe a été traité avec 150 mg/jour d'étifoxine et l'autre groupe a reçu 1,5 mg/jour d'alprazolam pendant 28 jours. Chez les deux groupes de patients on observe, au jour 28, une diminution de l'anxiété estimée grâce à

l'échelle d'évaluation de l'anxiété de Hamilton (Hamilton Anxiety Rating Scale (HAM-A)). Au jour 28, le score HAM-A est en faveur de l'alprazolam mais après l'arrêt du traitement, les scores HAM-A ont continué à s'améliorer dans le groupe traité à l'étifoxine, alors qu'ils ont augmenté dans le groupe traité à l'alprazolam. De plus, des effets secondaires ont été signalés chez les patients traités avec l'alprazolam, survenant principalement après l'arrêt du médicament. Selon les auteurs, l'étifoxine est donc plus efficace dans la prise en charge des troubles de l'anxiété (Stein 2015).

III.2.3.1 Mécanisme d'action

Le mécanisme d'action exact du chlorhydrate d'étifoxine (6-chloro-2-éthylamino-4-méthyl-4-phényl-4H-3, 1-benzoxazine) n'est pas encore entièrement élucidé. Cependant, il a été suggéré que l'étifoxine potentialise la fonction du récepteur GABA_A par un mécanisme allostérique positif en interagissant directement avec un site modulateur localisé sur les sous-unités $\beta 2$ et/ou $\beta 3$ du récepteur (Hamon et al. 2003; Nguyen et al. 2006; Choi and Kim 2015). L'étifoxine module aussi indirectement le récepteur GABA_A en stimulant, via l'activation de TSPO, la production de neurostéroïdes exerçant un effet allostérique sur le récepteur GABA_A (Schlichter et al. 2000; Poisbeau et al. 2014; Choi and Kim 2015).

L'étifoxine n'est donc pas un ligand spécifique du TSPO.

III.2.3.2 Recherches actuelles

L'étifoxine fait l'objet de plusieurs études qui explorent son utilisation pour le traitement de diverses pathologies. Par exemple, l'utilisation de l'étifoxine est actuellement explorée pour le traitement des lésions cérébrales traumatiques (LCB) qui entraînent des troubles neurologiques importants. Il n'existe actuellement aucun traitement efficace pour

prévenir les conséquences délétères de ces lésions. Les LCB sont suivies non seulement par une réponse inflammatoire, mais aussi par une réorganisation profonde du système GABAergique et une dysrégulation de la protéine translocatrice 18 kDa (TSPO) (Papadopoulos and Lecanu 2009; Simon-O'Brien et al. 2016). Dans plusieurs modèles de lésion du nerf périphérique, l'étifoxine a démontré qu'elle présente de puissantes propriétés anti-inflammatoires et régénératrices et favorise la récupération fonctionnelle (Girard et al. 2008; Girard et al. 2012; Dai et al. 2014). Suite à ces résultats positifs, l'équipe de Verleye a utilisé un modèle de rat de LCB pour explorer les effets du traitement par l'étifoxine dans une lésion du système nerveux central (Simon-O'Brien et al. 2016). L'étifoxine a réduit les taux de cytokines pro-inflammatoires sans affecter les taux de cytokines anti-inflammatoires chez les rats malades. De plus, l'étifoxine a favorisé la réduction des macrophages, l'activation gliale, et la diminution de la dégénérescence neuronale.

Dans des modèles animaux de neuropathies, l'administration d'étifoxine permet la diminution et/ou la prévention des symptômes douloureux liés au développement de la neuropathie (Aouad et al. 2009; Aouad et al. 2014). Dans un modèle d'EAE, l'étifoxine réduit le taux de cytokines pro-inflammatoires (IL-6; IL-17; IL-1 β ; IFN- γ) ainsi que CD4 et CD8. L'étifoxine améliore la survie neuronale et diminue la perte de myéline (Daugherty et al. 2013; Ravikumar et al. 2016). Ces effets seraient induits par la synthèse de PREG.

III.2.4 Le XBD 173

Le XBD173 ou Emapunil ou AC-52216, [N-benzyl-N-ethyl-2-(7-méthyl-8-oxo-2-phenylpurin-9yl) acetamide] (Owen et al. 2011) est un ligand du TSPO développé à la fin des années 90 comme anxiolytique sans avoir les effets secondaires typiques des BZ (Rupprecht et al. 2009) (Fig. 17). Ce composé dérive de la famille des purines et présente une bonne affinité pour le TSPO ($K_i = 0.3 - 3$ nM selon l'origine tissulaire). Son efficacité a été prouvée

chez les rongeurs dans différents modèles d'anxiété, notamment des modèles de rats et de souris évalués par le test de Vogel, par le test de la boîte noire ou par des mesures des interactions sociales (Kita et al. 2004; Kita et al. 2009).

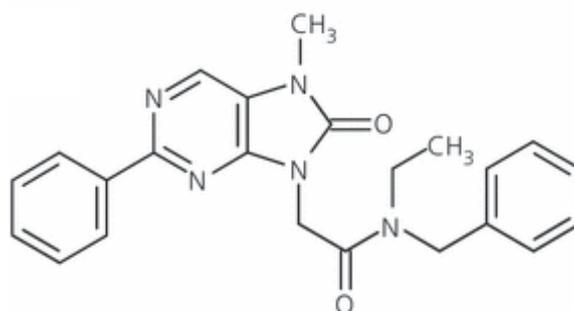


Fig. 17: Structure du XBD173

Les BZ, couramment prescrits pour traiter les troubles de l'anxiété, présentent de nombreux effets secondaires comme la sédation et la tolérance. En revanche, le XBD173 est un anxiolytique qui ne possède pas ses effets secondaires (Reddy 2010). En 2009, une étude clinique, publiée dans *Science*, relate l'effet antipanique rapide du XBD173 sans effets secondaires d'accoutumance et de dépendance chez l'homme (Rupprecht et al. 2009). Actuellement, le XBD173 est en phase II d'essai clinique pour traiter des personnes ayant des troubles de l'anxiété (Tvrdeić and Poljak 2016). En revanche, ses potentiels neuroprotecteur et anti-inflammatoire n'ont pas encore été démontrés.

III.2.4.1 Mécanisme d'action

La phénylpurine XBD173 est un ligand TSPO sélectif et à haute affinité qui possède des propriétés anxiolytiques établies aussi bien dans les modèles animaux que chez l'Homme (Rupprecht et al. 2009; Owen et al. 2011; Costa et al. 2012; Nothdurfter et al. 2012). Ces

effets sont obtenus par stimulation de la synthèse des neurostéroïdes qui potentialisent l'amplitude et la durée des courants postsynaptiques inhibiteurs par fixation sur le récepteur GABA_A (Nothdurfter et al. 2012). Dans les cellules humaines WSS-1, exprimant les sous-unités $\alpha 1$, $\beta 3$ et $\gamma 2$ du récepteur GABA_A, le XBD173 ne potentialise pas les courants chlore, contrairement à l'effet des BZ, démontrant ainsi que le XBD173 ne révèle pas d'effets modulateurs directs du récepteur GABA_A (Rupprecht et al. 2009). *In vivo*, le XBD173 a contrecarré les attaques de panique induites pharmacologiquement chez des volontaires sains sans développer d'effets sédatifs ni de symptômes de sevrage contrairement à l'alprazolam, BZ également testée dans cette étude. Le XBD173 est donc un candidat prometteur pour une nouvelle classe d'anxiolytiques (Rupprecht et al. 2009; Nothdurfter et al. 2011).

Le XBD173 possède une forte affinité pour le récepteur TSPO avec une valeur de la constante d'inhibition subnanomolaire. L'affinité de XBD173 pour TSPO est comparable à celle du PK11195 et plus puissante que d'autres ligands du TSPO comme le Ro5-4864 et l'étifoxine. Le site de liaison de XBD173 sur TSPO serait plus proche de celui de PK11195 plutôt que de Ro5-4864. Par ailleurs, le XBD173 ne se lie pas à d'autres types de récepteurs tels que des transporteurs, des canaux ioniques ou le récepteur GABA_A (Kita et al. 2004; Rupprecht et al. 2009).

Le XBD173 est donc un ligand spécifique de TSPO possédant une forte affinité. Cette propriété lui permet de rester fixé plus longtemps sur le récepteur induisant une stimulation importante de la stéroïdogénèse qui se traduit par une augmentation de la quantité de prégnénolone supérieure à celle observée avec l'étifoxine, par exemple (Costa et al. 2016).

III.2.4.2 Recherches actuelles

Le XBD173, en stimulant la neurostéroïdogenèse, soulève un grand intérêt pour développer des stratégies thérapeutiques contre les troubles neuroinflammatoires et/ou neurodégénératifs sensibles au TSPO.

Des études récentes ont montré l'induction de TSPO dans les dégénérescences rétiniennes (Karlstetter et al. 2014; Scholz et al. 2015). L'inflammation chronique de la rétine sous forme de microglie activée est impliquée dans l'étiologie des maladies neurodégénératives de la rétine, y compris la rétinopathie diabétique et le glaucome (Karlstetter et al. 2015). Plusieurs études ont montré le rôle de TSPO dans des modèles de souris présentant une inflammation, des lésions et/ou une dégénérescence aiguë de la rétine. Dans ces travaux, XBD173 exerce des effets anti-inflammatoires sur la microglie *in vitro* et *ex vivo* et possède des fonctions immunomodulatrices et neuroprotectrices (Karlstetter et al. 2014; Scholz et al. 2015).

Plus récemment, une étude, réalisée chez le rat sur le modèle EAE-MOG, a évalué les effets thérapeutiques potentiels de XBD173 (30 mg/kg). Les résultats obtenus avec le XBD173 ne montrent pas d'effet curatif sur la symptomatologie chez les animaux EAE quand bien même il augmente les quantités de progestérone et d'AP dans les cerveaux de ces animaux (Ravikumar et al. 2016). Toutefois, cette première étude a été conduite sur la forme progressive de la maladie, moins répandue que la forme récurrente-rémittente (15% versus 85% des patients).

IV LES NEUROSTEROIDES

IV.1 Généralités

Le terme « neurostéroïde » proposé dans les années 80 par E.E. Baulieu et collaborateurs (1981) regroupe les stéroïdes synthétisés *de novo* dans le système nerveux central et/ou périphérique, à partir du cholestérol ou de ses dérivés (Baulieu 1999; Mensah-Nyagan et al. 1999). L'accumulation de ces composés dans le système nerveux est indépendante de la stéroïdogénèse effectuée par les glandes endocrines périphériques. Sont appelés stéroïdes neuroactifs tous les stéroïdes exerçant un effet sur les cellules nerveuses qu'ils soient produits directement dans le système nerveux (neurostéroïdes), par les glandes endocrines ou qu'ils soient des stéroïdes synthétiques ayant la capacité de franchir la BHE après leur administration.

Il est important que les critères suivants soient respectés avant qu'un stéroïde ne soit considéré comme un neurostéroïde :

- 1) Le lieu de synthèse du stéroïde doit être le système nerveux (central ou périphérique).
- 2) Le stéroïde doit être synthétisé *de novo* par des cellules gliales et/ou des neurones.
- 3) Des concentrations substantielles du stéroïde doivent persister dans le système nerveux après ablation des glandes stéroïdogènes périphériques.
- 4) Les sites d'action sont membranaires et/ou nucléaires
- 5) Le mode d'action est autocrine et/ou paracrine.

Des études pharmacologiques et comportementales ont montré l'implication des neurostéroïdes dans de nombreuses fonctions du système nerveux, comme la régénération axonale (Koenig et al. 1995; Borowicz et al. 2011), la neuroprotection (Schumacher et al. 2000; Akwa et al. 2005; Borowicz et al. 2011; Mackenzie et al. 2012), le développement

(Schumacher et al. 1996; Mellon 2007), l'épilepsie (Mackenzie et al. 2012), le stress (Zimmerberg and Brown 1998; Zorumski et al. 2013), l'anxiété (Brot et al. 1997; Akwa et al. 1999; Reddy 2010; Longone et al. 2011), la dépression (van Broekhoven and Verkes 2003; Zorumski et al. 2013), la mémoire (Akwa et al. 2001; Vallee et al. 2001; Luchetti et al. 2011), ou encore la nociception (Mensah-Nyagan et al. 2009; Meyer et al. 2013; Patte-Mensah et al. 2014; Humble 2016).

IV.2 Synthèse des neurostéroïdes/ mécanisme d'action des neurostéroïdes

A la suite de Baulieu et collaborateurs (Corpechot et al. 1981; Corpechot et al. 1983), de nombreuses études ont démontré la présence des enzymes stéroïdogéniques dans le tissu nerveux (Baulieu 1999; Mensah-Nyagan et al. 1999; Mensah-Nyagan et al. 2001; Mensah-Nyagan et al. 2001; Mellon and Griffin 2002; Patte-Mensah et al. 2006).

La première étape de la synthèse des neurostéroïdes débute au niveau de la mitochondrie par la conversion du cholestérol en prégnénolone grâce à l'action de l'enzyme cytochrome P450 *side chain cleavage* (P450scc) (Papadopoulos and Brown 1995; Li et al. 2001). C'est l'étape clé et limitante de la neurostéroïdogénèse qui exerce donc un rôle important dans la régulation de la production des neurostéroïdes. En effet, il est possible de stimuler ou d'inhiber la synthèse de prégnénolone en régulant l'activité de l'enzyme P450scc ou du TSPO par ses ligands (Yanagibashi et al. 1989; Papadopoulos et al. 1992; Korneyev et al. 1993; Selvaraj et al. 2015). Certains auteurs suggèrent que la protéine StAR (Steroidogenic Acute Regulatory Protein) est nécessaire à la translocation du cholestérol dans la mitochondrie (West et al. 2001; Miller and Auchus 2011). La régulation de l'activité de StAR pourrait aussi contrôler la neurostéroïdogénèse (Rajapaksha et al. 2013). Cependant, il a été montré que StAR n'est pas indispensable mais qu'elle favorise l'activité de VDAC (Prasad et al. 2015).

La PREG est ensuite convertie en progestérone par la 3β -hydroxysteroid deshydrogenases (3β -HSD). La conversion de la progestérone en 5α -dihydroprogestérone (5α -DHP) est catalysée par la 5α -réductase. La 5α -DHP peut être métabolisée en allopregnanolone (AP) ou $3\alpha, 5\alpha$ -tétrahydroprogestérone ($3\alpha, 5\alpha$ -THP) par des aldo-céto-réductases (3α -HSD = 3α -hydroxysteroid deshydrogenase). De façon réversible, l'AP peut être convertie en 5α -dihydroprogestérone par des déshydrogénases / réductases à chaîne courte (SDR) (Fig. 18). Enfin, de nombreuses enzymes mitochondriales et microsomales interviennent dans la voie de biosynthèse des autres neurostéroïdes.

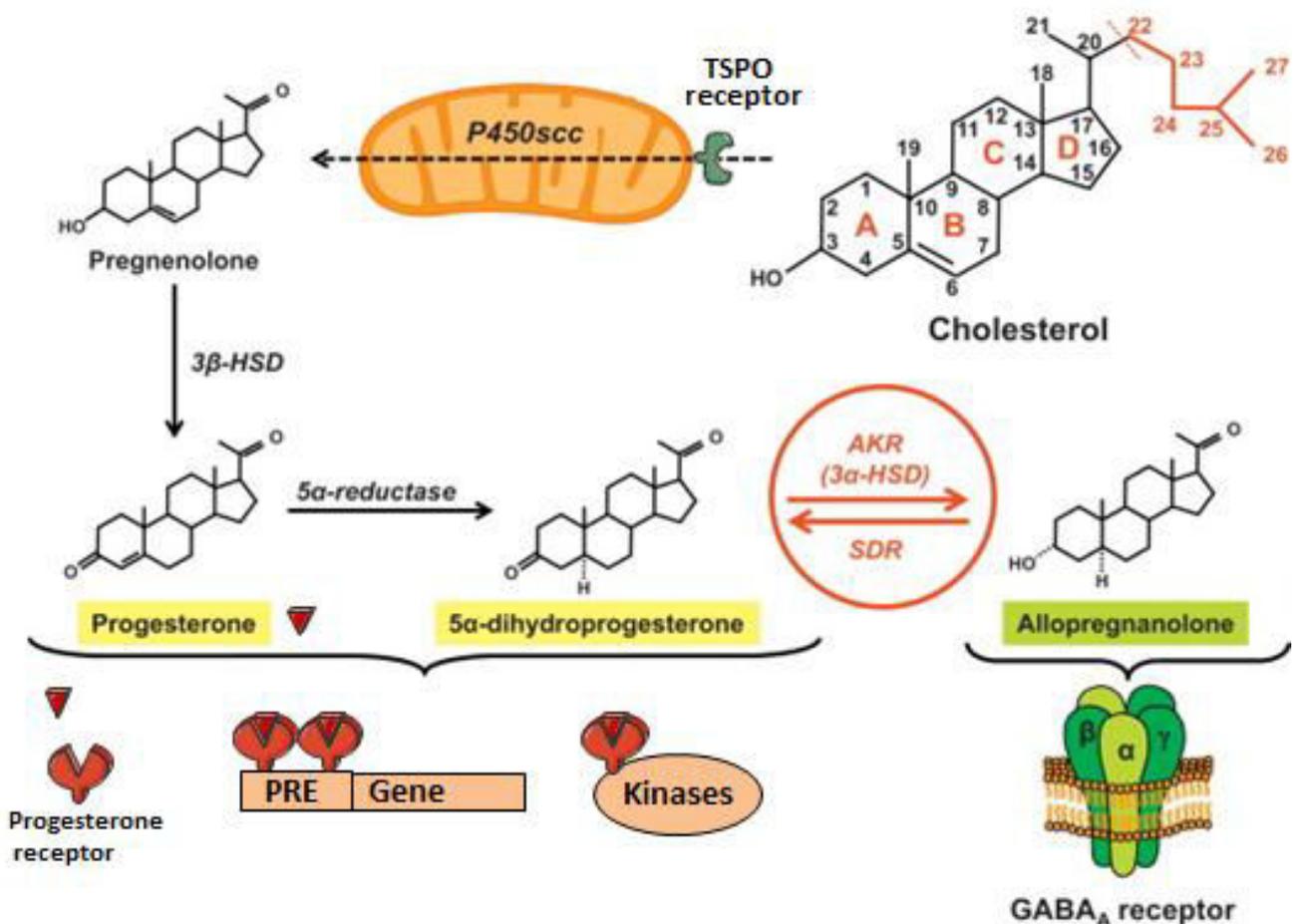


Figure 18 : Voie de biosynthèse de quelques neurostéroïdes

(D'après Schumacher (Schumacher et al. 2014))

En raison de leur nature lipophile, les neurostéroïdes peuvent facilement traverser les membranes cellulaires et agir sur les récepteurs nucléaires pour réguler la transcription des gènes (Arnold and Beyer 2009). Ces récepteurs nucléaires regroupent les récepteurs des androgènes; des oestrogènes; des glucocorticoïdes; des minéralocorticoïdes et de la progestérone (Beato and Klug 2000; Sikora 2016). Les récepteurs nucléaires sont des protéines composées de plusieurs domaines parmi lesquels se présentent le domaine de liaison au stéroïde (Ligand binding domain: LBD), le domaine de fixation à l'ADN (DNA binding domain: DBD) et les domaines d'activation de la transcription (activation function 1 and 2 (AF1/2)) (Brisken and O'Malley 2010; Stanisic et al. 2010) (Fig. 19). Ces actions sont lentes à se développer (minutes, heures) puisqu'elles sont limitées par la transcription des gènes et la synthèse protéique (Rupprecht and Holsboer 1999; Falkenstein et al. 2000).



Fig. 19: Structure générale d'un récepteur nucléaire aux stéroïdes

Aperçu général des domaines fonctionnels et structuraux des récepteurs nucléaires aux stéroïdes.

Abréviations: AF1/2: Activation function 1 and 2; DBD: DNA binding domain; H: Hinge region.

(Stanisic et al. 2010)

De nombreuses études ont mentionné des effets membranaires rapides (de l'ordre de la milliseconde à la seconde) de certains stéroïdes, principalement sur l'excitabilité neuronale et la modulation de systèmes de seconds messagers (Lambert et al. 1995; Baulieu 1997; Rupprecht and Holsboer 1999; Finocchi and Ferrari 2011). En effet, en plus des récepteurs

nucléaires, les neurostéroïdes peuvent agir comme des modulateurs allostériques de récepteurs membranaires, incluant les récepteurs glycinergiques (Wu et al. 1991; Maksay et al. 2001), GABA_A (Majewska 1992; Lambert et al. 1995; Wang 2011), muscariniques (Klangkalya and Chan 1988; Horishita et al. 2002), nicotiniques (Valera et al. 1992; Reddy 2010), NMDA (Wu et al. 1991; Vyklicky et al. 2015), sérotoninergiques (5-HT₃; (Longone et al. 2011)) et σ (Monnet et al. 1995; Maurice et al. 1999; Wang 2011).

IV.3 La Prénolone et l'Alloprégnanone dans les maladies neurodégénératives et dans les troubles psychiques/psychiatriques

IV.3.1 La Prénolone

La concentration de PREG dans le cerveau est plus élevée que le taux circulant (Corpechot et al. 1981; Schmidt et al. 2008; Taves et al. 2011). Cependant, la quantité de PREG peut être perturbée selon les états physiopathologiques. En effet, les niveaux de PREG cérébrales diminuent avec l'âge ou chez les personnes atteintes de maladies neurodégénératives (Weill-Engerer et al. 2002; Luchetti et al. 2011). La corrélation entre la diminution du taux de PREG et la baisse des activités neuronales suggère l'implication de la PREG dans la régulation des fonctions neuronales.

La PREG possède un effet positif sur l'excitabilité neuronale et synaptique, la plasticité, et a beaucoup d'autres fonctions associées à l'humeur, la régulation des radicaux libres, la neuroprotection, la réponse au stress et l'amélioration des performances cognitives. De ce fait, de nombreux laboratoires étudient ce neurostéroïde afin de voir s'il a un potentiel effet thérapeutique dans différentes pathologies (Marx et al. 2011; Vallee 2016).

Chez les rongeurs, le traitement à la PREG améliore la cognition, l'attention et la mémoire (Flood et al. 1992; Marx et al. 2009). Dans la maladie d'Alzheimer, la présence de

plaques amyloïdes et d'enchevêtrements neurofibrillaires provoque une action toxique primaire sur les neurones cérébraux et est partiellement responsable de la dégénérescence neuronale (Rojas-Gutierrez et al. 2017). Des travaux ont démontré que la PREG réduit la production de protéines bêta-amyloïdes (Naylor et al. 2010). Dans la maladie de Parkinson, il a été constaté que les taux de PREG sont inférieurs à la normale (Melcangi et al. 2012). La maladie de Parkinson se caractérise par une dégénérescence des circuits neuronaux de la dopamine dans la substance noire. L'administration de PREG diminue les symptômes de la maladie. Bien que le mécanisme ne soit pas complètement élucidé, la PREG pourrait agir *via* ses propriétés neuroprotectrices et en stimulant les récepteurs sigma, responsables de la régulation de la libération de dopamine. En conséquence, la PREG pourrait constituer une piste pour soulager les symptômes, mais également ralentir l'avancement de la maladie (Ferri and Fioranelli 2014). Des résultats précliniques suggèrent que la PREG peut également jouer un rôle dans les mécanismes de régulation de l'anxiété et de la dépression (Le Melledo and Baker 2002; Bianchi and Baulieu 2012). En effet, la PREG présente des effets antidépresseurs et anxiolytiques chez la souris (Dhir and Kulkarni 2008).

Dans des essais cliniques réalisés chez des patients atteints de schizophrénie et de trouble schizo-affectif, l'administration de PREG empêche l'apparition des symptômes négatifs, mesurés à l'aide d'une échelle médicale qui évalue la sévérité des symptômes (Marx et al. 2009; Ritsner 2010). Plus récemment, une étude clinique a mis en évidence un résultat bénéfique d'un traitement avec la PREG chez des patients souffrant de trouble bipolaire en améliorant les symptômes dépressifs (Osuji et al. 2010; Brown et al. 2014). Actuellement, la prégénolone peut être prescrite pour les troubles de la mémoire liés à l'âge, pour soulager la dépression, mais aussi comme anti-inflammatoire dans le cas des douleurs liées aux rhumatismes.

Dans le cerveau, la PREG peut être convertie en sulfate de prégnénolone (PREGS) par les enzymes cytosoliques sulfotransférases, SULT2A1, SULT2B1a et SULT2B1b (Mensah-Nyagan et al. 1999; Strott 2002; Miller and Auchus 2011). Le niveau de PregS dans l'hippocampe est corrélé à la performance cognitive des rats âgés (Darnaudery et al. 2000). L'administration de PregS améliore l'apprentissage et la mémoire (Akwa et al. 2001; Mayo et al. 2001; Dastgheib et al. 2015). Chez le rat, une administration intradermique de PREGS réduit la douleur induite par la capsaïcine (Chen et al. 2006). Dans un modèle d'encéphalopathie d'origine hépatique, des administrations chroniques de PREGS améliorent la coordination motrice et facilite l'apprentissage via l'activation des récepteurs NMDA et l'inhibition des récepteurs GABA_A (Gonzalez-Usano et al. 2014). Dans un modèle de souris Alzheimer, la PREGS prévient la perte des capacités mnésiques induite par injection du peptide A β ₂₅₋₃₅ suggérant ainsi un effet neuroprotecteur de ce stéroïde neuroactif (El Bitar et al. 2014).

IV.3.2 L'Alloprégnanolone

L'alloprégnanolone (AP) est un neurostéroïde qui fait l'objet d'une attention particulière compte tenu de son implication dans la modulation des processus neurodégénératifs, neuroinflammatoires, anxiolytiques, antidépresseurs et analgésiques (Meyer et al. 2011; Bali and Jaggi 2014; Melcangi and Panzica 2014; Noorbakhsh et al. 2014; Patte-Mensah et al. 2014; Schule et al. 2014; Guennoun et al. 2015).

Les effets neuroprotecteurs de l'AP ont été démontrés dans de nombreux modèles animaux. Dans un modèle de souris reproduisant les symptômes de la maladie de Niemann-Pick type C (NP-C), une administration d'AP retarde de manière significative la perte des neurones de Purkinje, les anomalies de locomotion et de coordination motrice et la mort des animaux (Griffin et al. 2004). Chez les souris transgéniques 3xTgAD modélisent la maladie

d'Alzheimer, l'AP stimule la neurogénèse et la survie des cellules nouvellement générées dans l'hippocampe et rétablit les fonctions d'apprentissage et de mémoire (Wang et al. 2010; Chen et al. 2011; Singh et al. 2012; Sun et al. 2012). Le traitement par l'AP a montré des avantages neuroprotecteurs dans d'autres modèles expérimentaux de maladies neurodégénératives comme la maladie de Parkinson (Guennoun et al. 2015). L'AP améliore aussi la déficience cognitive chez certains modèles animaux de la maladie de Parkinson (Adeosun et al. 2012; Melcangi and Panzica 2014; Nezhadi et al. 2016). Les effets protecteurs de l'AP ont également été rapportés dans des modèles expérimentaux de neuropathies périphériques (Kawano et al. 2011; Meyer et al. 2011; Patte-Mensah et al. 2014). En effet, le traitement à l'AP empêche la perte des neurofilaments 200 dans les axones des nerfs périphériques, supprime l'allodynie et l'hyperalgie mécanique chez des rats développant des douleurs neuropathiques chimio-induites (Meyer et al. 2011; Meyer et al. 2013; Taleb et al. 2017). D'autres travaux ont montré que l'administration d'AP augmente le nombre et la proportion de fibres myélinisées de petit diamètre et diminue la fréquence des anomalies myélinisées empêchant ainsi l'apparition de malformations myéliniques (Azcoitia et al. 2003; Faroni and Magnaghi 2011).

Dans un modèle de souris MOG-EAE, qui mime la forme progressive de la SEP, le traitement à l'AP (10 mg/kg) diminue le score clinique (SC) apparenté à l'évolution des symptômes, réduit l'immunoréactivité en diminuant le taux du marqueur CD3+, dans la ME lombaire des animaux malades. De plus, l'AP qui empêche la démyélinisation en stimulant l'expression de MBP, prévient également les dommages axonaux (Noorbakhsh et al. 2011).

Chez l'Homme, plusieurs études montrent une corrélation entre une diminution du taux d'AP et la présence de maladies neurologiques. Chez les patients atteints de dépression, la concentration d'AP est diminuée dans le LCR, le plasma ou le sérum par rapport aux témoins (Schule et al. 2006; Schule et al. 2014). Dans la forme récurrente-rémittente de la

SEP, les valeurs d'AP sont significativement plus faibles dans le LCR des femmes atteintes par rapport aux femmes non malades (Orefice et al. 2016). Les niveaux d'AP mesurés en post-mortem sont réduits dans le cortex temporal des patients Alzheimer par rapport aux sujets témoins (Naylor et al. 2010; Irwin et al. 2011; Irwin et al. 2015).

L'injection intraveineuse d'AP à des femmes atteintes de nystagmus provoque une sédation et une diminution de la vitesse des mouvements oculaires (Timby et al. 2006; Bengtsson et al. 2015).

Plus récemment, une étude clinique a été réalisée chez des hommes atteints du syndrome tremblement-ataxie lié à la prématuration du chromosome X fragile. Il s'agit d'une maladie rare neurodégénérative caractérisée par un tremblement intentionnel et une ataxie de la marche. Le diagnostic est réalisé par IRM qui montre une perte globale de volume cérébral, notamment une atrophie corticale et cérébrale et des lésions hyper intenses de la substance blanche autour de la zone périventriculaire et au centre des pédoncules cérébelleux. L'injection intraveineuse d'AP pendant 12 semaines a permis aux patients d'améliorer leurs fonctions exécutives, l'apprentissage et leur capacité mnésique (Wang et al. 2017). Les résultats de cette étude ont également démontré une bonne tolérance des patients à l'AP sans effets secondaires déclarés.

OBJECTIFS DE LA THESE

La SEP se définit donc comme une maladie inflammatoire auto-immune: le système immunitaire du patient, normalement responsable de sa défense contre les infections externes, s'attaque à la myéline de son cerveau et de sa ME pour des raisons encore mal connues. Des progrès ont été réalisés dans la lutte contre les processus inflammatoires impliqués dans la SEP mais à ce jour, il n'existe pas de médicaments neuroprotecteurs efficaces pour lutter contre les dommages neuronaux subséquents aux atteintes de la myéline alors que ces dommages sont responsables du handicap et des symptômes neurologiques graves. Par ailleurs, les traitements actuellement disponibles peuvent provoquer des effets indésirables tels que le syndrome pseudo-grippal transitoire (température élevée, fatigue, courbatures, maux de tête...), une atteinte du foie et favoriser, à long terme, de l'ostéoporose et de l'hypertension. Etant donné que la SEP se déclenche souvent chez des personnes jeunes qui sont obligées de recevoir les traitements tout au long de leur vie, il y a un risque réel pour ces personnes de subir à long terme des conséquences délétères liées aux effets secondaires des médicaments contre la SEP. Ainsi, l'identification de nouveaux médicaments efficaces contre la SEP sans effets secondaires majeurs au long cours représente un sérieux défi pour la recherche biomédicale. L'attente du monde médical est aussi très forte pour trouver des médicaments qui permettraient une prise en charge efficace des atteintes axonales et/ou neuronales résultant des anomalies de la myéline chez les patients SEP.

Depuis quelques années, les chercheurs de l'Unité INSERM U1119 mènent une recherche multidisciplinaire active dans le domaine de la neuroprotection pour la caractérisation de nouveaux neuroprotecteurs dans des modèles cellulaires ou animaux de la maladie d'Alzheimer et des neuropathies chimio-induites (Schaeffer et al. 2008; Schaeffer et

al. 2008; Meyer et al. 2010; Patte-Mensah et al. 2010; Schaeffer et al. 2010; Meyer et al. 2011; Klein et al. 2013; Meyer et al. 2013; Patte-Mensah et al. 2014; Wendt et al. 2014). Ces travaux, ainsi que diverses autres données de la littérature, suggèrent que les neurostéroïdes et les composés modulateurs de la neurostéroïdogénèse (biosynthèse des neurostéroïdes) tels que les ligands du *translocator protein* (LTSPo) pourraient servir à élaborer des stratégies efficaces contre les maladies neurodégénératives et/ou neurologiques comme la SEP (Papadopoulos et al. 2006; Rupprecht et al. 2009; Rupprecht et al. 2010; Barron et al. 2013; Brinton 2013; Daugherty et al. 2013; Patte-Mensah et al. 2014; Scholz et al. 2015). Il est également bien démontré que le TSPO est fortement impliqué dans la modulation des réponses inflammatoires et des processus neuroinflammatoires (Pawlikowski 1993; Vowinckel et al. 1997; Qi et al. 2012; Karlstetter et al. 2014; Wang et al. 2014). En particulier, des études récentes ont montré que le ligand TSPO, XBD173 ou encore nommé Emapunil, qui exerce des effets anxiolytiques sans induire d'actions indésirables comme le font les BZ, est efficace à faible dose (10 mg/kg) pour contrecarrer les processus neuroinflammatoires et protéger contre la dégénérescence rétinienne chez la souris (Scholz et al. 2015). Alors que ces résultats ont suscité l'espoir de développer des thérapies basées sur l'utilisation du XBD173 pour traiter la neuro-inflammation évoquée par la SEP et prévenir les symptômes neurologiques, de façon surprenante, une étude antérieure a rapporté une absence d'efficacité du XBD173 à la dose de 30 mg/kg dans le modèle de souris EAE-MOG qui mime la forme progressive de la SEP humaine (Ravikumar et al. 2016).

Au regard des données rappelées ci-dessus, le principal but du travail de thèse est d'évaluer la capacité du XBD173, à exercer des effets neuroprotecteurs pouvant faciliter la suppression ou l'amélioration des symptômes neurologiques des modèles de souris EAE. Nous nous sommes plus particulièrement intéressés au modèle EAE-PLP qui mime la forme rémittente-récurrente affectant la majorité (plus de 85%) des patients SEP. Néanmoins, nous

avons également fait quelques vérifications des effets du XBD173 dans le modèle EAE-MOG. Nos travaux ont été réalisés avec une approche pluridisciplinaire associant des techniques comportementales, pharmacologiques, histologiques, biochimiques et moléculaires.

Pour atteindre notre objectif, nous avons dans un premier temps évalué les effets du XBD173 à 3 doses (10, 15 et 20 mg/kg) sur la symptomatologie de la maladie. Pour cela, des souris femelles âgées de 8-10 semaines, SJL/J Rj ou des mâles C57BL/6J, ont été immunisées respectivement avec la protéine PLP (EAE-PLP) ou avec la protéine MOG (EAE-MOG). Compte-tenu des effets bénéfiques provoqués par le XBD173 sur la symptomatologie des souris EAE-PLP, nous avons poursuivi les études par des analyses immunohistochimiques et de biologie moléculaire sur les cerveaux et moelles épinières des souris SJL/J Rj, évaluant l'expression d'un marqueur spécifique de la myéline (la protéine basique de la myéline ou MBP) et d'un marqueur neuronal et axonal (le neurofilament 200 ou NF200). Nous avons également étudié l'effet de XBD173 sur quelques cytokines pro-inflammatoires, qui jouent un rôle majeur dans le développement des pathologies autoimmunes. Nous avons donc utilisé la cytométrie en flux pour déterminer l'effet du traitement XBD173 sur la concentration sérique d'interleukine-17 (IL-17), d'interleukine-6 (IL-6), du facteur de nécrose tumorale (TNF- α) et de l'interféron γ (INF- γ) chez les souris EAE-PLP. En clinique humaine, la phase inflammatoire de la SEP est couramment traitée par l'interféron beta (IFN- β) qui agit principalement sur la production des cytokines. Nous avons cherché à savoir si l'administration concomitante de XBD173 et d'IFN- β aurait un effet synergique pour empêcher ou retarder l'apparition des symptômes. Enfin, nous avons utilisé la méthode ELISA pour doser les concentrations d'AP dans le cerveau des animaux traités au XBD173. Le mécanisme d'action du XBD173 n'est pas complètement élucidé, mais plusieurs études ont montré que l'activation du TSPO par le XBD173 entraîne une stimulation de la synthèse

des neurostéroïdes, en particulier de l'AP qui exerce des effets neuroprotecteurs et anti-inflammatoires dans divers modèles expérimentaux, nous avons donc voulu vérifier si cette hypothèse est plausible pour expliquer certaines de nos observations.

MATERIELS ET METHODES

I LES MODELES ANIMAUX

Des souris femelles SJL/J Rj ou des souris mâles C57BL6/J de huit, neuf ou dix semaines, ont été utilisées pour les différentes expériences. La manipulation des animaux a été effectuée conformément aux directives du Conseil de la Communauté européenne (86/609 / EC) et à l'agrément délivré par le Département de la santé publique vétérinaire d'Alsace (Agrément numéro 67-186). Les animaux proviennent de la société commerciale Janvier Labs (Le Genest-St-Isle, France). Ils ont été soumis à des conditions de laboratoire standards de photopériode de 12h de jour/ 12h de nuit avec de la nourriture et de l'eau à volonté, et dans des cages enrichies en accessoires. Avant de commencer les expériences, les animaux ont été acclimatés pendant une semaine à l'animalerie et habitués aux expérimentateurs.

II IMMUNISATION DES SOURIS

L'EAE a été induite chez des souris SJL/J RJ, anesthésiées sous isoflurane (Iso-Vet, Grammichele CT, Italie), par injection sous-cutanée d'une émulsion contenant 150 µg du fragment 139-151 de la protéine protéolipidique (PLP₁₃₉₋₁₅₁) (Eurogentec, Liège, Belgique) et de l'adjuvant complet de Freund (1:1, vol/vol) dans les deux côtés des flancs arrières (100 µL par flanc). Le CFA (Complete Freund's Adjuvant) est préparé à partir de l'adjuvant incomplet de Freund (Santa Cruz Biotechnology, INC, Heidelberg, Allemagne) avec du Mycobacterium tuberculosis (Difco Laboratories, Franklin Lakes, NJ) à 5 mg/ml. Ensuite, les souris ont reçu 200 ng de pertussis toxine (Enzo lifes sciences, Lausen, Suisse) dissout dans 200 µl de solution tampon phosphate salin stérile (PBS) par voie intrapéritonéale (i.p) le jour 0 et le jour 2 post-immunisation (J0 et J2). Les souris contrôles reçoivent les injections de pertussis

toxine et de l'émulsion contenant le CFA et le PBS sans le peptide PLP₁₃₉₋₁₅₁. Ces animaux ne développent donc pas la maladie.

L'EAE a été induite chez les souris C57BL/6J, anesthésiées sous isoflurane (Iso-Vet, Grammichele CT, Italie), par injection sous-cutanée d'une émulsion préparée par Hooke Laboratories (Hooke KitTM MOG₃₅₋₅₅/ CFA Emulsion PTX; Hooke Laboratories; Lawrence, États-Unis) au niveau cervical et au niveau lombaire (125 µL par site d'injection). Ensuite, les souris ont reçu 100 µL de pertussis toxine, par i.p, le jour 0 et le jour 1 post-immunisation (J0 et J1), contenue dans le kit. Les souris contrôles ont reçu une solution stérile de PBS aux mêmes niveaux d'injections et par les mêmes voies d'administrations. Ces animaux ne développent donc pas la maladie.

III SUBSTANCES PHARMACOLOGIQUES

Le XBD173 a été synthétisé par nos partenaires chimistes (Docteur François Hallé et Docteur Frédéric Bihel) selon la procédure expérimentale rapportée dans la publication Zhang et al (Zhang et al. 2007). L'effet du XBD173 est étudié chez les souris immunisées. Ces souris, groupe XBD173, ont reçu 200 µL de XBD173 par voie i.p, à une dose de 10, 15 ou 20 mg/kg préparée dans de l'hydroxypropylcellulose (HPC) à 0,3% (Alfa Aesar, Haverhill, Massachusetts, États-Unis). Le groupe véhicule représente les souris immunisées et injectées (par voie i.p) par 200 µL d'HPC 0,3% (souris-veh). Les souris ont été traitées tous les deux jours à partir de J4 post-immunisation jusqu'à la mise à mort des animaux. Les souris contrôles n'ont pas reçu d'injection pendant l'expérience.

Des souris immunisées ont reçu de l'interféron bêta (IFN-β) à raison de 20 000 UI d'IFN-β (Tebu-bio, France) dilué dans du PBS par injection i.p de 200 µL. Les souris ont été traitées tous les deux jours à partir du jour 4 post-immunisation jusqu'à leur mise à mort. Le groupe véhicule de souris immunisées a été injecté avec la solution de PBS.

IV ETUDE DE L'ACTION DU XBD173 SUR LES SCORES CLINIQUES (SC), LE POIDS ET L'EVALUATION LOCOMOTRICE

IV.1 Principe du score clinique (SC)

Le SC est l'outil qui permet d'évaluer le niveau de paralysie des animaux. Une valeur est attribuée quotidiennement après plusieurs observations cliniques.

IV.2 Echelle des SC

L'évaluation clinique des symptômes a été effectuée selon l'échelle standard de classement des symptômes EAE. L'échelle varie de 0 à 10 (Tableau 1).

Echelle	Signes cliniques	Commentaires
0	Pas de signe clinique	Marche normale, la queue peut se soulever, s'envelopper autour d'un objet rond si la souris est maintenue à la base de la queue
1	Queue partiellement paralysée	Marche normale, pointe de la queue paralysée
2	Queue paralysée	Marche normale, la queue est totalement paralysée, elle ne peut plus se soulever
3	Parésie des membres postérieurs, mouvement non coordonné	Démarche non coordonnée, queue paralysée, les membres postérieurs répondent au pincement
4	Un membre postérieur paralysé	Démarche non coordonnée, queue arrière paralysée, un membre postérieur ne répond pas au pincement
5	Deux membres postérieurs paralysés	Démarche non coordonnée avec les deux membres postérieurs qui traînent, queue paralysée, les deux membres postérieurs ne répondent pas au pincement
6	Membres postérieurs paralysés, faiblesse des membres antérieurs	Démarche non coordonnée avec les membres antérieurs qui lutte pour avancer, membres postérieurs paralysés et queue paralysée
7	Les membres postérieurs sont paralysés, un membre antérieur paralysé	La souris ne peut pas se déplacer, un membre antérieur ne répond pas au pincement, paralysie des membres postérieurs et de la queue
8	Les membres postérieurs et antérieurs sont paralysés	La souris ne peut pas se déplacer, les deux membres antérieurs ne répondent pas au pincement, paralysie des membres postérieurs et de la queue
9	Moribond	Pas de mouvement, respiration altérée
10	Mort de la souris	

Tableau 1: Echelle des scores cliniques

IV.3 Protocole expérimental de la mesure du poids et de l'évaluation du SC

Tous les jours, de J0 au jour de la mise à mort des souris, les animaux sont pesés au même moment de la journée. Ensuite, l'évaluation des SC est effectuée. Pour cela, la souris est placée dans un Open field 1 à 2 minutes et est observée par deux expérimentateurs, puis manipulée, avant l'attribution du SC.

IV.4 Evaluation de l'activité locomotrice par le test du Catwalk

IV.4.1 Principe

Le système CatWalk (CatWalk XT, Noldus Information Technology, Pays-Bas) est un test comportemental, qui peut être utilisé pour le rat ou la souris. Il permet d'évaluer les problèmes locomoteurs et les modifications de la locomotion dans différents types de pathologies. Ce test permet d'évaluer les données relatives à l'empreinte de la patte de l'animal comme par exemple la taille de chaque empreinte, la surface de contact moyenne et maximale de l'empreinte, l'écartement des doigts, la zone de contact maximale de la patte sur la plateforme. Il permet aussi de mesurer les différents paramètres liés aux interactions dynamiques et à la démarche comme par exemple la longueur de la foulée, la vitesse de déplacement de l'animal.

Le CatWalk se compose d'une passerelle en verre éclairée par une lumière fluorescente (Fig. 20 A). Le système contient une caméra couleur haute vitesse connectée à un ordinateur avec le logiciel de détection approprié (CatwalkXT9.1). L'animal traverse le couloir et ses empreintes sont détectées et capturées, puis enregistrées (Fig. 20 B). Pour une traverser complète de la passerelle, le temps est limité entre 0,50 et 10 secondes. Une variation de vitesse autorisée maximale de 60% est nécessaire pour que les passages soient

considérés comme valides. Pour valider le passage de l'animal, il doit traverser le couloir dans le délai imparti et sans s'arrêter. Il est recommandé de réaliser 3 passages par souris ou rats.

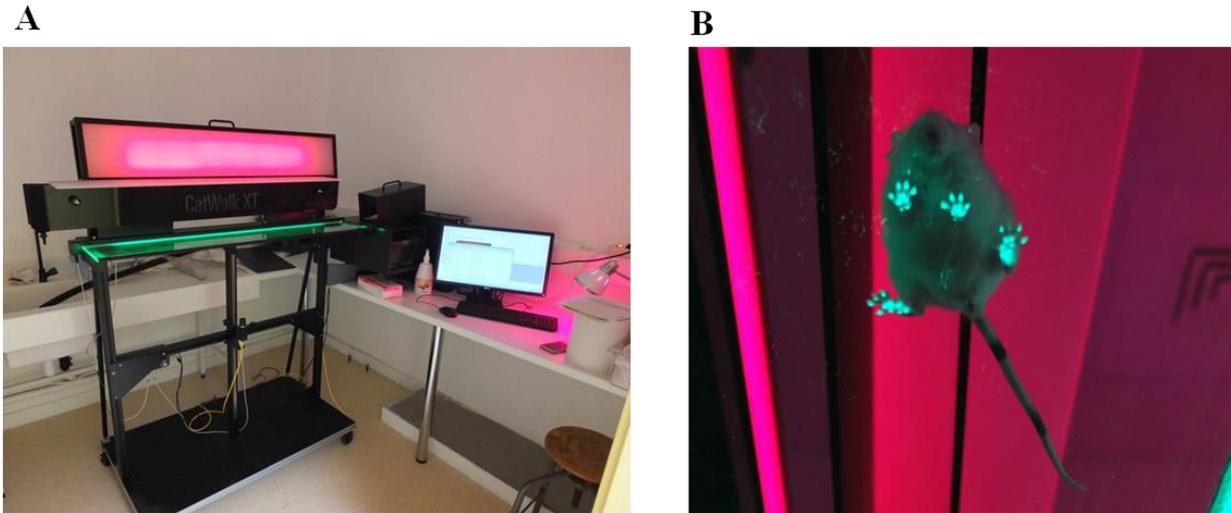


Fig. 20: Test comportemental du Catwalk

(A) Présentation du système Catwalk. (B) Empreintes des pattes de la souris détectées par le système Catwalk.

IV.4.2 Protocole expérimental

Le test Catwalk a été réalisé, 2 fois par semaines, tout au long de la session, à partir de J3. Il a été effectué chez les groupes contrôle, véhicule, XBD 10 et 20 mg/kg. Cependant, ce test comportemental a été réalisé chez les souris jusqu'à ce qu'elles atteignent le SC de 4, c'est à dire lorsqu'il y a un membre postérieur paralysé. A partir de ce SC, il n'était plus possible pour l'animal de traverser la plateforme dans le temps imparti. Par conséquent, la taille de l'échantillon pour chaque groupe diffère entre chaque session. Le test a été effectué dans une pièce sombre. De ce fait, avant chaque expérience les animaux sont placés dans la salle d'expérimentation 20 min avant l'expérience, afin que les souris s'habituent à la pièce

d'expérimentation. De plus, les souris ont également été habituées au système Catwalk. Pour cela 3 jours avant l'immunisation, les animaux ont traversé une seule fois le couloir du Catwalk sans enregistrement. Le logiciel mesure divers paramètres, y compris la zone de contact maximale des pattes sur la plateforme en cm^2 , c'est ce critère qui sera analysé (Fig. 20 B). Les résultats de ce paramètre seront exprimés comme la valeur moyenne des deux pattes postérieures.

V CONSERVATION DES TISSUS

Pour chaque groupe, la moitié des animaux a été mis à mort au pic de la maladie (J14) et l'autre moitié avant la rechute, c'est-à-dire à J24. Les animaux ont été anesthésiés avec un mélange de kétamine (200 mg/kg) et de Rompun (20 mg/kg) (Centravet, France). Le sang a été prélevé en intracardiaque et centrifugé à 1500g à 4°C, pendant 30 min. Le sérum a été conservé à -80 °C. Avant les prélèvements tissulaires, le nombre (effectif) d'animaux dans chaque groupe est divisé en deux sous-groupes. Les tissus (cerveaux, ME) prélevés chez les individus du premier sous-groupe sont congelés dans de l'azote liquide et stockés à -80°C pour les expériences de biologie moléculaire. Les prélèvements tissulaires effectués chez les individus du second sous-groupe ont servi pour les expériences d'immunologie après une étape de fixation dans une solution de paraformaldéhyde (PFA) 4% pendant 72 h à 4°C. Ces prélèvements ont ensuite été immergés dans du PBS contenant 15% de sucrose pendant 24 h puis transférés dans une solution de PBS/sucrose 30% pendant 24 h. Enfin, les tissus ont été inclus dans du gel O.C.T (OCT, Tissue-Tek, Reichert-Jung, Nussloch, Allemagne) et immédiatement congelés à -80°C.

VI ANALYSE DE L'EXPRESSION DES GENES CODANT MBP, NF200 ET CRMP2

VI.1 Principe générale d'une RT-PCR

La transcription inverse (*reverse transcription* ou RT) consiste à copier *in vitro* des ARN totaux, extraits des tissus étudiés, en ADN complémentaire (ADNc) grâce à l'action de l'enzyme transcriptase inverse. La PCR (Polymerase chain reaction ou réaction de polymérase en chaîne) est une technique d'amplification d'ADN *in vitro*. Elle permet d'obtenir un très grand nombre de copies d'une séquence choisie, en faisant intervenir une ADN polymérase. Un fragment de l'ADNc cible est multiplié en utilisant un couple d'amorces spécifiques correspondant à la séquence d'ADN d'intérêt. Chaque cycle de PCR est constitué de 3 étapes: *i*) la dénaturation de l'ADN pour séparer les deux brins de l'hybride ARN/ADNc; *ii*) l'hybridation d'oligonucléotides spécifiques (amorces) aux extrémités de la séquence recherchée, à une température d'hybridation spécifique; *iii*) l'élongation grâce à l'action d'une ADN polymérase thermostable (Taq polymerase) à partir des oligonucléotides. Ce cycle est répété un grand nombre de fois, pour obtenir une multiplication exponentielle de la séquence d'ADN cible.

VI.2 Principe de la PCR quantitative en temps réel ou RT-qPCR

Au cours d'une PCR conventionnelle, il y a une relation entre la quantité de la séquence cible de départ et la quantité de produits amplifiés (ou amplicons) à n'importe quel cycle. Cependant en pratique, les PCR peuvent donner des taux différents d'amplicons. Le développement de la RT-qPCR a permis d'éliminer les variabilités traditionnelles qu'on retrouve avec la PCR conventionnelle grâce à la quantification du produit de PCR de façon

fiable. Le principe de la RT-qPCR est basé sur la détection et la quantification d'une molécule fluorescente (le SYBR Green) dont l'émission est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons générés pendant la réaction de PCR. Cette technique quantitative détecte la fluorescence émise pendant toute la réaction avec un indicateur de production des amplicons durant chaque cycle, alors que dans la PCR conventionnelle les amplicons ne sont détectés qu'à la toute fin du processus.

VI.3 Protocole

VI.3.1 Extraction des ARN

Après la mise à mort des souris, les tissus (cerveaux et ME) sont prélevés et immédiatement congelés dans de l'azote liquide, puis stockés au -80°C . Le jour de l'extraction des ARN, les trois zones d'intérêts du cerveau sont prélevées: le cervelet, le corps calleux et le cortex, ainsi que la zone lombaire de la ME. Les ARN totaux sont ensuite extraits. Cette extraction est réalisée par homogénéisation des tissus dans le réactif NucleoZOL en suivant les instructions du fabricant (Macherey-Nagel, Hoerd, France). En résumé, 300 μL de NucleoZOL sont placés dans le tube contenant soit 6 ou 20 mg de tissu (6 mg pour la zone corps calleux de l'encéphale et 20 mg de tissu pour toutes les autres zones) (Fig. 21). La solution de NucleoZOL est complétée par un rajout d'eau stérile Rnase Free. Il y a séparation de la phase aqueuse contenant les ARN de la phase organique contenant les protéines et l'ADN. La séparation des différentes phases est améliorée par une centrifugation à 12 000g pendant 15 min à 4°C . Les ARN sont prélevés et précipités à l'isopropanol pendant 10 min à température ambiante. Après une centrifugation à 12 000g pendant 10 min à 4°C , les ARN contenus dans le culot sont dissous dans de l'eau stérile nucléase free. Afin de s'assurer de la qualité des ARN dans les extraits, la mesure de la densité optique des échantillons est

réalisée à deux longueurs d'onde d'absorption, 260 nm et 280 nm. Les ARN sont considérés de bonne qualité lorsque le rapport $DO_{260\text{ nm}}/DO_{280\text{ nm}}$ est supérieur à 1,7. L'absorbance à 260 nm permet aussi de calculer la concentration des ARN contenus dans le culot de centrifugation. Sachant qu'une mesure de DO à 260 nm correspond à 40 ng/μL d'ARN totaux, la concentration en ng/μL est donnée par la formule: $[ARN]_{\text{totaux}} = DO_{260\text{ nm}} \times 40$. Les ARN sont stockés à -80°C jusqu'à la réalisation de la transcription inverse.

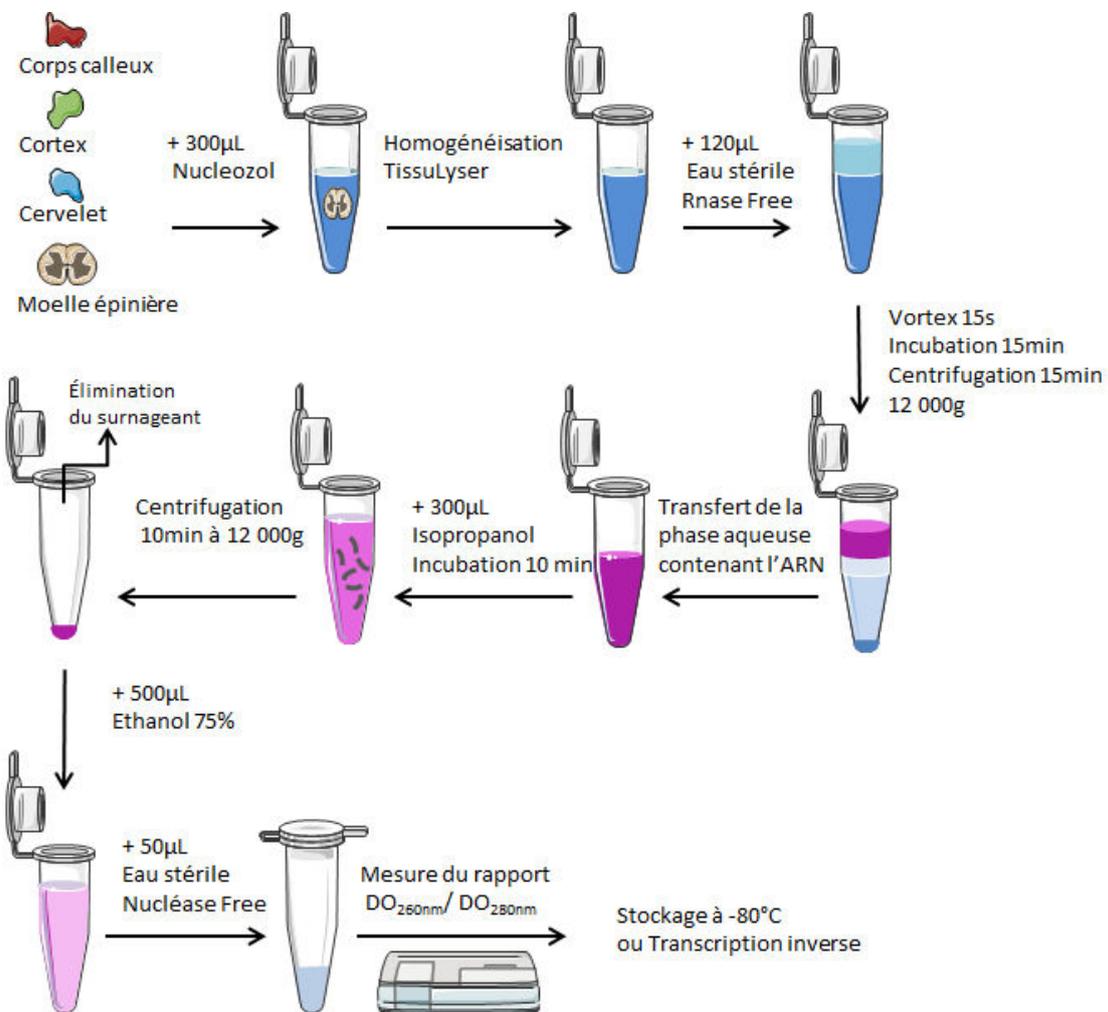


Fig. 21: Principales étapes de l'extraction des ARNs

VI.3.2 Reverse Transcription

La synthèse d'ADNc par RT est réalisée à partir de 1 µg d'ARN total en présence de 8 µL d'iScript RT Supermix (Bio-Rad, Californie, États-Unis), et d'eau nucléase-free pour un volume final de 40 µL. La réaction est incubée dans un thermocycleur (Bio-Rad, Californie, États-Unis), avec le protocole suivant, 5 min à 25 °C, 30 min à 42 °C, 5 min à 85 °C (Fig. 22). Puis les échantillons d'ADNc sont stockés au -80°C jusqu'à la réalisation de la qPCR.

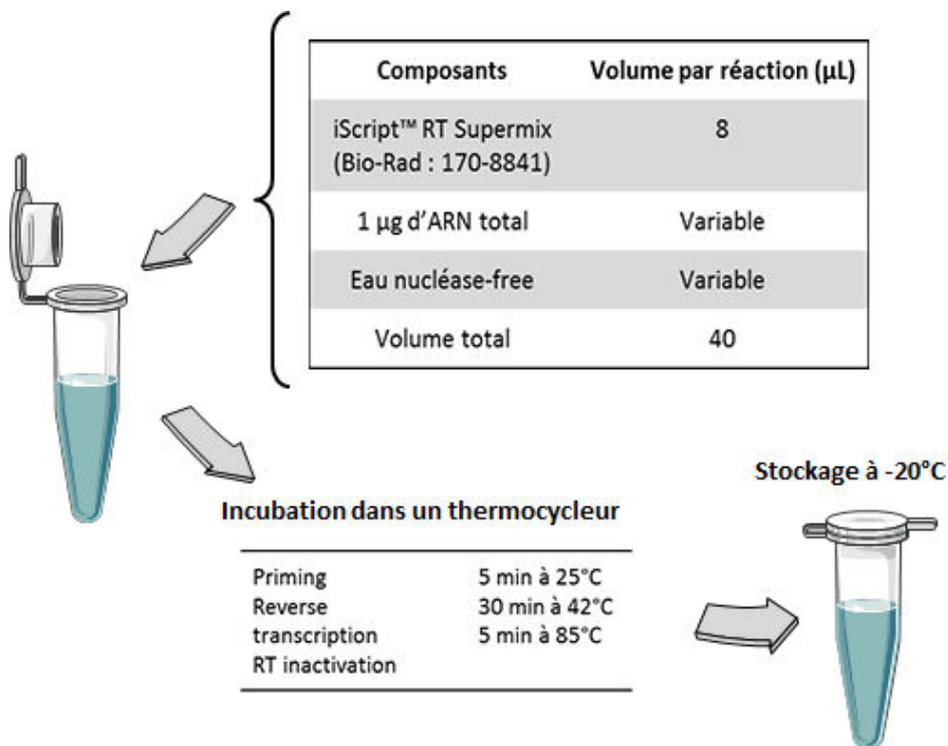


Fig. 22: Tableau récapitulatif des produits nécessaires à la RT et les étapes de l'incubation.

VI.3.3 PCR quantitative en temps réel ou RT-qPCR

Cette technique est réalisée à l'aide d'un iCycler (Bio-Rad, Californie, États-Unis). Les sondes spécifiques utilisées pour la RT-qPCR des gènes MBP, NF200 et CRMP2 proviennent de Bio-Rad (Californie, États-Unis) et ne sont pas communiquées.

Les gènes domestiques utilisés ont été HMBS (hydroxymethylbilane synthase) pour les études dans la moelle épinière et la Cyclophiline A pour celles réalisées dans le cortex, le corps calleux et le cervelet.

Les sondes spécifiques des gènes domestiques pour HMBS et Cyclophiline A (Eurogentec, Liège, Belgique) sont les suivants:

Pour HMBS:

- sens: 5'-GAT-GGG-CAA-CTG-TAC-CTG-ACT-G-3'
- antisens: 5'-CTG-GGC-TCC-TCT-TGG-AAT-G -3'

Pour cyclophiline A:

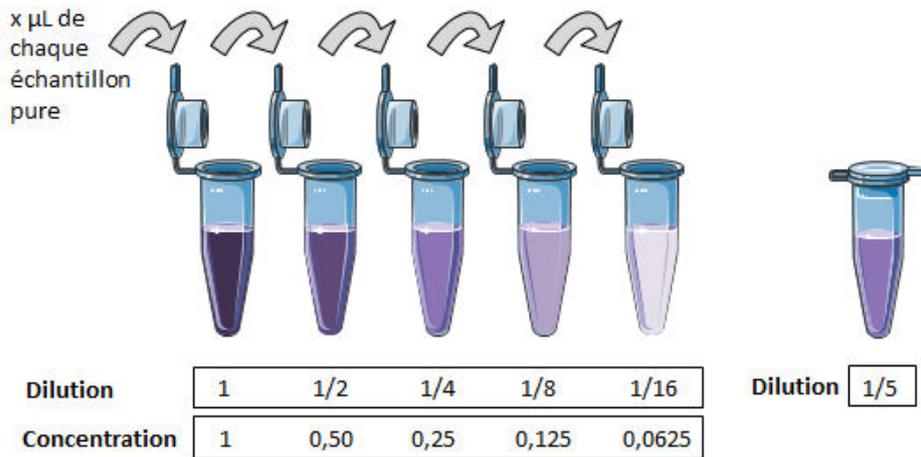
- sens: 5'-GTG-GCA-AGA-TCG-AAG-TGG-AGA-AAC-3'
- antisens: 5'-TAA-AAA-TCA-GGC-CTG-TGG-AAT-GTG-3'

La RT-qPCR est effectuée dans un volume final de 20 μ L contenant 2 μ L d'ADNc, 2 μ L d'amorces sens et antisens, 10 μ L du kit *SYBR Supermix* (Bio-Rad, Californie, États-Unis) contenant la SYBR Green, la *Taq polymerase* et les dNTPs et 6 μ L d'eau nucléase free (Fig. 23). Pour valider les données RT-qPCR, une gamme standard a été réalisée avec des dilutions successives d'ADNc, de sorte que la gamme de concentrations des échantillons pour la courbe standard est plus large que la gamme des concentrations des échantillons analysés.

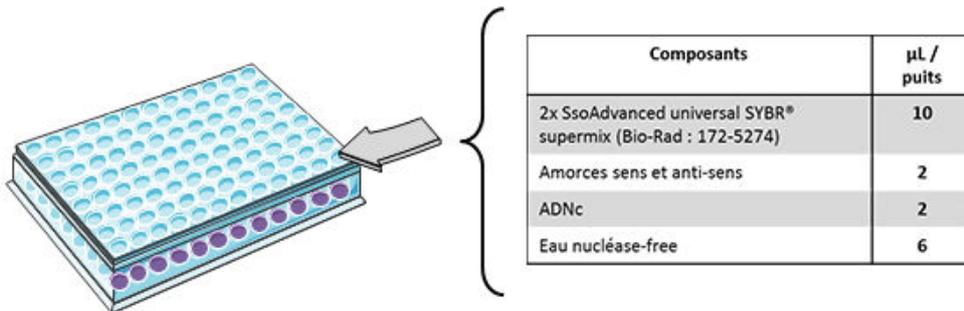
Le programme d'amplification consiste en une étape de dénaturation de 2 min à 95°C, suivie de plusieurs cycles d'amplification comprenant une étape de dénaturation (5 sec à 95°C), d'hybridation et d'élongation avec une température à 65°C pendant 30 sec. La spécificité des produits de RT-qPCR est vérifiée par une analyse des courbes de fusion obtenues à partir des

températures de fusion qui caractérisent de manière spécifique chacun des gènes étudiés. La RT-PCR quantitative analyse les amplicons au début de l'amplification (point de sortie ou *crossing point*), là où la différence quantitative est la plus importante entre les échantillons. En effet, le point de sortie, défini comme le point d'intersection entre la tangente de la phase ascendante de l'amplification et la tangente de base de la phase initiale, est directement proportionnel au nombre de copies d'ADNc déjà présentes dans l'échantillon avant l'amplification. Plus le nombre de copies est important, plus le point de sortie se fera tôt dans le cycle. La gamme standard permet de définir une droite logarithmique représentant les valeurs des points de sortie de l'amplification du gène de la protéine d'intérêt, en fonction du logarithme du nombre de copies de ce même gène détectées au cours de la RT-qPCR. Les valeurs des points de sortie des échantillons sont placées sur la droite logarithmique déterminant ainsi le nombre de copies des gènes d'intérêt. Le taux d'ARN messagers (ARNm) présents dans les zones étudiées est calculé après normalisation par rapport au gène de référence. Pour cela, le rapport "SQ (starting quantity) de l'échantillon / SQ référent" a été calculé. Les résultats sont exprimés en moyenne (\pm SEM).

• Gamme standard



• Déposer dans chaque puits (standards, échantillons et contrôles) les composants suivant :



• Polymerase chain reaction (Thermocycleur CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System)

Etape	Température	Durée	Nombre de cycle
Activation	95°C	2 min	1
Dénaturation	95°C	5 sec	40
hybridation/extension	65°C	30 sec	40
Melt Curve	65°C-95°C (0,5°C incréments)	5 sec/étape	1

• Analyse via le logiciel Bio-Rad CFX Manager

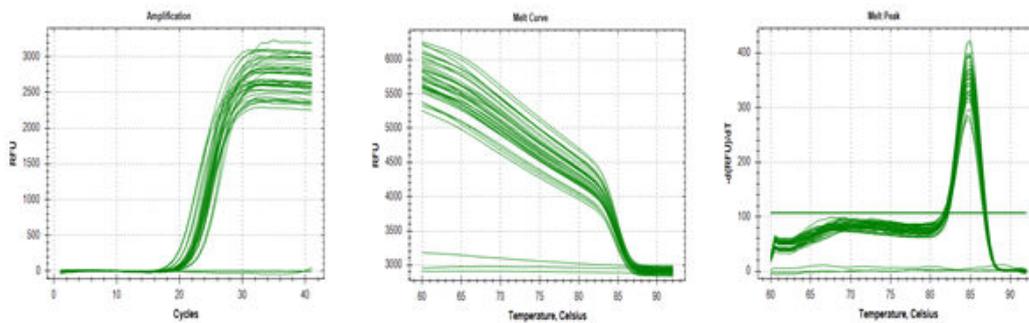


Fig. 23: Principales étapes de la PCR quantitative en temps réel

VII EXPRESSION DES PROTEINES MBP ET CRMP2 DANS LE CERVEAU ET LA MOELLE EPINIÈRE

VII.1 Principe de la technique d'immunofluorescence

La technique d'immunofluorescence est basée sur le principe de la reconnaissance spécifique d'un antigène par son anticorps (anticorps primaire) et la révélation de ce complexe antigène-anticorps par un anticorps secondaire couplé à un fluorochrome.

VII.2 Préparation des coupes

Après avoir fixé les tissus (Cerveau et ME) dans une solution de paraformaldéhyde (PFA) 4% pendant 72 h à 4°C, les tissus ont été immergés dans du PBS contenant 15% de sucrose pendant 24 h puis transférés dans une solution de PBS/sucrose 30% pendant 24 h. Les tissus ont ensuite été inclus dans l'OCT (OCT, Tissue-Tek, Reichert-Jung, Nussloch, Allemagne) et immédiatement congelés à -80°C. Les tissus ont ensuite été coupés transversalement en sections fines de 15 µm avec un cryostat CM1950 (Leica, Wetzlar, Allemagne). Les coupes, déposées sur des lames Superfrost Plus (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Etats-Unis), ont été conservées à -20°C jusqu'à leur utilisation.

VII.3 Réaction immunohistochimique

Après la fixation des lames dans du PFA 4% pendant 15 minutes, les tissus ont été perméabilisés avec de l'éthanol à 100% pendant 5 minutes. Les sites de liaison non spécifiques ont été bloqués avec une solution contenant 5% de sérum de veau foetal (Fisher scientifique, Massachusetts, États-Unis) dans du PBS pendant 20 minutes à température ambiante. Par la suite, les coupes de ME et de cerveau ont été incubées pendant une nuit à

4°C en chambre humide, avec soit l'anticorps polyclonal de lapin contre la protéine basique de myéline (MBP) diluée à 1:250^{ème}, dans du PBS contenant 5% de sérum de veau foetal (Abcam, Cambridge, Royaume-Uni), soit avec l'anticorps monoclonal de lapin contre la protéine médiateur de réponse à la collapsine (CRMP2 ou Collapsin response mediator protein) diluée à 1:150^{ème}, dans du PBS contenant 5% de sérum de veau foetal (Abcam, Cambridge, Royaume-Uni). Le lendemain les lames ont été rincées trois fois de suite dans du PBS (15 minutes / rinçage) puis elles ont été transférées pendant 2 h dans une solution contenant l'anticorps secondaire de chèvre anti-lapin conjugué à l'Alexa-488 (Abcam, Cambridge, Royaume-Uni) dilué au 1:500^{ème} dans du PBS. Pour finir, les lames ont été rincées pendant 45 minutes dans du PBS et montées en milieu glycérol (Abcam, Cambridge, Royaume-Uni). Bien que la spécificité des anticorps ait déjà été démontrée, des expériences de contrôle interne ont été effectuées telles que la substitution de l'anticorps primaire MBP avec la solution de 5% de sérum de veau foetal dans du PBS et le remplacement de l'anticorps secondaire par du sérum de lapin non-immunisé. Les préparations ont été examinées grâce à un microscope fluorescent Olympus u-TBI 90 (Shinjuku, Tokyo, Japon). Les images ont été traitées à l'aide du logiciel Olympus cellSens Dimension Desktop fourni avec le microscope. Pour les coupes de ME, la quantification de l'immunofluorescence MBP a été réalisée dans la substance blanche. La quantification a été établie sur une zone de 17 000 μm^2 . Pour les coupes d'encéphale, le comptage de MBP a été effectué dans les trois régions d'intérêts. Une zone de 70 000 μm^2 a été sélectionnée pour le cortex et une zone de 20 000 μm^2 a été choisie pour le corps calleux et le cervelet. Les résultats sont donnés en pourcentage moyen de la zone d'immunofluorescence du marquage MBP sur la région totale de la zone d'intérêt.

Pour une autre partie des lames, après qu'elles ont été incubées pendant une nuit à 4°C en chambre humide avec l'anticorps polyclonal de lapin dirigé contre la protéine MBP dilué à 1: 250 dans du PBS contenant 5% de sérum de veau foetal (Abcam, Cambridge, Royaume-

Uni), l'anticorps MBP a été révélé grâce à des IgG anti-lapin biotinylé (Vectastain®, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) et du complexe Avidin-Biotin (kit ABC-peroxydase, Vectastain®, Vector Laboratories), puis révélé avec un substrat SG (Vector ® SG SK-4700, Vector Laboratories). Les lames ont été visualisées à l'aide d'un microscope Nikon® SMZ18 connecté à un appareil photo numérique Nikon® Digital Sight DS-Fi2.

VIII EFFET DU XBD173 SUR LA CONCENTRATION SERIQUE DE CYTOKINES

VIII.1 Principe de la cytométrie en flux

Pour réaliser le dosage de cytokines pro- et anti-inflammatoires, nous avons utilisé le kit de cytokine BD™ CBA Th1 / Th2 / Th17 (BioScience, Montana, Etats-Unis). Il permet de mesurer l'interleukine-17A (IL-17A), l'interleukine-6 (IL-6), le facteur de nécrose tumorale (TNF- α), et l'interféron γ (IFN- γ).

Les kits BD CBA utilisent des billes de tailles connues et fluorescentes, permettant de réaliser les analyses en cytométrie en flux. Sept populations de billes, présentant des intensités de fluorescence distinctes, vont être couplées à des anticorps spécifiques de IL-17A, IL-6, TNF- α et IFN- γ (Fig. 24). Les anticorps sont conjugués à la phycoérythrine (PE), qui fournit un signal fluorescent proportionnel à la quantité de cytokines liées.

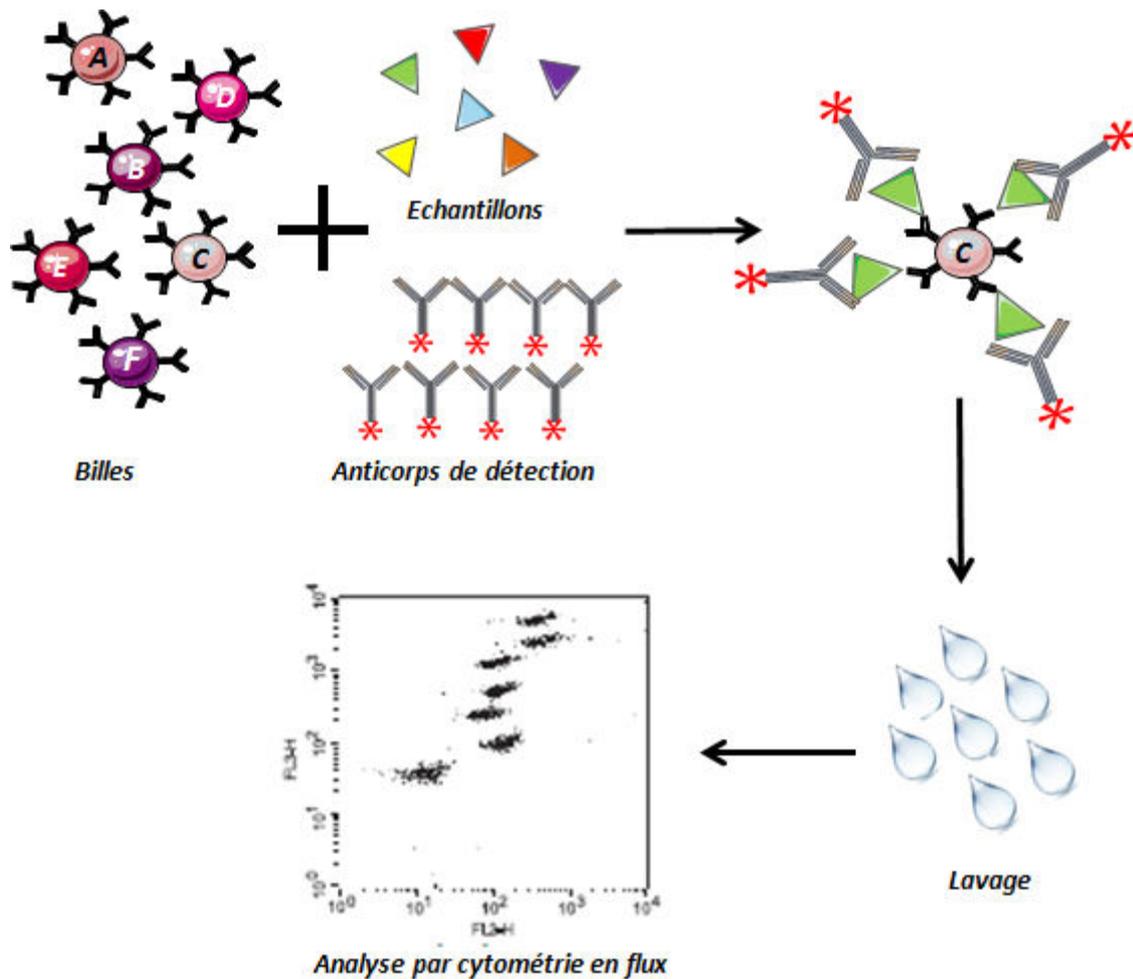


Fig. 24: Principales étapes du principe de la cytométrie en flux

Des billes aux propriétés fluorescentes distinctes et respectivement couplées à des anticorps de détection spécifiques des cytokines pro-inflammatoires d'intérêts sont mis en présence des échantillons. Les anticorps conjugués à la phycoérythrine (PE) se lient aux échantillons couplés aux billes. Après lavage, les concentrations cytokiniques sont déterminées en comparaison à une courbe standard via le logiciel FCAP ArrayTM.

VIII.2 Protocole expérimental

Le sang a été prélevé par voie intracardiaque après anesthésie des souris et centrifugé à 1500g, pendant 30 min à 4°C. Le sérum a été conservé à -80°C. Différentes

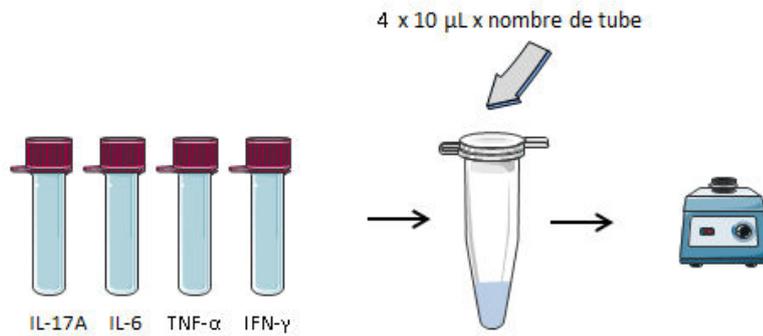
cytokines sont dosées dans le sérum des groupes contrôle, véhicule et XBD173 au pic de la maladie (J14), à l'aide du kit cytokine BD™ CBA Th1 / Th2 / Th17 (BioScience, Montana, Etats-Unis). Nous avons suivi le protocole indiqué par le fabricant.

La Fig. 25 résume les grandes étapes réalisées à l'aide du kit :

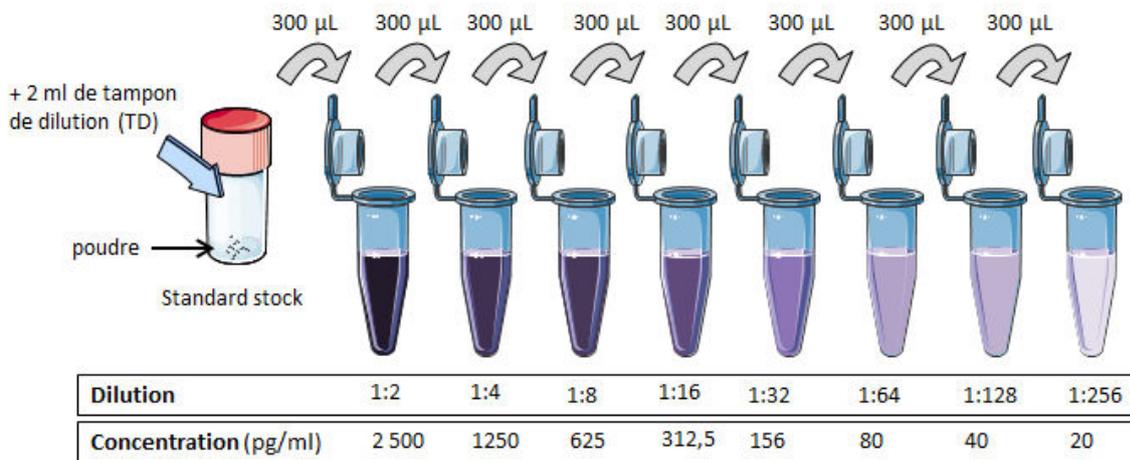
La préparation de la gamme standard permet d'obtenir les concentrations des cytokines en pg/mL. Pour cela, 2ml de tampon de dilution ont été rajouté au tube standard du kit. Après 15 min à température ambiante, 300 µL de tampon de dilution ont été placés dans chacun des tubes de la gamme standard, puis 300 µL de la solution standard ont été transférés dans le 1^{er} tube de la gamme (concentration finale au 1/2). Une dilution en cascade a été réalisée afin d'obtenir les concentrations finales au 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128 et au 1/256. Le tube servant de contrôle contenait uniquement la solution de tampon de dilution.

Pour la cytométrie en flux, 50 µL d'échantillon ont été ajoutés à 50 µL de la suspension de billes et 50 µL du réactif de détection (PE). Après 2h d'incubation à l'abri de la lumière, les échantillons ont été lavés par 1mL de tampon puis centrifugés à 500g pendant 5 min. Le culot obtenu a ensuite été resuspendu dans 300 µL de tampon de lavage et les échantillons ont été quantifiés à l'aide d'un cytomètre de flux BD Accuri C6 plus (BioScience, Montana, États-Unis). La limite de détection est de 0,8 pg/ml pour IL-17A, de 1.4 pg/ml pour IL-6, de 0.9 pg/ml pour TNF- α et de 0.5 pg/ml pour IFN- γ . Les données ont été analysées à l'aide du logiciel BD Accuri C6.

• Préparation des billes de capture : cytokines Th1/Th2/Th17



• Préparation des standards : cytokines Th1/Th2/Th17



• Préparation des échantillons pour la cytométrie en flux

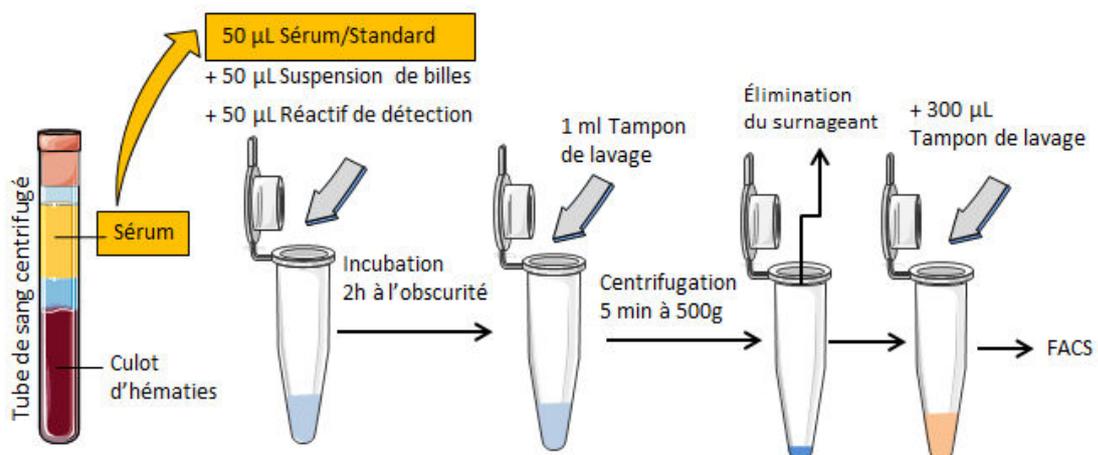


Fig. 25: Principales étapes du protocole expérimental de la cytométrie en flux

IX ETUDE DU MECANISME D'ACTION DE XBD173 PAR DOSAGE DE L'ALLOPREGNANOLONE PAR LA TECHNIQUE ELISA

IX.1 Principe de la technique ELISA

La méthode immuno-enzymatique ELISA (pour *enzyme-linked immunosorbent assay*) est un test immunologique pour détecter la présence d'un anticorps ou d'un antigène dans un échantillon. Dans ce test immunologique, le dosage est couplé à une réaction catalysée par une enzyme qui libère un composant coloré suivi par spectroscopie. L'ELISA est une technique biochimique utilisant un ou deux anticorps. Le premier est spécifique de l'antigène, alors que le deuxième réagit aux complexes immuns (antigène-anticorps) et est couplé à une enzyme. Cet anticorps secondaire, permet l'émission d'un signal par un substrat chromogène ou fluorogène.

IX.2 Protocole expérimental

IX.2.1 Préparation des échantillons

Le cerveau et la ME des animaux SJL/J RJ des groupes contrôles, traités au XBD173 (10, 20 mg/kg) et des souris-veh ont été utilisés. Pour cela, le corps calleux, le cervelet et le cortex ont été prélevés des cerveaux congelés et rassemblés afin d'obtenir 40 mg de chaque région. De même, 40mg de ME ont été prélevés. Ensuite les tissus ont été broyés pour réaliser le protocole d'extraction lipidique.

IX.2.2 Extraction des stéroïdes

Les tissus ont été broyés dans 15 ml d'acétonitrile. La solution a été centrifugée pendant 10 min à 10 000g à 4°C. Le surnageant a été récupéré et 30 mL d'hexane y a été ajouté. Après avoir mélangé, deux phases ont été obtenues. La phase inférieure organique contenant les stéroïdes non conjugués a été récupérée alors que la couche supérieure, aqueuse, a été jetée. Ensuite, la phase organique a été évaporée sous vide dans un évaporateur rotatif (Speed-Vac, Jouan, St Herblain, France). Les culots ont été stockés à -20°C en attendant le dosage.

IX.2.3 Test Elisa dosage de l'Alloprégnanone

Pour effectuer ce test Elisa, un kit "Allopregnanolone Chemiluminescent Immunoassay Kit" (Arbor assay, Arbor, États-Unis) a été utilisé selon les instructions du fabricant. Les culots d'extraction ont été repris avec 500 µL de tampon de dosage. La gamme standard a été réalisée par dilution en cascade de la solution mère d'AP fournie dans le kit. Puis, 50µL d'échantillon ont été disposés dans une plaque 96 puits auxquels ont été ajoutés 25µL du conjugué Allo DetectX et 25µL de l'anticorps anti-Allo DetectX. Après 2h d'incubation à température ambiante sous agitation, 4 lavages successifs ont été effectués avec la solution de lavage du kit. Le substrat TMB (Tetramethylbenzidine) a été ajouté dans chaque puits. La densité optique a été lue à 450 nm au spectromètre (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, États-Unis). Le calcul des concentrations d'AP et l'expression des valeurs en pg/ml d'homogénat de cerveau ou de moelle épinière ont été effectués conformément aux recommandations du fabricant du kit de dosage qui a également fourni un logiciel de calcul avec le kit.

X ANALYSES STATISTIQUES

Toutes les données sur les graphiques représentent la moyenne \pm SEM. Les différences statistiques ont été évaluées par le test d'analyse de la variance ANOVA à un ou deux facteurs, suivi d'un test de comparaison multiple de Tukey ou de Bonferroni. L'analyse statistique a été effectuée avec le logiciel GraphPad-Prism (GraphPad-Prism, San Diego, CA, USA). Les données qui ne présentent pas de distribution gaussienne ont été analysées par un test U non-paramétrique de Mann-Whitney. Une valeur p inférieure à 0,05 est considérée comme significative.

RESULTATS

I Effet du XBD173 sur les scores cliniques des souris EAE

Le choix des doses d'administration du XBD173 (10, 15 et 20 mg/kg) est basé sur des études antérieures qui ont démontré que des doses similaires de XBD173 empêchent la microgliose, diminuent les symptômes inflammatoires et ont un effet neuroprotecteur contre les dégénérescences rétiniennes chez la souris (Karlstetter et al. 2014; Scholz et al. 2015).

I.1 Dans le modèle rémittent récurrent de l'EAE

Les souris femelles SJL/J Rj âgées de neuf ou dix semaines ont été traitées avec le XBD173 (10, 15 et 20 mg/kg) ou avec le véhicule, tous les deux jours, à partir du jour 4 post-immunisation (J4) jusqu'à la mise à mort des animaux. Le poids des animaux (Fig. 26) et les scores cliniques (Fig. 27) ont été mesurés tous les jours. Le score clinique (SC) a été déterminé selon une échelle standard allant de 0 à 10, comme décrit dans la partie matériels et méthodes (partie 4, paragraphe 2, tableau 1). La perte de poids, très rapidement observée, a commencé autour de J9 et a progressé jusqu'à J14-16. Au cours de cette phase caractéristique de la maladie, les souris EAE traitées au véhicule HPC 0,3% (souris-veh) ont perdu environ 15% de leur poids corporel entre le jour 0 et le jour 14 (Fig. 26). En revanche, la perte de poids a été significativement réduite chez les souris traitées au XBD173 (10 mg/kg), par rapport aux groupes traités par XBD173 (15 ou 20 mg/kg) et aux souris-veh (Fig. 26). Après J14-16, la reprise de poids a été effective dans tous les groupes de souris.

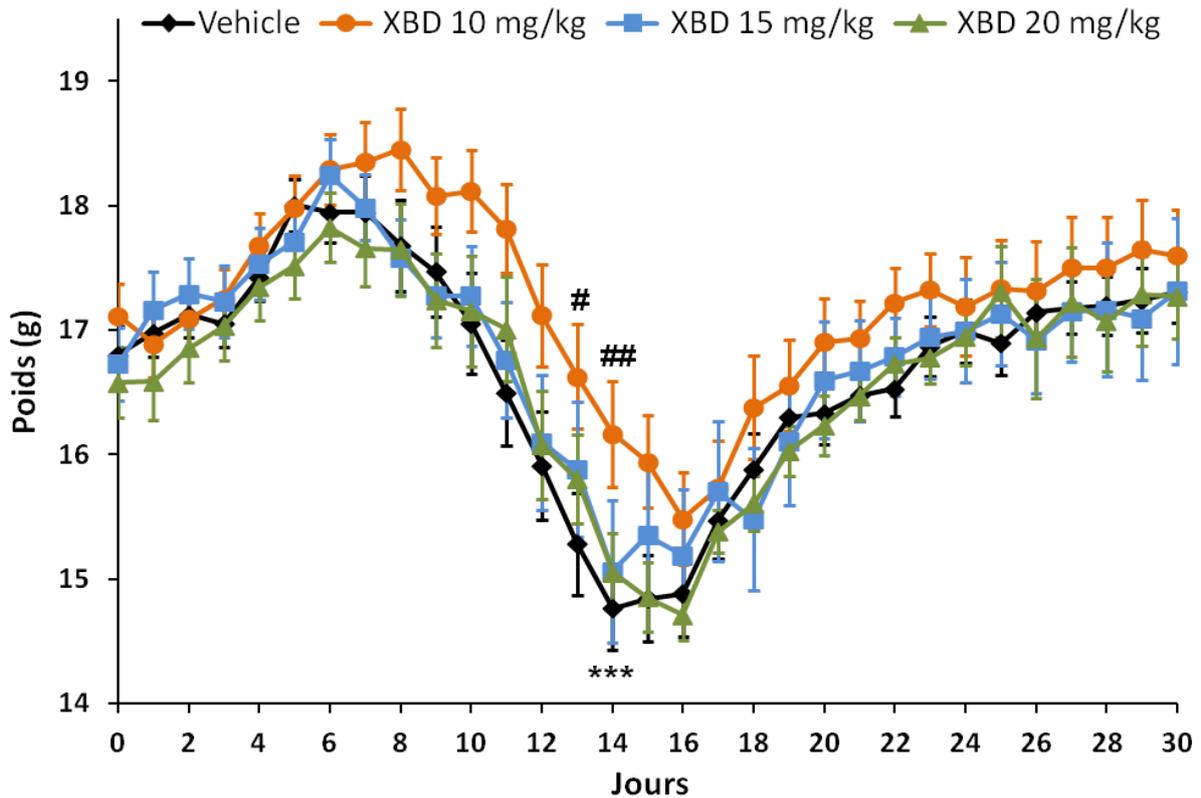
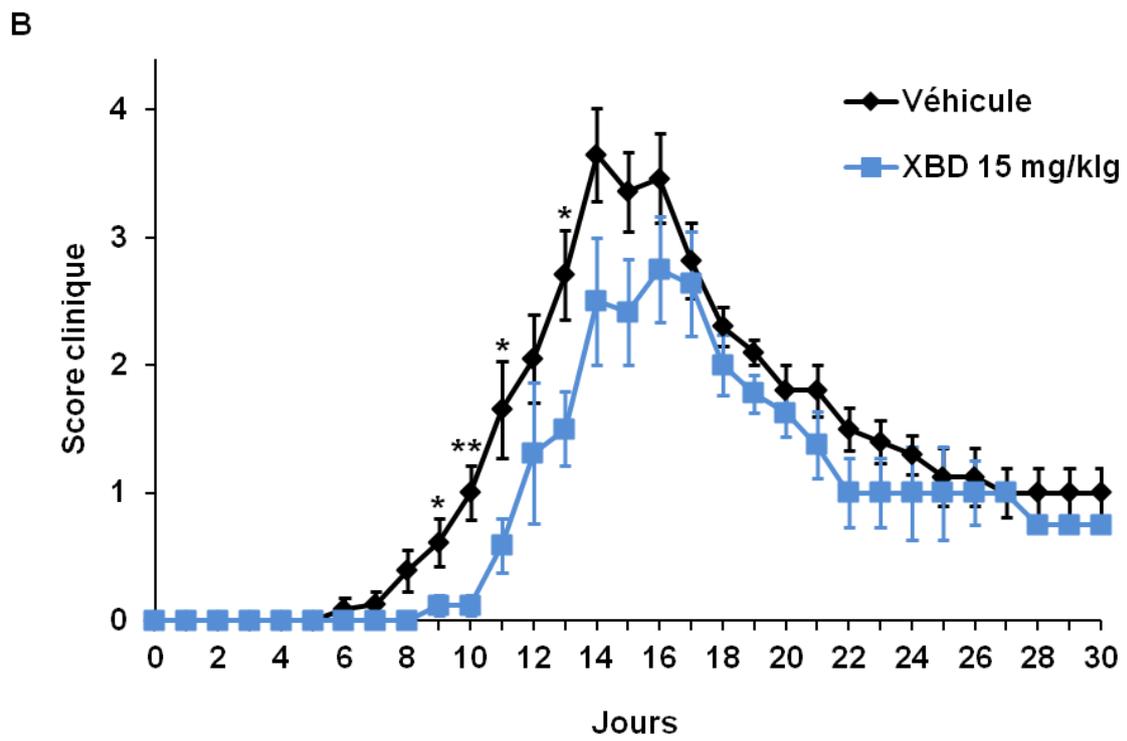
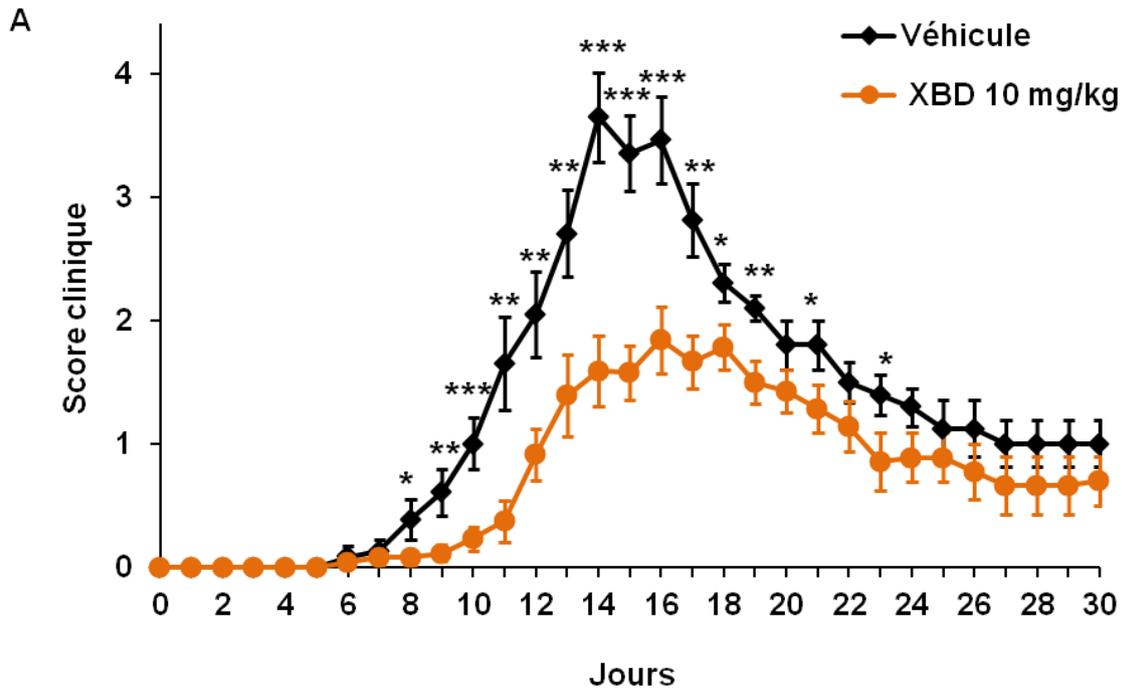
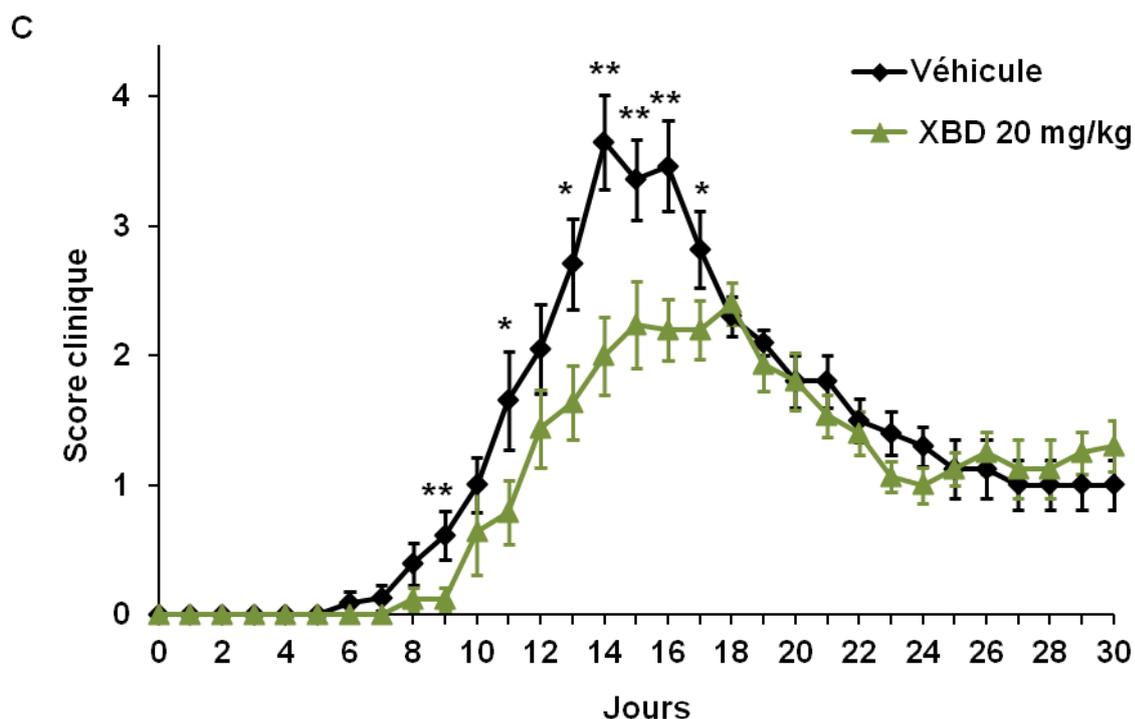


Fig. 26: Cinétique du poids des souris SJL/J RJ pour les groupes véhicule et XBD173.

Le poids a été mesuré quotidiennement chez les souris-EAE recevant le véhicule ou le XBD173 (10; 15 ou 20 mg/kg). Les traitements ont été administrés tous les deux jours à partir du jour 4 post-immunisation jusqu'à la fin des expériences ($n = 23$ pour le groupe véhicule; $n = 26$ pour XBD 10 et 20 mg/kg, et $n=16$ pour XBD 15 mg/kg, au début de l'expérience). Chaque valeur représente la moyenne \pm SEM. *** $p < 0,001$ la comparaison s'effectue entre J0 et J14 pour le groupe véhicule. Le test statistique utilisé est un ANOVA à une voie suivi du test post-hoc de Tukey. ## $p < 0,01$, # $p < 0,05$ la comparaison s'effectue entre XBD173 10 mg/kg et le groupe véhicule. Le test statistique utilisé est l'ANOVA à deux voies suivi du test de Bonferroni.

L'allure de la courbe des SC du groupe véhicule est en adéquation avec celle habituellement observée dans la forme rémittente récurrente chez les souris SJL/J Rj. Comme le montre la Fig. 27 (A, B, C), le pic de la maladie des souris-veh s'est produit vers J14-16. Lorsque les souris ont été traitées avec XBD173 à 10, 15 ou 20 mg/kg, l'apparition des premiers signes cliniques a été considérablement retardée par rapport aux souris-veh (Fig. 27 A, B, C). De plus, le SC moyen est significativement réduit par le traitement au XBD173 à 10 et 20 mg/kg (SC: 1,5 ou 2, respectivement) par rapport à XBD173 15 mg/kg (SC: 2.8) et au véhicule (SC: 4) à J14 (figure 27 A, B, C). Cependant, l'observation de l'ensemble des courbes a révélé que la dose de XBD173 à 10 mg/kg est plus efficace que 15 et 20 mg/kg. Ce résultat est confirmé par le pourcentage d'animaux ayant un SC supérieur ou égale à 3 ou strictement inférieur à 3, au pic de la maladie (Fig. 27 D). En effet, le SC de 3 correspond à des mouvements non coordonnés de l'animal et constitue un indice clé pour évaluer l'état de progression de la pathologie. A J14, chez les souris EAE, le pourcentage présentant un SC inférieur à 3 était de 77% pour XBD173 (10 mg/kg), 58% pour les animaux traités avec XBD173 (20mg /kg), 47% pour XBD173 (15 mg/kg) et seulement 17% pour les souris-veh (Fig. 27 D).





D

	Véhicule	XBD 10 mg/kg	XBD 15 mg/kg	XBD 20 mg/kg
% des animaux ayant un score clinique ≥ 3	83	** 23	53	42
% des animaux ayant un score clinique < 3	17	77	47	58

Fig. 27: Evaluation des scores cliniques des souris SJL/J RJ pour les groupes souris-veh et XBD173 (10, 15 ou 20 mg/kg).

(A, B, C) Cinétique de l'évaluation des scores cliniques pour les souris-veh, et les animaux traités avec le XBD173 à (A) 10 mg/kg, (B) 15 mg/kg, et (C) 20 mg/kg. Chaque valeur représente la moyenne \pm SEM. *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$ exprimé par rapport au groupe véhicule. Le test statistique utilisé est celui de Mann-Whitney.

(D) Pourcentages à J14 de souris EAE traitées au véhicule ou au XBD173 (10, 15 ou 20 mg/kg) avec un score clinique élevé (≥ 3) ou faible (< 3). ** $p < 0,01$ la comparaison s'effectue par rapport au groupe véhicule. Le test de Mann-Whitney a été utilisé.

I.2 Dans la forme progressive de l'EAE

Des expériences préliminaires sur les souris mâles C57BL/6J, âgées de neuf ou dix semaines, ont été réalisées pour étudier l'effet du XBD173 sur les symptômes observés dans la forme progressive de la maladie. Le poids des animaux (Fig. 28) et le SC (Fig. 29) ont été mesurés tous les jours. Une perte de poids est observée, pour les groupes véhicules, XBD173 à 10 et 20 mg/kg, de J12 à J17. La baisse de poids se maintient entre J17 et J24 car même si quelques fluctuations interviennent dans cette période, on n'observe pas de retour à la normale (figure 28). Sur la période J12-17, la perte de poids est moins importante chez les souris traitées au XBD 15 mg/kg comparées aux autres groupes, et cette différence est significative à J14 et J15.

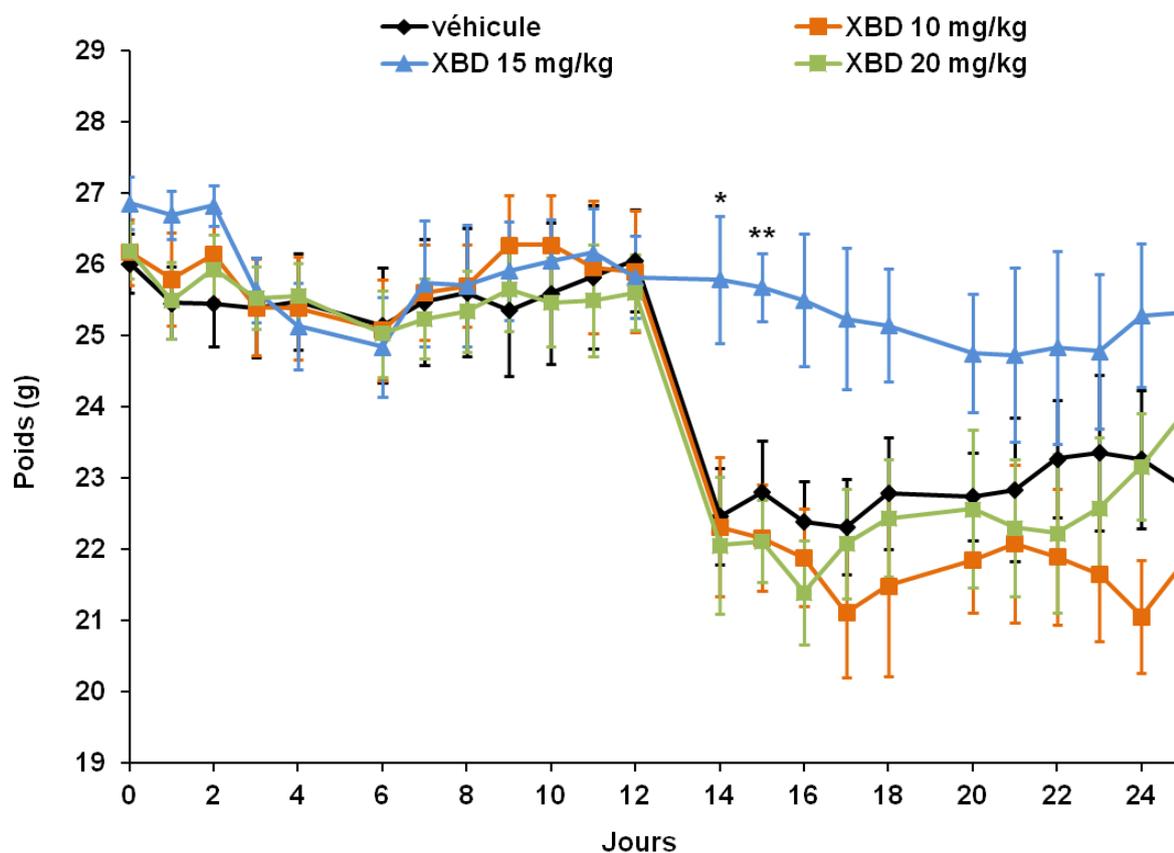


Fig. 28: Cinétique du poids des souris C57BL/6J pour les groupes véhicule et XBD173 (10, 15 ou 20 mg/kg).

Le poids a été mesuré quotidiennement chez les souris-veh et chez les animaux XBD173 à 10; 15 ou 20 mg/kg. Les traitements ont été administrés tous les deux jours à partir du jour 4 post-immunisation jusqu'à la fin des expériences (n = 6 pour tous les groupes: véhicule et XBD173 aux 3 doses, au début de l'expérience). Chaque valeur exprime la moyenne \pm SEM.

*Le test statistique utilisé ici est l'ANOVA à deux voies (Interaction facteurs groupe x jour: $F_{(15, 144)}=1,89$, $p=0,0238$) suivie du test de Bonferroni (** $p < 0,01$, * $p < 0,05$ la comparaison s'effectue entre XBD173 15 mg/kg et le groupe véhicule).*

L'allure de la courbe des SC du groupe véhicule est conforme au profil conventionnellement décrit pour l'évolution des signes cliniques dans la forme progressive de

la SEP. Une augmentation des SC a débuté entre J9 et J11 et évolué jusqu'à l'obtention d'un plateau à partir de J18 (Fig. 29). Ce processus est caractéristique d'une aggravation chronique, progressive et irréversible des symptômes. Lorsque les souris ont été traitées avec le XBD173 à 15 mg/kg le SC moyen obtenu au plateau de la maladie est significativement réduit (-77%) par rapport aux groupes XBD173 (10 ou 20 mg/kg) et véhicule (Fig. 29).

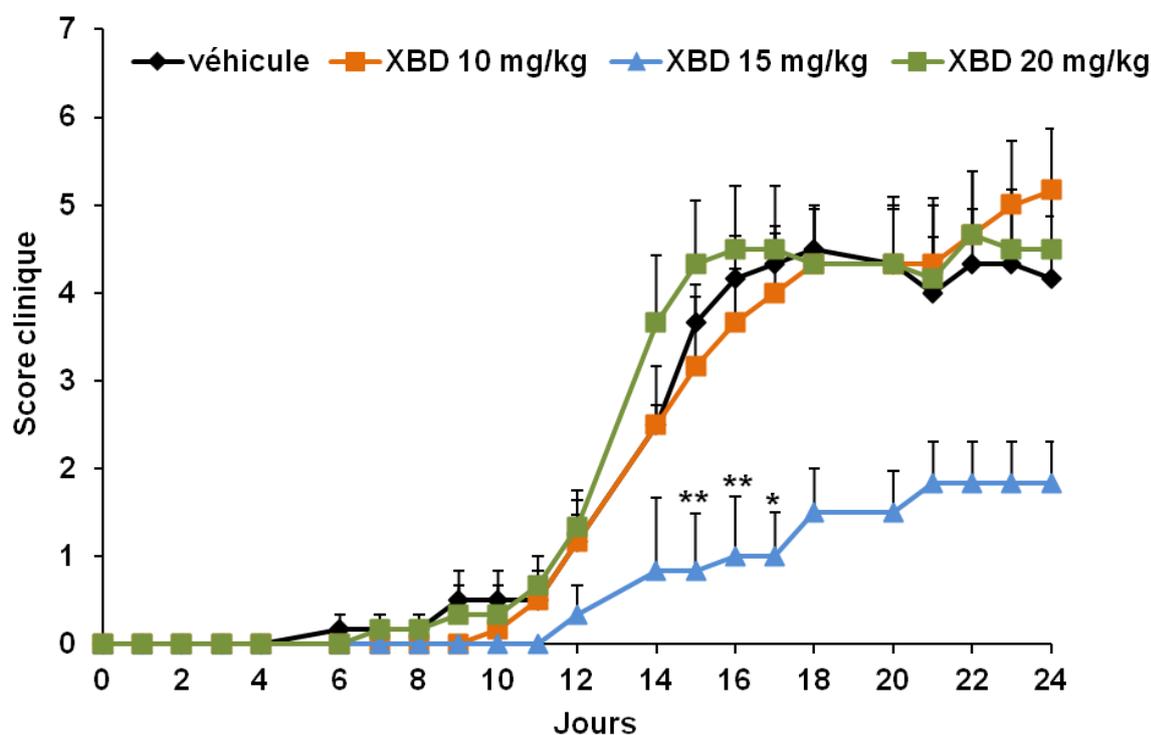


Fig. 29: Evaluation des scores cliniques pour le groupe véhicule et les groupes traités avec le XBD173 des souris C57BL/6J.

Cinétique de l'évaluation des scores cliniques pour les animaux recevant le véhicule, le XBD173 à 10 mg/kg, 15 mg/kg, ou 20 mg/kg. Chaque valeur représente la moyenne +SEM.

*Le test statistique utilisé est celui de Mann-Whitney, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$ exprimé par rapport au groupe véhicule (XBD173 15mg/kg à J15: $U_{(4, 6)}=0$, $p=0,0065$; J16: $U_{(4, 6)}= 0,5$, $p=0,0084$; J17: $U_{(4, 6)}=2$, $p=0,0154$).*

II Effet de XBD173 sur l'activité motrice des souris SJJ/J Rj, évaluée par le test du Catwalk

Les résultats des scores cliniques obtenus sur un critère visuel/observationnel ont été étayés par des mesures objectives automatisées en utilisant le test du Catwalk, qui permet d'évaluer les capacités motrices des souris. Les souris contrôles non traitées, les souris-veh et les animaux traités par le XBD173 (10 mg/kg et 20 mg/kg) ont été évalués 2x/semaine à partir de J3 jusqu'à leur mise à mort. Le paramètre mesuré est l'aire de contact maximum (ACM) de la patte sur la plateforme, exprimée en cm² (Fig. 30). La figure 30 A montre que ce paramètre diminue progressivement de J3 à J14 avant d'augmenter à J24, dans le groupe véhicule. Le profil des symptômes moteurs observé par cette technique est parfaitement corrélé à la progression de la maladie évaluée par les SC. En effet, l'ACM mesuré chez les souris-veh chute de manière significative pour atteindre la valeur la plus basse à J14, ce qui coïncide avec le pic de la maladie observé sur le graphique des SC. Au jour 24, correspondant à la phase de rémission sur le graphique des SC, l'ACM qui devient significativement plus élevée qu'à J14 se rapproche de la valeur mesurée à J3 (Fig. 30A). De plus, alors qu'à J14 la valeur de l'ACM est la plus faible chez les souris-veh, le traitement XBD173 (10 ou 20 mg/kg) a permis de retrouver une valeur normale similaire à celle des souris contrôles (Fig. 30B).

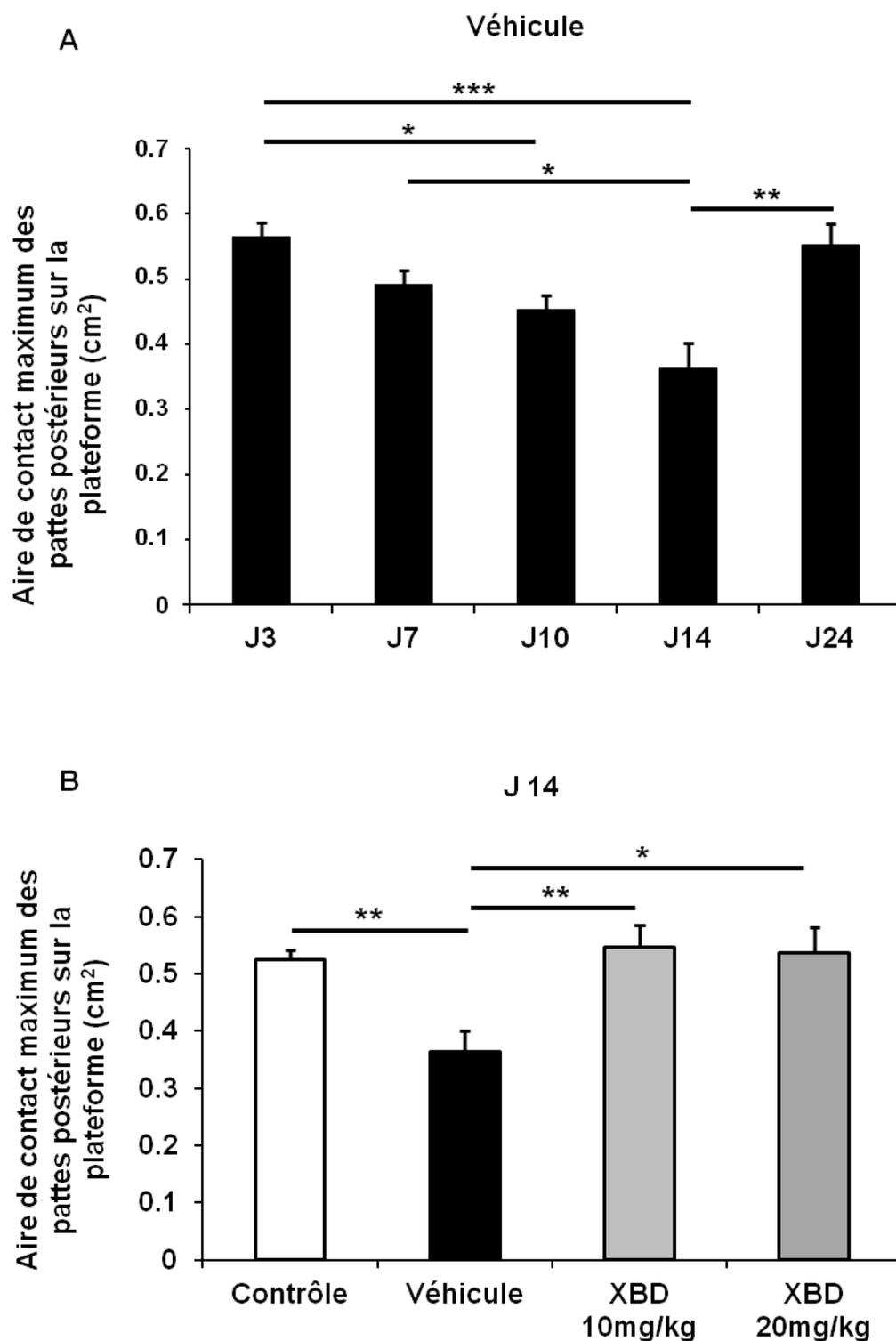


Fig. 30: Effet de XBD173 sur l'activité motrice des souris SJL/J Rj.

L'aire de contact maximale (ACM) moyenne des pattes postérieures sur la plateforme (en cm²) a été mesurée par le système du Catwalk (A) dans le groupe véhicule à J3, J7, J10, J14 et J24 et (B) au pic de la maladie (J14) chez les animaux contrôle, véhicule, XBD173 10 et 20

mg/kg. Chaque valeur représente la moyenne + SEM. Un test ANOVA, suivi du test de Tukey, est utilisé pour réaliser les analyses statistiques (Pour le graphique A, Anova facteur jour: $F_{(4, 100)} = 7,379$, $p < 0,0001$. Pour le graphique B, Anova facteur groupe: $F_{(3, 53)} = 5,334$, $p = 0,0028$). *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$: la comparaison s'effectue pour le graphique A entre les différents jours pour le groupe véhicule et pour le graphique B par rapport au véhicule.

III Effet de XBD173 sur la distribution et le niveau d'expression de MBP dans le cerveau et la moelle épinière des souris SJL/J Rj

Le kit SG a été utilisé pour déterminer la distribution cérébrale globale de l'immunoréactivité de MBP (Myelin Basic Protein) dans le cerveau des souris contrôles (Fig. 31 A), véhicules (Fig. 31 B), et traitées au XBD173 à 10 mg/kg (Fig. 31 C) ou à 20 mg/kg (Fig. 31 D). L'intensité de l'immunomarquage MBP est fortement diminuée dans le cerveau des souris-veh par rapport aux animaux contrôles (Fig. 31 A, B). Le traitement au XBD173 (10 ou 20 mg/kg) a contrecarré la diminution de l'immunoréactivité de MBP induite par l'EAE dans le cerveau des souris (Fig. 31 C, D).

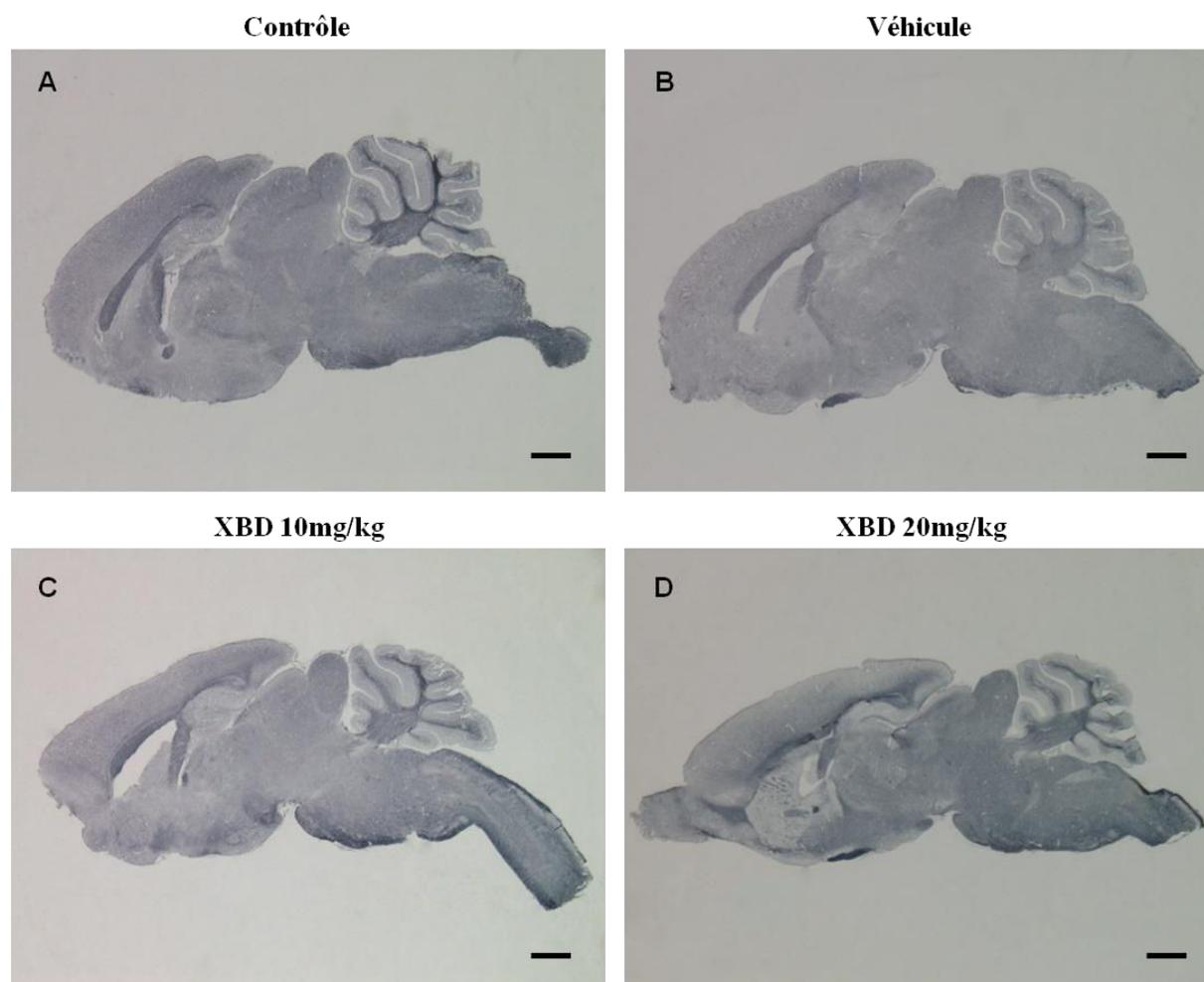


Fig. 31: Immunomarquage de la protéine MBP sur des coupes sagittales cérébrales des souris SJL/J Rj.

Le kit SG a été utilisé pour révéler la distribution globale de l'immunomarquage de MBP dans le cerveau (A) des souris contrôle, (B) véhicule, ou traitées par le XBD173 à (C) 10 mg/kg ou (D) 20 mg/kg. Barre d'échelle = 1000 μ m.

Afin d'évaluer l'impact du développement de la maladie sur la distribution et le niveau d'expression de MBP, des analyses d'immunofluorescence ont été réalisées dans la ME (Fig. 32) et dans 3 structures cérébrales fonctionnellement importantes dans la pathologie (Fig. 33), le cervelet (Cer), le corps calleux (CC) et le cortex (C), connues pour être fortement myélinisées. En effet, dans le groupe contrôle, un marquage MBP immunofluorescent intense

a été visualisé dans la substance blanche de la ME (Fig. 32A), et dans les 3 zones du cerveau (Fig. 33 A-E). En revanche, le marquage MBP est fortement réduit dans la ME (Fig. 32B), le Cer, le CC et le C des souris-veh (figure 33 F-H). Le traitement au XBD173 à 10 mg/kg a empêché avec succès la diminution de l'immunoréactivité de MBP induite par l'EAE dans la ME (Fig. 32 C) et dans le cerveau (Fig. 33 I-K). La dose de 20 mg/kg de XBD173 (bien que moins efficace que 10 mg/kg) a aussi restauré l'expression de MBP dans le Cer, le CC et le C (Fig. 33 L-N), mais n'a pas amélioré le marquage immunofluorescent de MBP dans la zone lombaire de la ME (Fig. 32D).

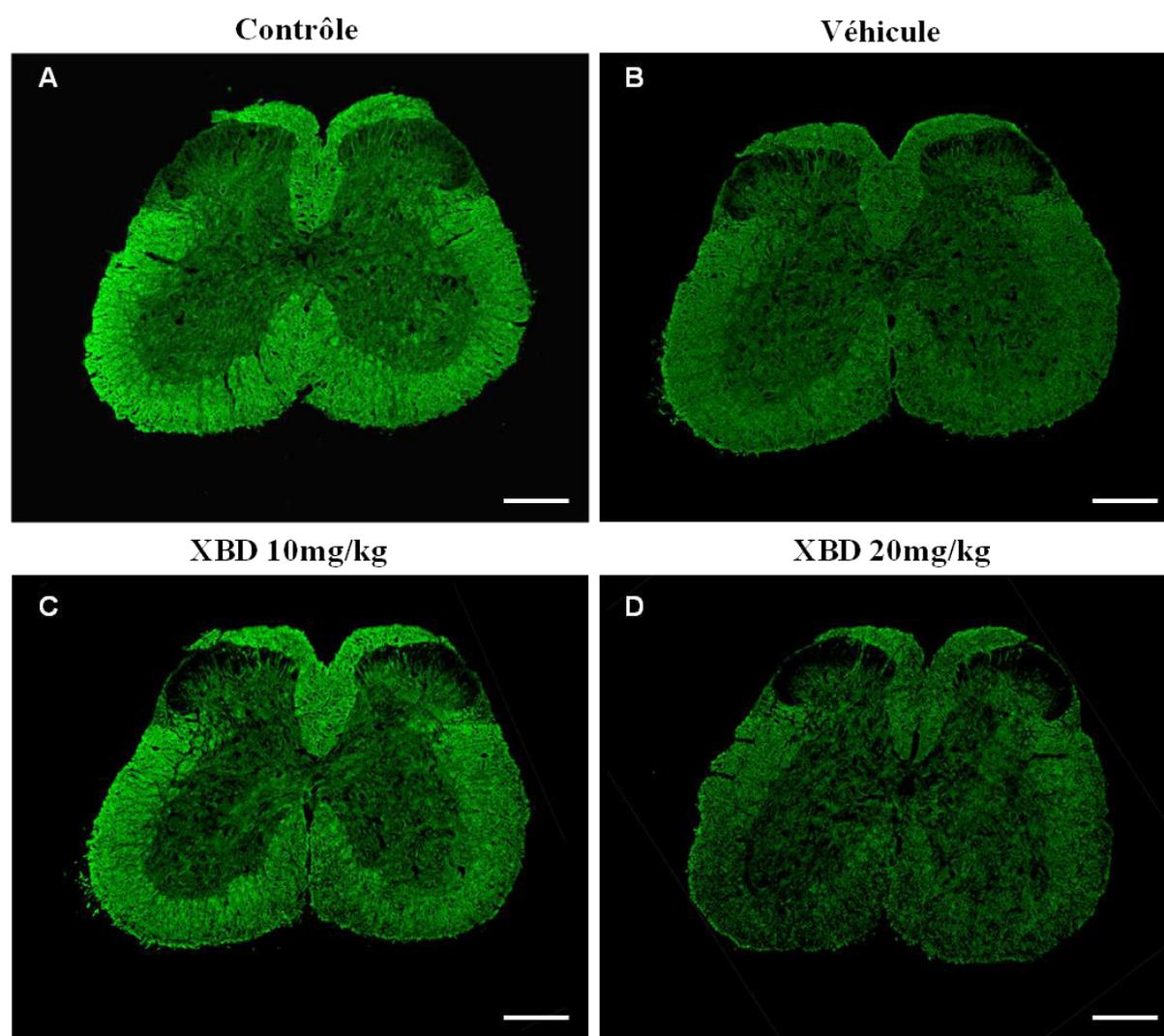


Fig. 32: Marquage immunofluorescent de la protéine MBP dans la partie lombaire de la moelle épinière des souris SJL/J Rj.

Distribution de la protéine MBP dans la moelle épinière (A) des souris contrôle, (B) véhicule ou traitées avec le XBD173 (C) à 10 mg/kg ou (D) à 20 mg/kg. Les coupes de tissus ont été marquées grâce à un anticorps primaire polyclonal de lapin anti-MBP, puis révélées avec un anticorps secondaire de chèvre anti-lapin, conjugué à l'Alexa-488 (couleur verte). Barre d'échelle = 200 μ m.

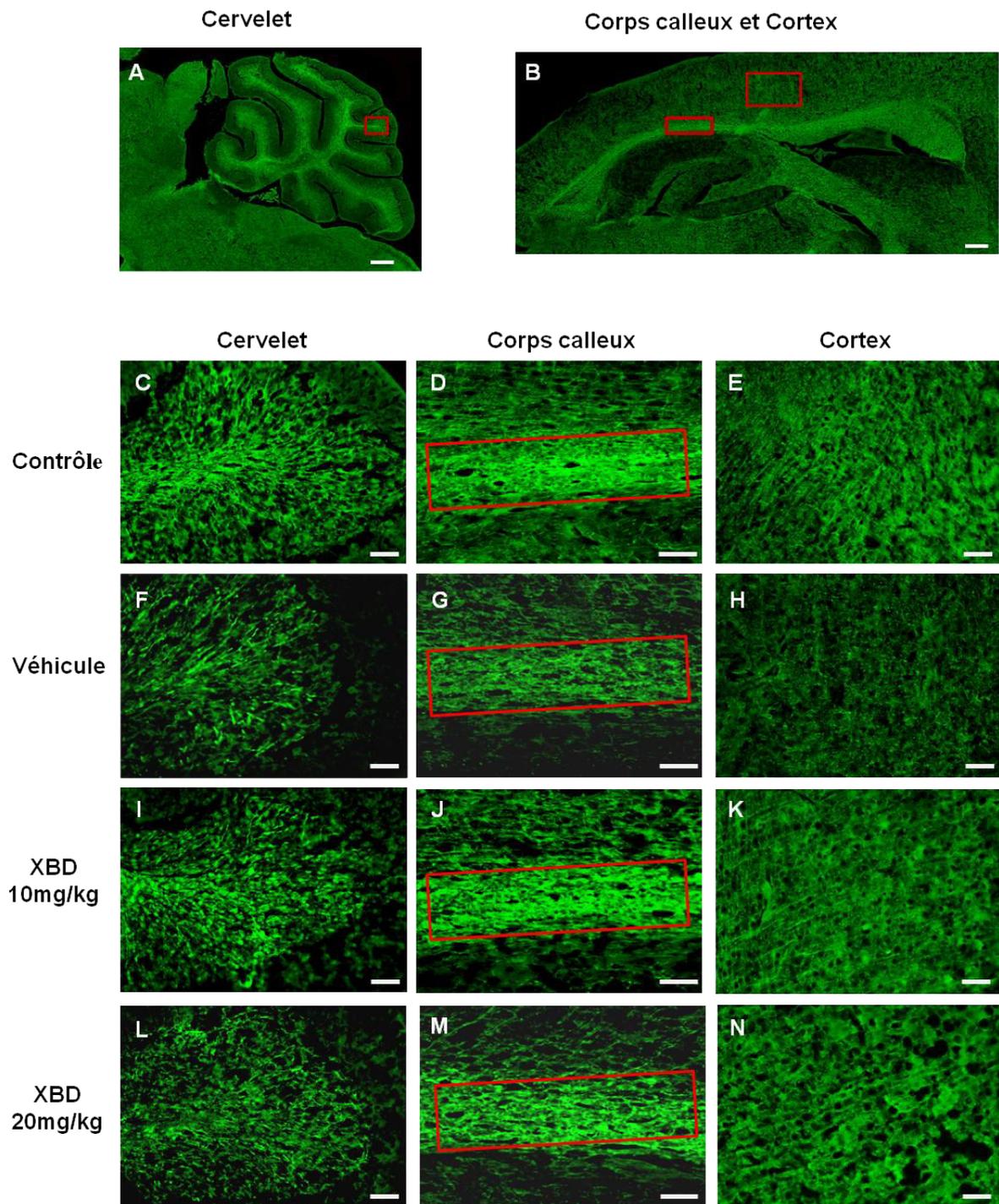


Fig. 33: Marquage immunofluorescent de la protéine MBP dans le cervelet, le corps calleux et le cortex chez les souris SJL/J Rj.

(A) Vue d'ensemble du cervelet d'un animal contrôle. (B) Vue d'ensemble du corps calleux et du cortex d'un animal contrôle. Barre d'échelle = 500 μm. (C-N) Photomicrographies des 3

zones du cerveau. (C, F, I, L), cervelet ; (D, G, J, M), corps calleux et (E, H, K, N), cortex chez les animaux (C-E) contrôle, (F-H) véhicule, XBD173 à (I-K) 10 mg/kg et à (L-N) 20 mg/kg. Les coupes de tissus ont été marquées grâce à un anticorps primaire polyclonal de lapin anti-MBP, puis révélées avec un anticorps secondaire de chèvre anti-lapin, conjugué à l'Alexa-488 (couleur verte). Barre d'échelle = 40 µm.

Les analyses quantitatives, réalisées avec le logiciel Olympus cellSens dimension, ont révélé que les doses de 10 et 20 mg/kg de XBD173 sont capables de rétablir le niveau normal d'expression de MBP dans le CC et le C des souris alors que dans le Cer et la ME seule la dose de 10 mg/kg de XBD173 a été efficace pour protéger de la démyélinisation induite par l'EAE (Fig. 34). La dose de XBD173 à 20 mg/kg a produit une restauration partielle mais non significative de l'expression de MBP dans la ME et le Cer (Fig. 34).

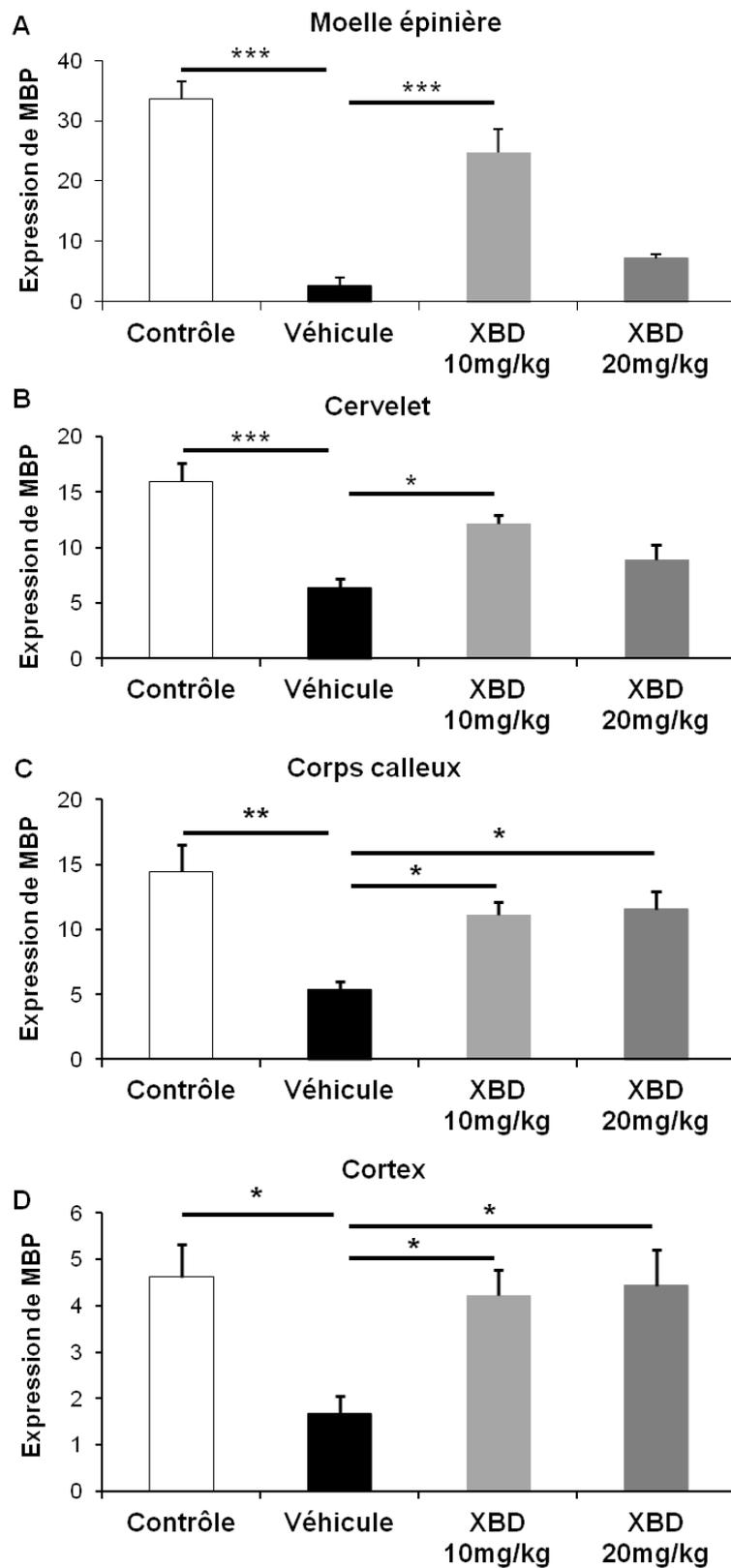


Fig. 34: Quantification de l'expression de la protéine MBP dans les 3 zones du cerveau et dans la partie lombaire de la moelle épinière chez les souris SJL/J Rj.

*Le logiciel Olympus cellSens Dimension couplé au microscope à fluorescence a permis de réaliser la quantification de l'expression de la protéine MBP dans (A) la partie lombaire de la moelle épinière, (B) le cervelet, (C) le corps calleux, (D) le cortex. Chaque histogramme représente la moyenne (+ SEM) du pourcentage de marquage de MBP immunofluorescent de la zone d'intérêt sur la région totale mesurée dans les différentes zones de tissu à partir d'animaux contrôle, véhicule, XBD173 10 mg/kg ou 20 mg/kg. *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$ la comparaison a été effectuée entre les différents groupes, en utilisant un test statistique ANOVA, suivi du test de Tukey ($n=5$ /groupes).*

IV Effet de XBD173 sur la distribution de CRMP2 dans la moelle épinière de souris SJL/J Rj

Il est connu que la SEP est une maladie inflammatoire et neurodégénérative qui présente des lésions démyélinisantes et des dommages axonaux (Haines et al. 2011; Lubetzki and Stankoff 2014). Nos résultats ci-dessus, réalisés sur un modèle de SEP, ont montré que le XBD173 est capable de contrecarrer la diminution de l'expression de MBP induite par l'EAE, caractéristique d'une perte de myéline. Nous avons donc réalisé des études préliminaires pour déterminer l'effet de XBD173 sur la distribution de la protéine CRMP-2 (Collapsin response mediator protein), marqueur spécifique de la croissance axonale. Ces travaux ont été menés dans la ME des souris SJL/J Rj

Le marquage immunofluorescent de CRMP2 est intense dans la ME du groupe contrôle (Fig. 35 A) et fortement réduit chez les souris-veh (figure 35 B). La densité du marquage immunofluorescent de CRMP2 est plus importante dans la ME des souris traitées au XBD173 par rapport aux souris-veh, suggérant que le traitement au XBD173 (10 mg/kg et 20 mg/kg) pourrait prévenir la perte axonale provoquée par l'EAE (figures 35 C-D).

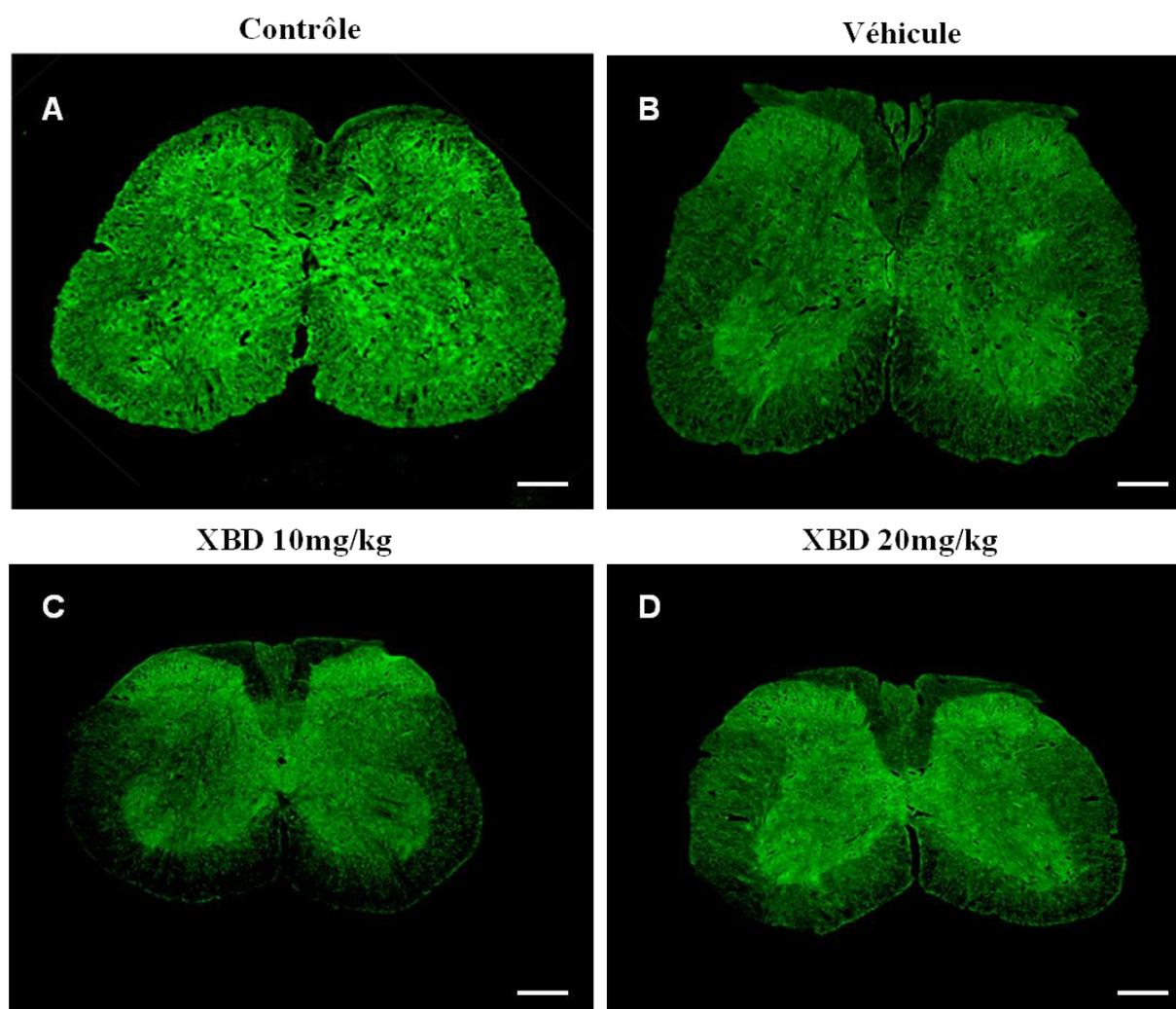
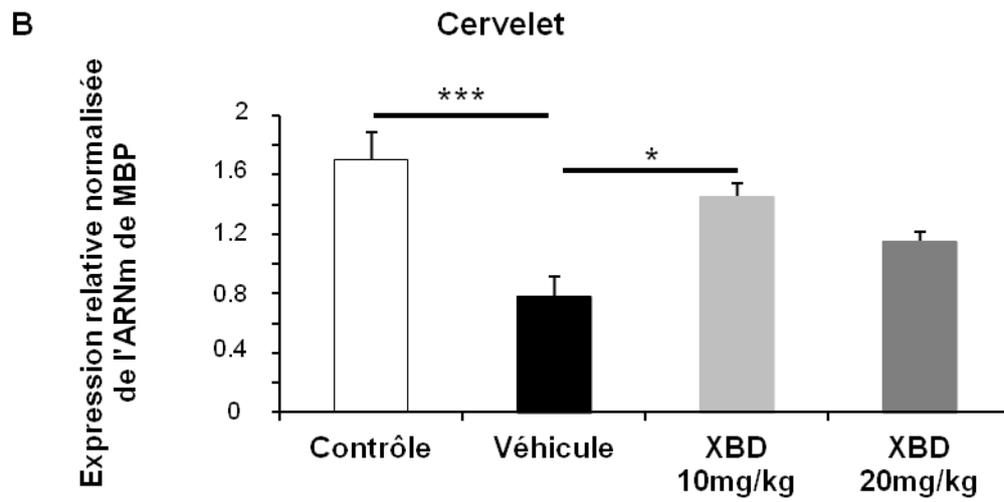
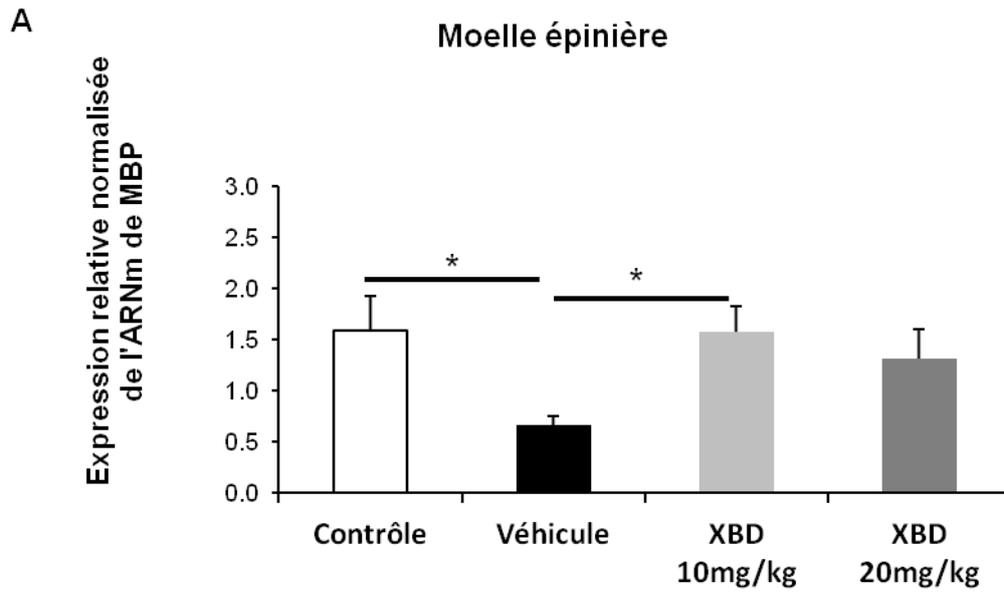


Fig. 35: Marquage immunofluorescent de la protéine CRMP2 dans la moelle épinière des souris SJL/J Rj.

Distribution de la protéine CRMP2 dans la partie lombaire de la moelle épinière des souris (A) contrôle, (B) véhicule, ou traitées avec le XBD173 à (C) 10 mg/kg ou (D) 20 mg/kg. Les coupes de tissus ont été marquées grâce à un anticorps primaire monoclonal de lapin anti-CRMP2, puis révélées avec un anticorps secondaire de chèvre anti-lapin, conjugué à l'Alexa-488 (couleur verte). Barre d'échelle = 200 μ m.

V Effet du XBD173 sur l'expression du gène MBP dans les structures spinales et cérébrales des souris SJL/J Rj

Les concentrations d'ARNm ([ARNm]) codant MBP dans la ME, le Cer, le CC et le C ont été évaluées par RT-qPCR chez les souris SJL/J Rj contrôles, véhicules ou traitées par le XBD173 (10 ou 20 mg/kg) (Fig. 36). Les [ARNm] de MBP détectés dans la ME et le cerveau des souris-veh sont significativement plus faibles (3,6-; 2,17-; 2,75- et 1,4-fois plus faibles respectivement dans la ME, le Cer, le CC et le C) que chez les souris contrôles (Fig. 36). Le traitement au XBD173 a stimulé l'expression du gène MBP et augmenté les [ARNm] codant MBP dans le système nerveux central des souris EAE. L'administration de XBD173 à la dose de 10 mg/kg a permis de rétablir des [ARNm] de MBP comparables à celles observées chez les contrôles, dans les 3 zones du cerveau et dans la partie lombaire de la ME (Fig. 36). La dose de 20 mg/kg de XBD173 a augmenté la [ARNm] codant MBP dans le CC et dans le C des souris traitées par rapport au groupe véhicule (Fig. 36 C- D). Dans le Cer et la ME, l'action de XBD (20 mg/kg) sur l'expression des ARNm codant MBP n'est pas significative, bien qu'une tendance à l'augmentation soit visible (Fig. 36 A- B).



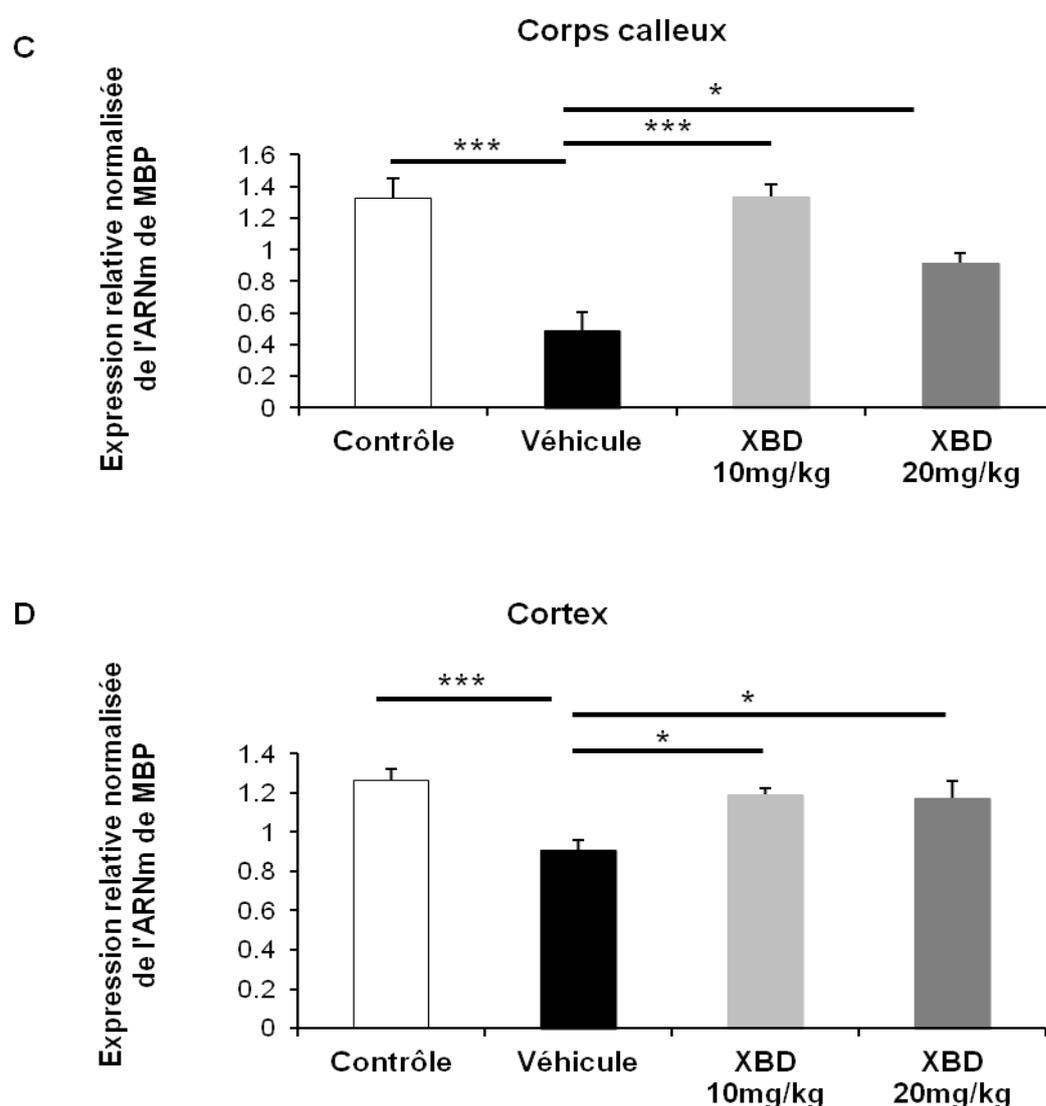


Fig. 36: Expression du gène MBP dans la moelle épinière et dans les différentes zones du cerveau des souris SJL/J Rj.

Les graphiques représentent les concentrations d'ARNm ([ARNm]) de MBP dans (A) la moelle épinière, (B) le cervelet, (C) le corps calleux et (D) le cortex. Les histogrammes représentent la valeur moyenne (+ SEM) des [ARNm] codant MBP dans la zone de tissu cible normalisée par rapport au gène de référence. Cette manipulation s'est effectuée chez les souris contrôle, véhicule; XBD173 à 10 ou 20 mg/kg. *** $p < 0,001$, * $p < 0,05$ la comparaison statistique s'effectue entre les différents groupes et est réalisée avec un test

ANOVA suivi du test de Tukey. (n=7 pour les groupes contrôle et véhicule; n=5/groupes pour XBD 10 et 20 mg/kg).

VI Effet du XBD173 sur l'expression des gènes CRMP2 et NF200 dans la moelle épinière

Au cours de nos études préliminaires pour étudier l'effet du XBD173 sur les pertes axonales induites par l'EAE, nous avons analysé les niveaux d'expressions des ARNm codant CRMP2 et d'un autre marqueur neuronal, le NF200 (Neurofilament 200 kDa) dans la zone lombaire de la ME des souris SJL/J Rj. Les [ARNm] ont été évaluées par RT-qPCR (Fig. 37 et 38).

Les [ARNm] de CRMP2 (Fig. 37) et NF200 (Fig.38) détectées dans la ME des souris-veh sont significativement plus faibles que chez les souris contrôles. Le traitement avec le XBD173 à 10 mg/kg augmente significativement les [ARNm] de CRMP2 (Fig. 37) et de NF200 (Fig. 38), dans la ME des souris traitées, par rapport au groupe véhicule. L'administration de XBD173 à la dose de 20 mg/kg a amélioré le taux d'ARNm de CRMP2 (Fig. 37) et NF200 (Fig. 38) dans la ME mais pas de manière significative par rapport aux souris-veh.

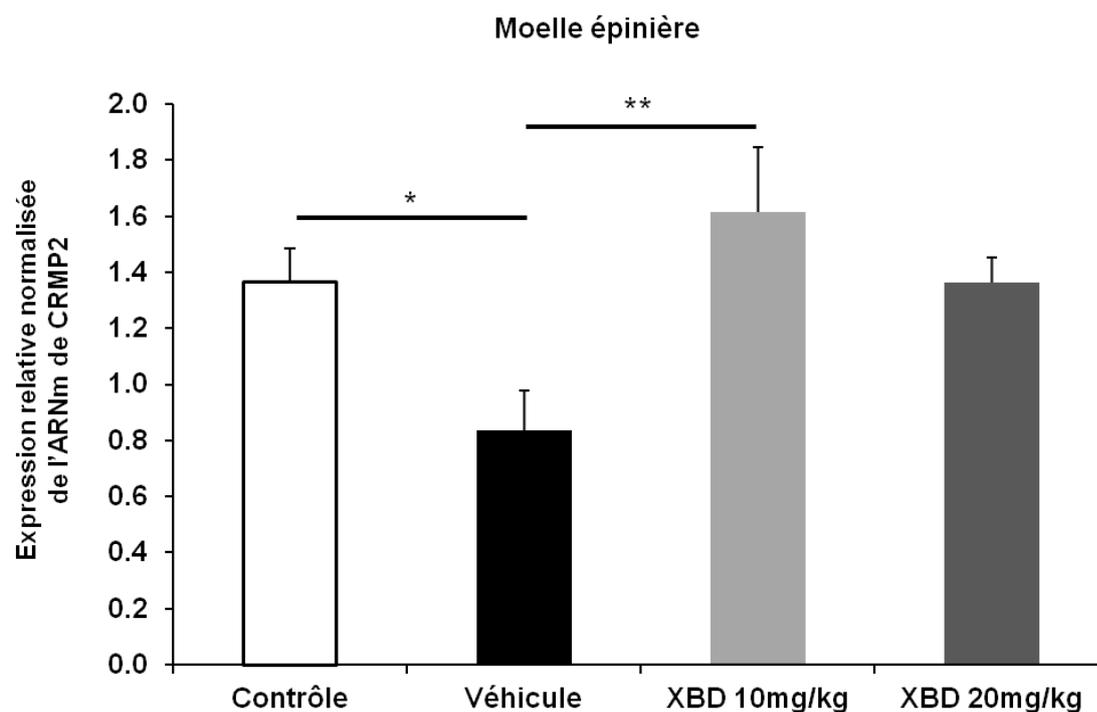


Fig. 37: Expression du gène CRMP2 dans la moelle épinière des souris SJL/J Rj.

Les graphiques représentent les [ARNm] de CRMP2 dans la partie lombaire de la moelle épinière. Chaque histogramme représente la valeur moyenne (+ SEM) des [ARNm] codant CRMP2 dans la zone de tissu considérée normalisée par rapport au gène de référence. Cette manipulation s'est effectuée chez les souris contrôles, véhicules; XBD173 à 10 ou 20 mg/kg. La comparaison statistique s'effectue entre les différents groupes et est réalisée avec un test ANOVA (Facteur groupe: $F_{(3, 17)}=6,122$, $p=0,0051$), suivi du test du Tukey (** $p < 0,01$, * $p < 0,05$). $n=6$ pour le groupe contrôle; $n=5$ pour le groupe véhicule et les groupes XBD173.

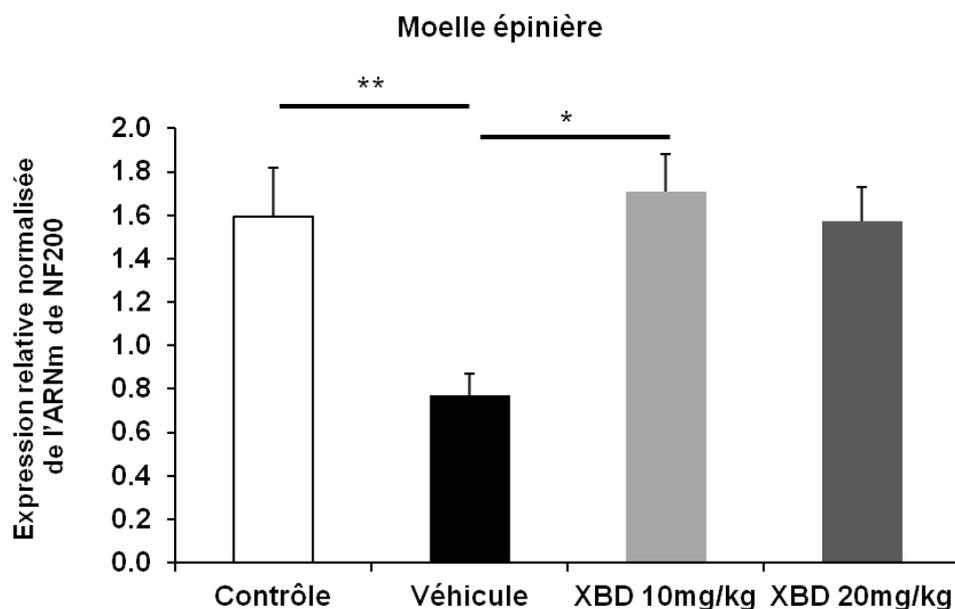


Fig. 38: Expression du gène NF200 dans la moelle épinière des souris SJL/J Rj.

Les graphiques représentent les [ARNm] de NF200 dans la partie lombaire de la moelle épinière. Chaque histogramme représente la valeur moyenne (+ SEM) des [ARNm] de NF200 dans la zone de tissu cible normalisée par rapport au gène de référence. Cette manipulation s'est effectuée chez les souris contrôles, véhicules; XBD173 à 10 ou 20 mg/kg. La comparaison statistique s'effectue entre les différents groupes et est réalisée avec un test ANOVA (Facteur groupe: $F_{(3, 38)} = 5,915$, $p=0,002$), suivi du test du Tukey (** $p < 0,01$, * $p < 0,05$). $n=8$ pour le groupe contrôle et les groupes XBD173; $n=14$ pour le groupe véhicule.

VII Effet de XBD173 sur la concentration d'alloprégnanolone

La fixation de XBD173 sur son récepteur TSPO conduit à la stimulation de la neurostéroïdogénèse (voir introduction, paragraphe 3.2.4, page 85) Afin de vérifier si les effets bénéfiques de XBD173, observés dans les résultats décrits ci-dessus, impliquent la voie

des neurostéroïdes, nous avons dosé la concentration tissulaire d'AP puisque ses propriétés neuroprotectrices sont bien établies (voir introduction, paragraphe 4.3.2, page 94).

La concentration d'AP a été mesurée par ELISA dans la ME (Fig. 39 A) et le cerveau (Fig. 39 B) des souris SJL/J Rj contrôles, véhicules, XBD 10 et 20 mg/kg au pic de la maladie (J14). Dans les deux structures, une diminution de la concentration du neurostéroïde a été observée chez les souris-veh par rapport aux animaux contrôles (Fig. 39 A et B). Les souris traitées au XBD173 (10 ou 20 mg/kg) ont une concentration cérébrale (Fig. 39 A) et spinale (Fig. 39 B) d'AP comparables à celles mesurées chez les souris contrôles. Ces résultats démontrent que le XBD173 a stimulé la biosynthèse de l'AP pour contrecarrer la diminution d'AP induite par l'EAE dans le SNC des souris-veh.

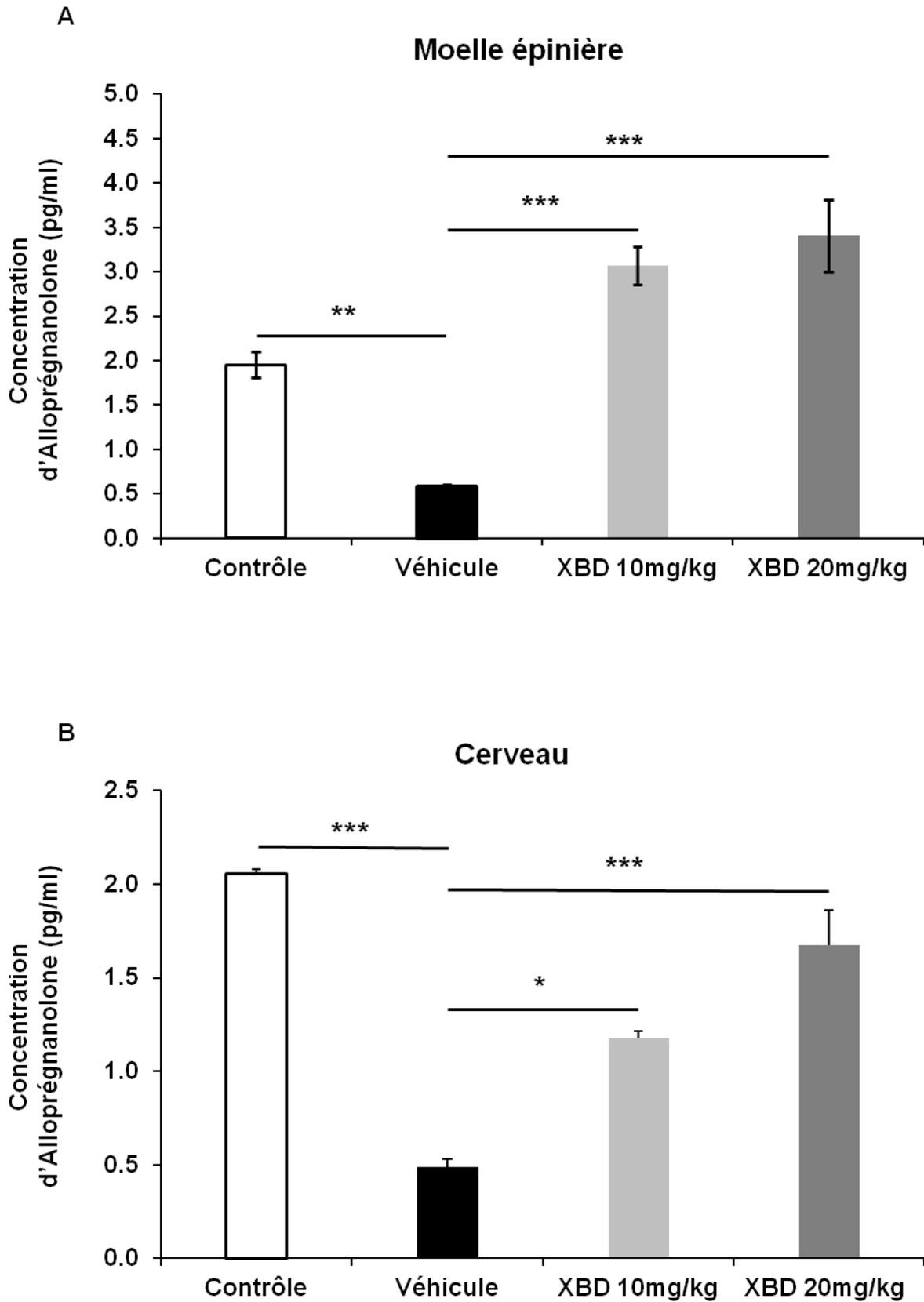


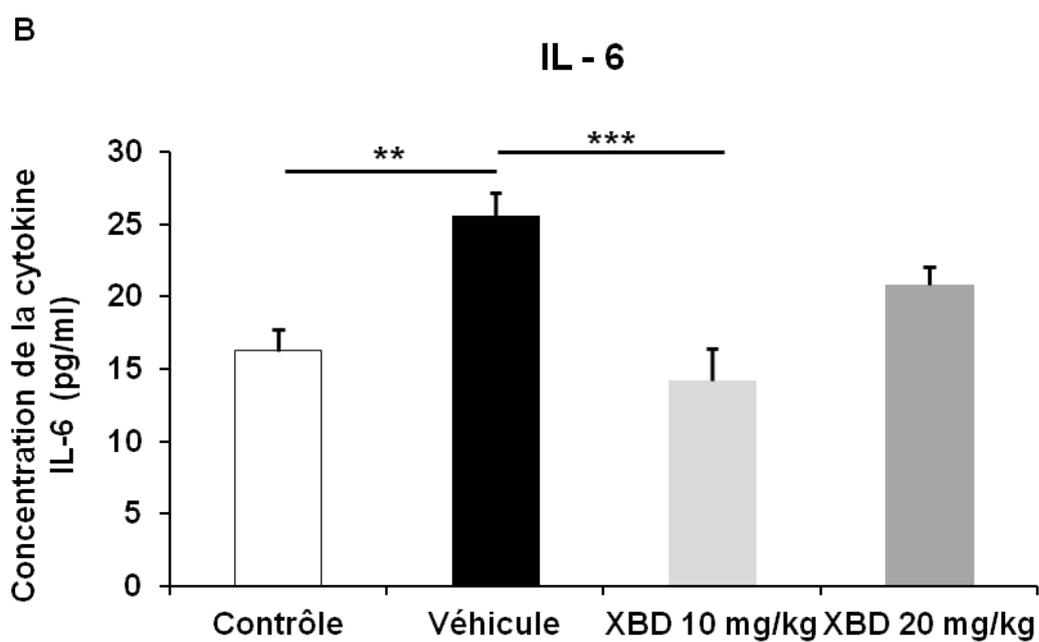
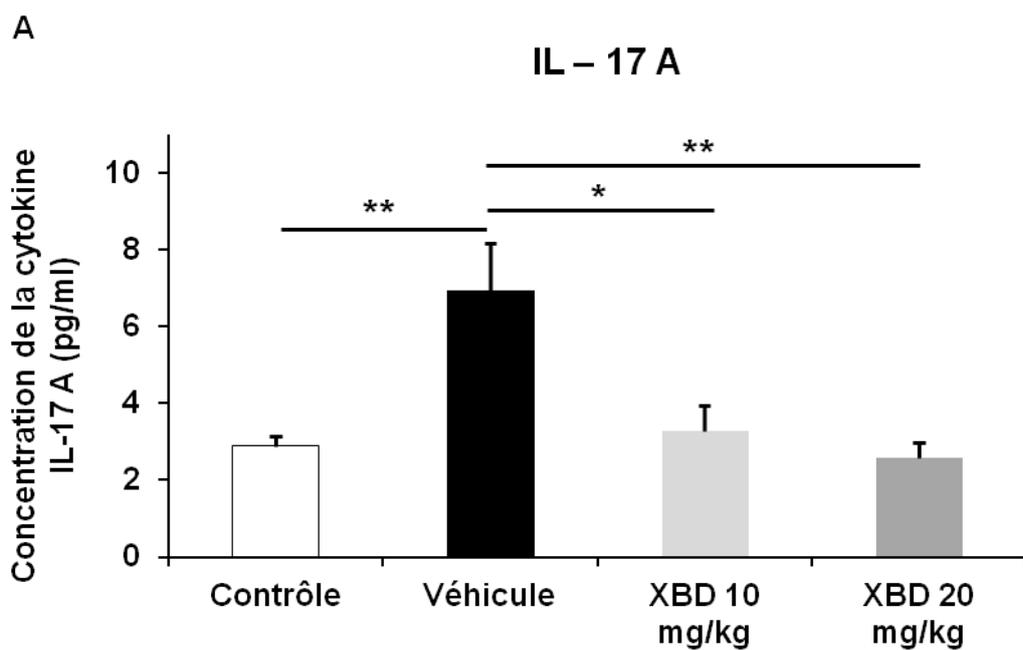
Fig. 39: Concentration d'alloprégnanolone dans les tissus cérébral et spinal des souris SJL/J Rj.

Les graphiques représentent la concentration d'alloprégnanolone en pg/ml dans (A) la moelle épinière et dans (B) l'encéphale. La valeur de l'histogramme exprime la moyenne (+ SEM) des valeurs obtenues chez les souris contrôle, véhicule; XBD173 à 10 et 20 mg/kg. *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$ la comparaison statistique s'effectue entre les différents groupes et est réalisée avec un test ANOVA, suivi du test de Tukey. ($n=5$ pour les groupes contrôle, véhicule, XBD 10 mg/kg et 20 mg/kg).

VIII Effet de XBD173 sur la concentration de cytokines pro-inflammatoires

L'IL-17A (interleukine-17A), l'IL-6 (interleukine-6), le TNF- α (*tumor necrosis factor* ou facteur de nécrose tumorale), et l'IFN- γ (Interféron gamma) sont des cytokines pro-inflammatoires impliquées dans la SEP et l'EAE (Constantinescu et al. 2011; Kroenke and Segal 2011; Martins et al. 2011; Dos Passos et al. 2016; Erta et al. 2016).

Les concentrations d'IL-17A, d'IL-6, de TNF- α et de l'IFN- γ (Fig. 40 A-D, respectivement) ont été dosées dans le sérum des souris contrôles, véhicules, XBD173 10 mg/kg et 20 mg/kg en utilisant le kit cytokine BD Cytometric Bead Array. La concentration d'IL-17A, d'IL-6, de TNF- α et de l'IFN- γ a augmenté significativement (environ 2,5-, 1.5-, 2-, et 2-fois plus, respectivement) dans le sérum des souris-veh par rapport aux animaux contrôles. Le traitement avec le XBD173 (10 ou 20 mg/kg) a réduit avec succès les concentrations d'IL-17A et de TNF- α par rapport au groupe véhicule (Fig. 40 A et C, respectivement). Seule la dose de 10 mg/kg de XBD173 a diminué significativement la concentration d'IL-6 par rapport au groupe véhicule (Fig. 40 B). Les deux doses de XBD173 testées (10 et 20 mg/kg) n'ont pas amélioré le taux sérique de cytokine pro-inflammatoire IFN- γ par rapport au groupe véhicule (Fig. 40 D).



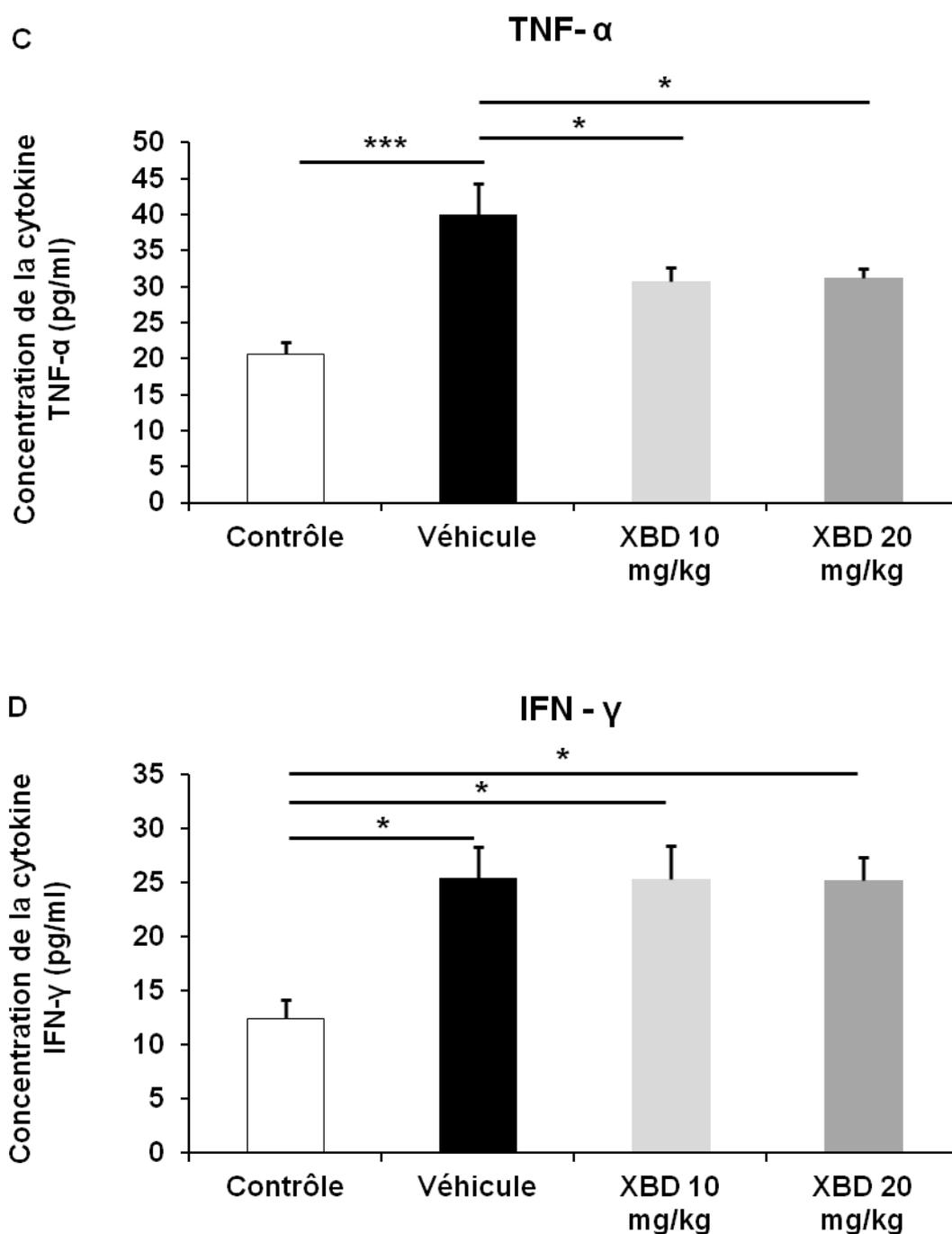


Fig. 40: Quantification avec la cytométrie de flux, de l'effet de XBD173 sur la concentration de cytokines pro-inflammatoire dans le sérum des souris SJL/J Rj
 Chaque valeur représente la moyenne (+ SEM) de la concentration (A) d'IL-17 A, (B) d'IL-6, (C) de TNF- α et (D) de IFN- γ des valeurs obtenues chez les souris contrôle ($n = 7$ pour A; 8 pour B, C et D), véhicule ($n = 8$ pour A; 18 pour B; 13 pour C et 15 pour D), XBD173 à 10

mg / kg ($n = 5$ pour A et B, 4 pour C et 7 pour D) et 20 mg / kg ($n = 7$ pour A; 10 pour B, 4 pour C et 8 pour D). *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$ la comparaison s'effectue entre les groupes, en utilisant un test ANOVA, suivi du test post-Hoc de Tukey.

IX Effet de l'administration concomitante d'interféron β et XBD173 (10 mg/kg) sur les scores cliniques des souris EAE

L'IFN β (IFN- β) est un des principaux médicaments plus particulièrement prescrits aux patients atteints de la forme rémittente récurrente de la SEP. Pour autant, cette molécule, très efficace comme immunomodulateur et anti-inflammatoire, réduit les poussées et les rechutes sans les supprimer mais provoque de lourds effets secondaires (voir introduction paragraphe 1.3.1.1, page 54). Par ailleurs, l'IFN- β n'agit que sur la composante inflammatoire et, de ce fait, l'impact sur la composante dégénérative de la maladie est limité. En effet, il ne prévient ni la perte de myéline ni les déficits axonaux. Nous avons donc émis l'hypothèse qu'une administration concomitante d'IFN- β et de XBD173 pourrait amplifier les effets bénéfiques des molécules tout en diminuant les effets secondaires de l'IFN- β . L'administration concomitante de l'IFN- β a été réalisée avec la dose de 10 mg/kg de XBD173, dose la plus efficace sur l'ensemble des résultats obtenus. Les souris femelles SJL/J Rj ont été traitées soit avec l'IFN β seul (20 000 UI) soit avec le combiné IFN- β (20 000 UI) et XBD173 (10 mg/kg), tous les deux jours à partir de J4 jusqu'à la mise à mort des animaux.

Le suivi pondéral des animaux (Fig. 41) et des scores cliniques (Fig. 42) ont été établis tous les jours. Une perte de poids a très rapidement été observée pour les 3 groupes de souris (véhicule, IFN- β et IFN- β + XBD173) (Fig.40). La perte de poids a commencé autour de J9 pour tous les groupes et a progressé jusqu'à J13 pour le véhicule, J15 pour le groupe IFN- β et J16 pour le groupe combiné. Au cours de cette phase les souris-veh ont perdu environ 10% de

leur poids corporel entre le jour 0 et le jour 13 (Fig. 41). En revanche, la perte de poids a été significativement décalée dans le temps et partiellement réduite chez les souris traitées à l'IFN- β et au mélange IFN- β + XBD173 par rapport aux souris-veh (Fig. 41). Après J13-16, la reprise de poids a été effective dans tous les groupes de souris.

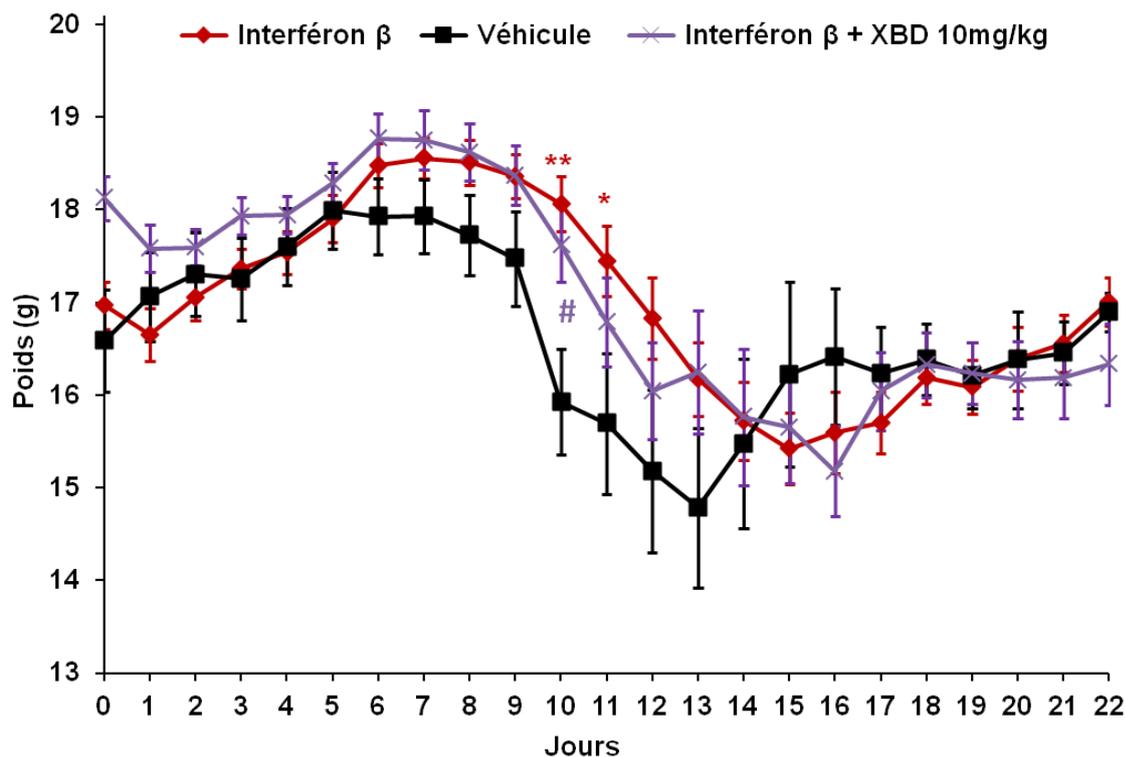


Fig. 41: Cinétique du poids des souris SJL/J RJ pour les groupes véhicule, traités avec l'interféron β , ou co-traités avec l'interféron β + XBD173.

Le poids a été mesuré quotidiennement chez les souris recevant le véhicule; l'interféron β ; ou le combiné interféron β + XBD173 à 10 mg/kg. Les traitements ont été administrés tous les deux jours à partir du jour 4 post-immunisation jusqu'à la fin des expériences ($n = 9$ pour le groupe véhicule; $n = 32$ pour l'interféron β , et $n = 16$ pour l'interféron β + XBD 173 à 10 mg/kg, au début de l'expérience). Chaque valeur représente la moyenne \pm SEM. Le test statistique utilisé ici est l'ANOVA à deux voies (Facteur jour: $F_{(14, 615)}=13,11$, $p<0,0001$; Facteur groupe: $F_{(2, 615)}=17,33$, $p<0,0001$) suivie du test de Bonferroni (Comparaison

*groupes véhicule vs. interféron β : ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$ ou comparaison groupes véhicule vs. interféron β + XBD 173: # $p < 0,05$).*

L'apparition des premiers signes cliniques de la maladie pour les animaux véhicules a débuté vers J7 et le pic de la maladie s'est produit à J13-14 (Fig. 42). Lorsque les souris ont été traitées avec l'IFN- β ou l'IFN- β + XBD173 l'apparition des premiers signes cliniques a été significativement retardée (J10) et le pic de la maladie a été décalé dans le temps J15 et J12, respectivement. Toutefois, les scores cliniques moyens ont été significativement réduits par le traitement avec IFN- β seul (SC: 2,3) et le combiné IFN- β + XBD173 (SC: 2,3) par rapport au véhicule (SC: 4.1) (Fig. 42). Lors de la phase de rémission (J18-22), le score clinique des animaux traités avec le combiné (IFN- β + XBD173) a été significativement réduit (SC : 1) par rapport à celui des souris-veh et traités à l'IFN- β seul (SC : 2). Bien que la phase de régression soit incomplète, l'administration concomitante d'IFN- β et XBD173 a permis d'améliorer les symptômes suggérant ainsi une meilleure récupération.

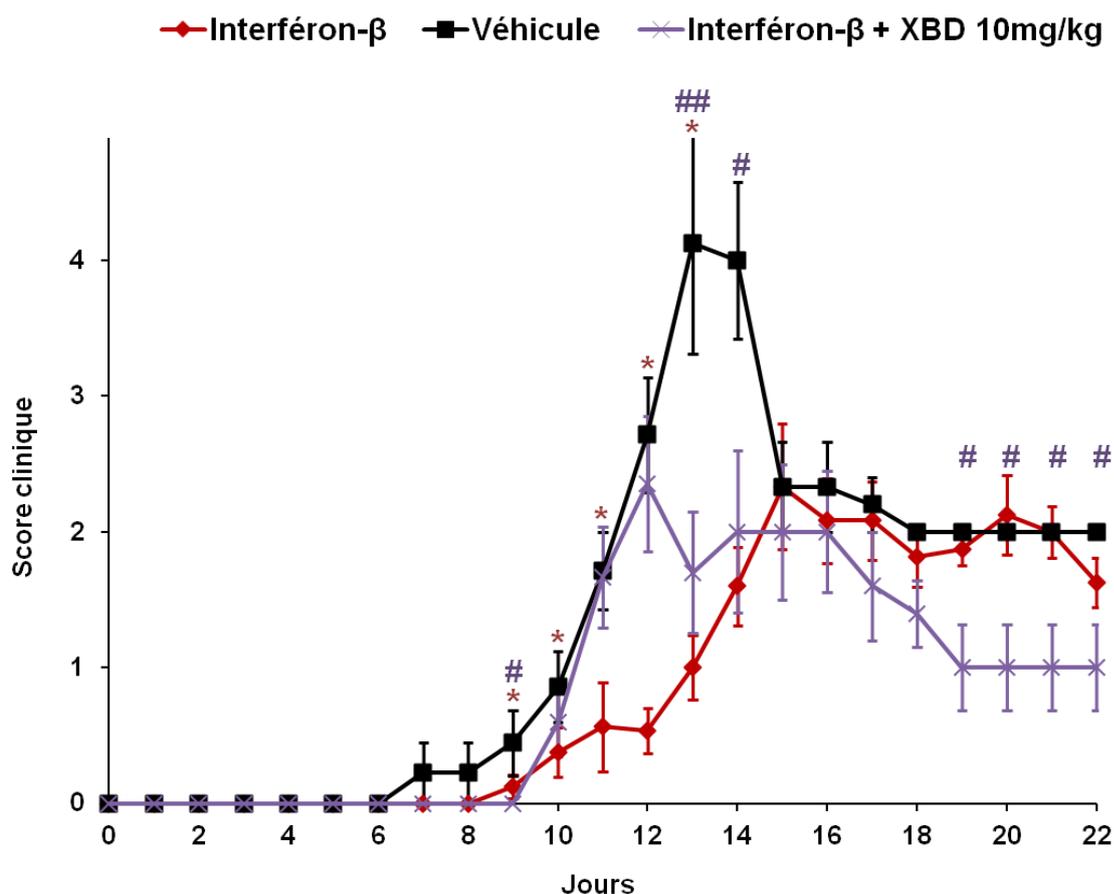


Fig. 42: Evaluation des scores cliniques pour les groupes véhicule, traités à l'interféron β seul et traités de façon concomitante à l'interféron β et au XBD173.

Cinétique de l'évaluation des scores cliniques pour les animaux recevant le véhicule; l'interféron β seul ou l'administration concomitante d'interféron β et XBD173 (10 mg/kg). Chaque valeur exprime la moyenne \pm SEM. Le test statistique utilisé est celui de Mann-Whitney (Comparaison par rapport au groupe véhicule, pour le groupe interféron β à J9: $U_{(9, 32)} = 104$, $p = 0,0142$; J10: $U_{(9, 32)} = 100$, $p = 0,0432$; J11: $U_{(9, 27)} = 68,5$, $p = 0,0179$; J12: $U_{(9, 25)} = 61$, $p = 0,019$; J13: $U_{(9, 25)} = 59$, $p = 0,0175$ et pour le groupe interféron- β + XBD173 à J9: $U_{(9, 15)} = 48$, $p = 0,0405$; J13: $U_{(8, 10)} = 13,5$, $p = 0,0096$; J14: $U_{(4, 8)} = 5$, $p = 0,0337$; J19: $U_{(3, 5)} = 1$, $p = 0,0334$; J20: $U_{(3, 5)} = 1$, $p = 0,0334$; J21: $U_{(3, 5)} = 1$, $p = 0,0334$; J22: $U_{(3, 5)} = 1$, $p = 0,0334$). * $p < 0,05$ comparaison interféron β vs. véhicule et ## $p < 0,01$, # $p < 0,05$ comparaisons interféron β + XBD173 vs. véhicule.

DISCUSSION

Bien que de réels progrès aient été récemment réalisés pour le traitement de la SEP, le développement de thérapies efficaces dépourvues d'effets secondaires graves constitue toujours un défi important. Ce travail de thèse montre qu'une faible dose (10 mg/kg) du ligand TSPO, XBD173 (Emapunil), réduit efficacement la sévérité des symptômes cliniques et comportementaux chez les souris SJL/J Rj-EAE immunisées par le peptide PLP (EAE-PLP) qui miment de façon pertinente la forme récurrente rémittente de la SEP. Rappelons que cette forme de la maladie affecte environ 85% des patients atteints de SEP.

Outre la méthode d'observation clinique (évaluation des SC), conventionnellement utilisée dans la littérature pour évaluer les symptômes et la progression de la maladie, nous avons utilisé une approche originale et fortement objective basée sur le système du Catwalk. Ce test comportemental permet de confirmer l'évaluation des symptômes moteurs et de déterminer précisément l'action bénéfique de XBD173 contre les symptômes induits par le PLP chez la souris SJL/J Rj. Nos résultats montrent que le XBD173 augmente significativement l'ACM des pattes sur la plateforme, au pic de la maladie, indiquant une amélioration des fonctions motrices. Cette observation est parfaitement concordante avec notre évaluation des SC, révélant que le traitement XBD173 à la dose de 10 mg/kg a également diminué de manière significative le pourcentage de souris EAE ayant un SC élevé (supérieur ou égale à 3) correspondant à une parésie des membres postérieurs et à des mouvements non coordonnés. En accord avec nos résultats, des études récentes ont démontré que la même dose de XBD173 (10 mg/kg) diminue efficacement les réactions microgliales pro-inflammatoires *in vivo* et contrecarre la dégénérescence rétinienne induite par la lumière chez la souris (Scholz et al. 2015). Plus important encore, étant donné que le XBD173 est bien toléré chez les humains en induisant une action anti-panique sans symptômes de sédation ou de sevrage contrairement aux BZ (Rupprecht et al. 2009; Rupprecht et al. 2010), son utilisation en clinique apparaît très pertinente pour le traitement des patients atteints de SEP.

Dans l'ensemble, ces données soutiennent fortement l'idée que le XBD173 offre des possibilités prometteuses pour développer des stratégies thérapeutiques efficaces pour lutter contre la SEP.

À notre connaissance, nos résultats constituent les premières données démontrant l'action bénéfique du XBD173 contre les symptômes de la SEP. En effet, une étude antérieure, qui a testé le XBD173 dans l'EAE induite par la MOG chez la souris et les rats agoutis, a conclu que le XBD173 n'est pas efficace pour améliorer les symptômes cliniques dans ces modèles de rongeurs mimant la forme progressive de la pathologie humaine, alors que l'étifoxine, un autre ligand de TSPO, était efficace (Ravikumar et al. 2016). La dose de XBD173 testée dans cette étude est de 30 mg/kg, ce qui est 3 fois supérieure à la dose de 10 mg/kg, qui montre une efficacité optimale dans notre travail. Par ailleurs, les expériences préliminaires que nous avons menées sur les souris C57BL/6J, dont l'EAE a été induite par la MOG, ont démontré l'efficacité de XBD173 à la dose de 15 mg/kg sur le critère des SC. L'ensemble de ces données suggère que l'efficacité des doses de XBD173 dans le traitement de la SEP peut dépendre spécifiquement des formes de la pathologie. Toutefois, d'autres recherches seront nécessaires pour préciser si les doses de XBD173 inférieures à 30 mg/kg sont effectivement bénéfiques dans les modèles EAE induits par la MOG. En effet, il semble plus encourageant et raisonnable de s'attendre au développement d'une stratégie thérapeutique sûre et efficace dépourvue d'effets secondaires sur la base de données précliniques obtenues avec une faible dose de XBD 173, et non une dose élevée. De façon intéressante, l'efficacité de XBD173 à 10 mg/kg dans les modèles de souris présentant la forme rémittente récurrente présentée dans ce travail, est parfaitement en accord, avec des études antérieures qui ont également constaté que la même dose (10 mg/kg) de XBD 173 protégeait efficacement contre les symptômes neuroinflammatoires et la dégénérescence rétinienne chez la souris (Karlstetter et al. 2014; Scholz et al. 2015).

Les immunomodulateurs, comme l'IFN- β (Avonex®, Betaferon®, Rebif®) qui agissent sur la phase inflammatoire de la maladie sont efficaces sur les formes rémittentes (Clerico et al. 2007; Lopez De Padilla et al. 2015). Concrètement, ils diminuent d'environ 30 % la fréquence des poussées et d'environ 36% les rechutes mais provoquent de lourds effets secondaires (Calabresi et al. 2014; Marziniak and Meuth 2014). De plus, tous les patients ne semblent pas répondre de la même façon à ce traitement. Par ailleurs, l'IFN- β n'agit que sur la composante inflammatoire et, de ce fait, l'impact sur la composante dégénérative de la maladie est limité puisqu'il ne prévient ni la démyélinisation ni les dommages axonaux. L'idée d'une bithérapie en associant l'IFN- β et le XBD173 pourrait ainsi permettre d'améliorer les SC en agissant à la fois sur les processus inflammatoires et neurodégénératifs. L'administration d'IFN- β seul a significativement réduit les symptômes au pic de la maladie chez les souris EAE-PLP, comme cela a déjà été montré dans d'autres modèles d'EAE (Cheng et al. 2015; Lubina-Dabrowska et al. 2017). Le traitement concomitant IFN- β et XBD173 (10 mg/kg) a également conduit à un effet bénéfique en diminuant les symptômes au pic de la maladie, sans être plus actif que l'IFN- β ou XBD173 seuls. Toutefois, pendant la phase de rémission (J18-22), les SC indiquent que le traitement combiné (IFN- β et XBD173) est plus efficace que celui de l'IFN- β seul. La phase de rémission correspond à l'étape de remyélinisation, d'atténuation des processus inflammatoires et à une certaine activité réparatrice des lésions axonales (Podbielska et al. 2013; Soellner et al. 2013). De ce fait, on peut donc penser que plus les symptômes sont atténués (SC très faibles), plus les processus de réparation sont accomplis, plus la récupération est optimale et plus l'évolution de la maladie sera limitée. La bithérapie pourrait donc être une alternative à envisager mais les tests précliniques que nous avons menés doivent encore être complétés et consolidés.

Outre l'évaluation des symptômes de la maladie, nous avons également effectué des études histopathologiques, des analyses de RT-qPCR et de cytométrie de flux pour déterminer

l'effet de XBD173 sur les marqueurs tissulaires et/ou cellulaires afin d'évaluer les mécanismes qui peuvent éventuellement être impliqués dans l'action bénéfique induite par le XBD173 dans le modèle de souris EAE mimant la forme rémittente récurrente de la pathologie. En adéquation avec nos observations cliniques et comportementales, nous avons constaté que le traitement par le XBD173 restaure les niveaux normaux d'expressions de la protéine et de l'ARNm de MBP, protéine majoritaire de la myéline (Harauz et al. 2004; Harauz et al. 2009). L'expression de cette protéine a été réprimée de manière significative chez les souris EAE-PLP dans les structures spinales et cérébrales. La protéine MBP est un marqueur clé du taux de myélinisation dans le SNC et une diminution de son expression provoque des troubles démyélinisants, que l'on retrouve chez les patients atteints de SEP dont l'étiologie de la pathologie a été corrélée aux anticorps contre la protéine MBP (Deber and Reynolds 1991; Yang et al. 2017). Nos expériences, réalisées avec le kit SG pour évaluer la distribution cérébrale de la protéine MBP, montrent une diminution globale de la densité de l'immunoréactivité de MBP qui révèle la présence d'une démyélinisation chez la souris EAE. Le traitement avec XBD173, mais pas avec le véhicule, améliore nettement la distribution cérébrale de MBP et rétablit le niveau normal de myélinisation chez les souris EAE. De plus, les analyses de RT-qPCR ont révélé que le traitement avec le XBD173 favorise l'activation de l'expression du gène codant MBP et la quantification de l'immunofluorescence de la protéine MBP, réalisée avec le logiciel Olympus cellSens Dimension, a confirmé que le XBD173 a également augmenté le taux de protéine MBP chez les souris EAE dans la ME et le cerveau. Nous avons également constaté que le traitement avec le XBD173 a efficacement contrecarré la répression de la protéine MBP et la démyélinisation dans le corps calleux (structure la plus myélinisée du cerveau), le cortex cérébral, le cervelet et la ME qui contrôlent de nombreuses fonctions physiologiques y compris les activités motrices et sensorielles, la communication inter-hémisphérique, la démarche, la posture, la coordination des mouvements, les fonctions

cognitives et visuelles qui sont affectées dans la SEP (Compston and Coles 2008; Siddiqui et al. 2008; Kansal et al. 2017). La souffrance axonale et les dommages neuronaux, subséquents aux atteintes de la myéline, sont responsables de handicap et de symptômes neurologiques graves (Haines et al. 2011; Lee et al. 2014). Des études histopathologiques et/ou des analyses de RT-qPCR ont été réalisées pour étudier l'expression de deux marqueurs spécifiques des axones, les protéines CRMP2 et NF200 (Xie et al. 2010; Zhang et al. 2016). Ces expériences, bien que préliminaires, ont montré que ces protéines sont réprimées de manière significative chez les souris EAE-PLP dans la partie lombaire de la ME. Le traitement par le XBD173 a permis de restaurer les niveaux normaux d'expressions des ARNm codant CRMP2 et NF200. La diminution de l'expression de ces deux protéines pourrait provoquer des lésions axonales retrouvées chez les patients atteints de SEP (Haines et al. 2011). Toutefois, ces expériences devront être développées et envisagées dans le cerveau où une démyélinisation est également détectée.

Des travaux supplémentaires seront certainement nécessaires pour élucider les voies de signalisation déclenchées par le XBD173 pour favoriser l'expression des MBP, CRMP2, et NF200. Toutefois, étant donné que XBD173 active la translocation du cholestérol *via* la modulation de TSPO et la synthèse de PREG stimulant ainsi la production de neurostéroïdes-neuroprotecteurs tels que la progestérone et l'AP, la régulation de l'expression de MBP, CRMP2 et NF200 par XBD173 pourrait résulter de cette cascade de signalisation dépendante de la voie des neurostéroïdes (Djebaili et al. 2004; Brinton 2013; Irwin et al. 2014; Patten-Mensah et al. 2014). À l'appui de cette idée, l'altération de la production de neurostéroïdes a été mise en évidence chez les patients atteints de SEP et une diminution de la gravité des symptômes des animaux EAE a été observée chez les rongeurs traités avec la progestérone ou l'AP (Leitner 2010; Yates et al. 2010; Giatti et al. 2012; Caruso et al. 2014). Le dosage de l'AP, réalisé au cours de notre étude, montre une diminution de ce neurostéroïde chez les

souris EAE-PLP par rapport aux animaux contrôles. Ce résultat est cohérent avec ce qui est observé dans la forme récurrente-rémittente de la pathologie où les valeurs d'AP sont significativement plus faibles dans le LCR des patients atteints de SEP (Orefice et al. 2016). La diminution d'AP induite par l'EAE est rétablie chez les animaux traités au XBD173 (10 et 20 mg/kg) dans la ME et le cerveau. Le XBD173 *via* sa fixation sur le récepteur TSPO stimule la cascade des neurostéroïdes et augmente, en particulier, la synthèse de l'AP. La production d'AP, dont le rôle neuroprotecteur est bien établi (Meyer et al. 2011; Patte-Mensah et al. 2014; Guennoun et al. 2015), pourrait conduire aux effets bénéfiques du XBD173.

Cependant, l'induction d'anti-inflammatoires reste une étape majeure pour élucider les mécanismes impliqués dans l'action protectrice de XBD173 chez les souris EAE. En effet, de précédents travaux, utilisant des doses élevées de XBD173 (30 mg/kg), ont montré que cette molécule active fortement la production de prégnénolone, mais n'est pas capable de réduire les symptômes cliniques chez les rongeurs EAE-MOG. En revanche, bien que l'étifoxine (50 mg/kg) n'ait pas induit un niveau élevé de neurostéroïdes, elle a exercé des effets bénéfiques sur la symptomatologie des animaux EAE (Ravikumar et al. 2016). Par conséquent, la modulation positive de la production de neurostéroïdes peut ne pas être le seul mécanisme activé par XBD173 pour prévenir ou contrecarrer les paramètres cliniques, comportementaux, histologiques et moléculaires que nous avons observés chez les souris SJL/J RJ-PLP. Par conséquent, nous avons également effectué des analyses de cytométrie de flux pour déterminer l'effet du traitement de XBD173 sur la concentration d'interleukines pro-inflammatoires, qui sont considérées comme des facteurs déterminants dans les maladies auto-immunes (Akdis et al. 2016; Kuwabara et al. 2017). En effet, les phases de rechutes dans la SEP sont caractérisées par une augmentation des cytokines pro-inflammatoires, et un niveau accru d'IL-17, d'IL-6, de TNF- α et d'IFN- γ est maintenant bien établi comme indice pertinent pour évaluer cet état pro-inflammatoire conduisant à endommager les tissus dans

une neuroinflammation chronique (Frei et al. 1991; Mikova et al. 2001; Korn et al. 2009; Poyraz et al. 2013; Wullschleger et al. 2013; Luchtman et al. 2014). Nos données montrent que les valeurs des taux d'IL-17A et TNF- α dans le sérum des animaux traités par XBD173 (10 ou 20 mg/kg) sont revenues à des valeurs normales alors qu'elles avaient considérablement augmenté chez les souris EAE (IL-17A :2,5- et TNF- α : 2-fois plus). Le XBD173 à la dose de 10 mg/kg a également diminué le taux d'IL-6, fortement augmenté chez la souris EAE. Bien que peu de données existent sur l'effet du XBD173 sur ces 4 cytokines pro-inflammatoires dans des modèles de neuroinflammation, une étude antérieure a montré que le XBD173 diminue le niveau d'ARNm d'IL-6, dans un modèle d'inflammation de la rétine (Karlstetter et al. 2014) confirmant ainsi l'effet obtenu chez les souris SJL/J RJ-PLP.

L'ensemble de nos résultats suggère que le XBD173 peut interagir avec TSPO présent sur les cellules immunitaires (Rocca et al. 1993; Zhang et al. 2017) pour diminuer la production de cytokines pro-inflammatoires. Cela permettra de prévenir le processus de démyélinisation induit par la neuroinflammation conduisant à la sévérité des symptômes de la maladie d'EAE. À l'appui de cette idée, le ligand TSPO Etifoxine qui permet d'empêcher l'infiltration des cellules CD4⁺ dans le SNC des rongeurs EAE-MOG, diminue aussi l'expression de l'ARNm de l'IFN- γ et de l'IL-17 dans les cellules CD4⁺ (Daugherty et al. 2013). De plus, il a récemment été démontré que les ligands TSPO, FGIN1-27 et Ro5-4864, qui ont bloqué la production de cytokines de manière dose-dépendante dans des cellules T CD4⁺ humaines purifiées, ont également inhibé la synthèse de l'IFN- γ chez les lymphocytes T CD4⁺ (Zhang et al. 2017). Outre l'action directe de XBD173 sur les cellules immunitaires, il est également possible d'envisager que l'AP pourrait réguler les mécanismes inflammatoires. En effet, bien que nous ne les ayons pas dosés, il est probable que les taux circulants d'AP soient augmentés suite à l'action de XBD173 sur les récepteurs TSPO présents en périphérie. L'AP pourrait alors activer les récepteurs GABA_A localisés sur les cellules immunitaires

(Reyes-Garcia et al. 2007; Mendu et al. 2012; Noorbakhsh et al. 2014) pour diminuer la production des cytokines. Pour étayer cette hypothèse, des études antérieures ont montré que le traitement par l'AP réduit la production de TNF- α et d'IL-1 β libérés par des macrophages murins et humains (Ghezzi et al. 2000; Bhat et al. 2010; Noorbakhsh et al. 2014). Quel que soit le mécanisme mis en jeu, l'activation du processus anti-inflammatoire ou la régulation négative des facteurs pro-inflammatoires semble déterminer, de manière critique, l'effet bénéfique évoqué par le XBD173 chez les souris EAE.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

En conclusion, nos études montrent que le traitement au XBD173, ligand spécifique du TSPO, diminue la production d'interleukines pro-inflammatoires IL-17A, IL-6 et TNF- α , contrecarre la démyélinisation induite par la répression du gène MBP, empêche la perte axonale évaluée par les marqueurs CRMP2 et NF200, retarde l'apparition des symptômes tout en atténuant leur sévérité chez les animaux EAE-PLP mimant la forme rémittente récurrente de la pathologie. Ces effets bénéfiques pourraient s'expliquer, au moins partiellement, par la stimulation de la synthèse d'AP induite par le XBD173 (Fig. 43).

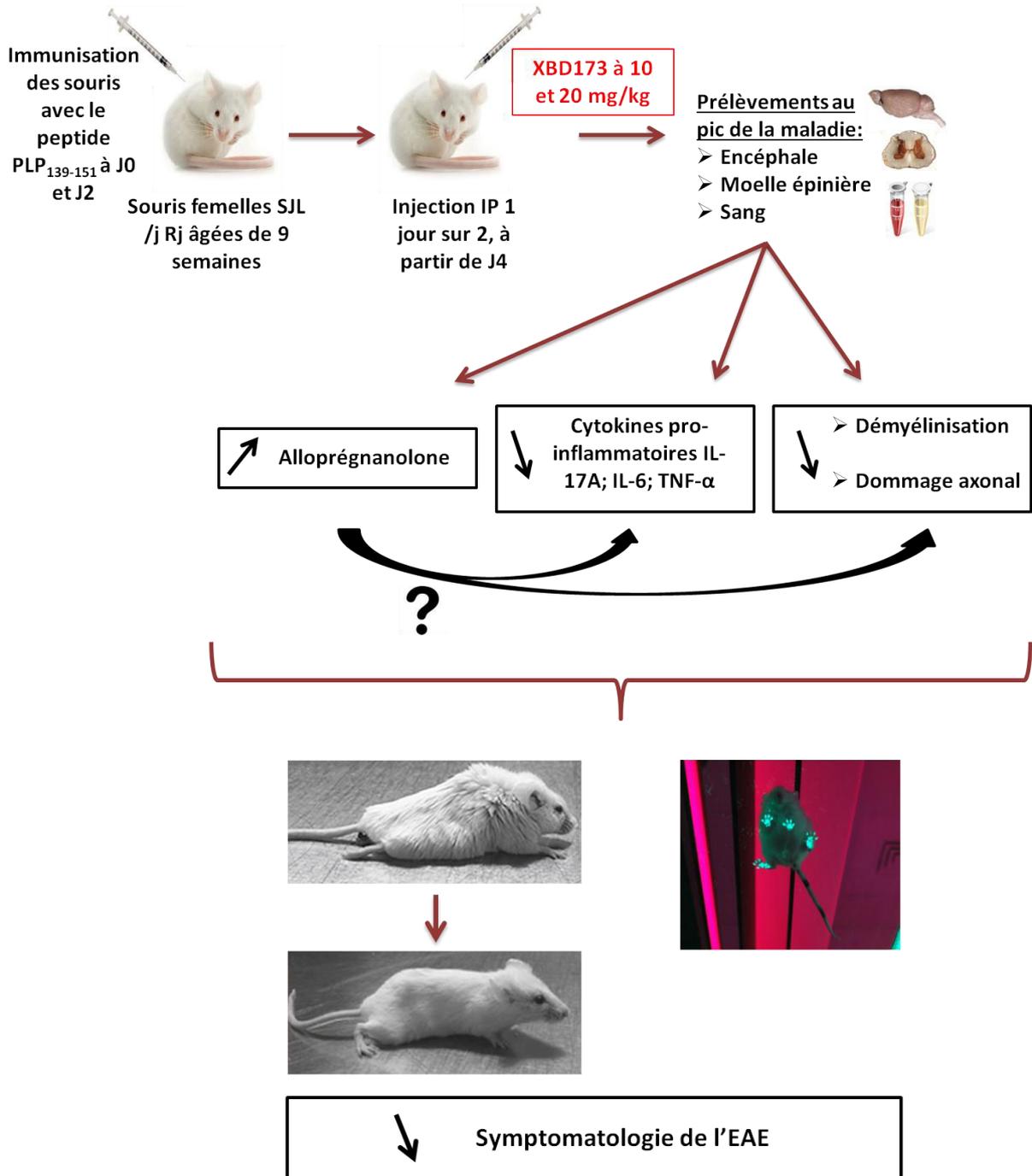


Fig. 43: Récapitulatif des principales étapes de l'effet de XBD173 à la dose de 10 mg/kg sur les souris SJL/J Rj-EAE

Les travaux réalisés au cours de ma thèse ouvrent des possibilités intéressantes sur l'utilisation du XBD173 à faible dose pour élaborer des stratégies thérapeutiques efficaces contre la SEP avec peu ou pas d'effets secondaires à long terme.

Les perspectives que nous envisageons se déclinent à court et moyen termes. Dans un premier temps, nous étofferons les études que nous avons commencées pendant la thèse et pour lesquelles les résultats étaient préliminaires:

- Nous confirmerons tout d'abord l'action du XBD173 dans le modèle EAE-MOG en vérifiant l'efficacité des faibles doses de XBD173 sur la symptomatologie de l'EAE. Nous poursuivrons les études dans ce modèle en recherchant l'effet de ce composé sur les concentrations spinales et cérébrales de l'AP. Nous doserons également les cytokines chez les souris EAE-MOG traitées ou non par le XBD173. Enfin, nous étudierons les effets de XBD173 sur la démyélinisation et les dommages axonaux, qui se produisent chez les souris malades. Les résultats obtenus permettront de confirmer l'efficacité de XBD173 dans le modèle EAE-MOG, caractéristique de la forme progressive de la SEP.

- Nous évaluerons également les concentrations d'autres cytokines pro- et anti-inflammatoires, dans le sérum des animaux EAE-PLP. En effet, nous avons montré l'effet du XBD173 sur plusieurs cytokines pro-inflammatoires mais il serait aussi intéressant d'étudier ses effets sur des cytokines anti-inflammatoires comme l'IL-10.

- La SEP représente la cause majeure de handicap dans la tranche d'âge comprise entre 20 et 40 ans. Ce handicap est intrinsèquement lié aux lésions démyélinisantes qui apparaissent par plaques au sein de la substance blanche du SNC et aux dommages axonaux subséquents. Il est donc important de poursuivre les études de l'effet de XBD173 sur les marqueurs spécifiques des lésions axonales, CRMP2 et NF200. Pour cela, nous utiliserons les techniques d'immunohistologie et de RT-qPCR.

- Malgré la prévalence de la SEP plus élevée chez la femme que chez l'homme (voir introduction de la thèse), il serait néanmoins intéressant d'étudier l'action de XBD173 chez la souris SJL/J Rj mâles et la souris C57BL/6J femelles, afin de vérifier si les effets de XBD173 sont indépendants du sexe de l'animal.

- Enfin, nous continuerons les recherches sur l'effet de l'administration combinée de XBD173 et de l'IFN- β dans le modèle EAE, dans l'espoir d'obtenir suffisamment de données précliniques pour proposer un essai clinique avec cette combinaison de thérapie.

Par ailleurs, nous étudierons également si des injections de XBD173 au moment de l'apparition des premiers symptômes à J8 ou J10 (thérapie curative) sont aussi efficaces que l'approche préventive utilisée dans la thèse qui a consisté à administrer le XBD173 à partir du 4^{ème} jour post-immunisation (J4).

Les travaux réalisés depuis plusieurs années par les chercheurs de l'Unité INSERM U1119 ont permis de sélectionner une série de molécules nouvelles et originales ayant un fort potentiel neuroprotecteur (Schaeffer et al. 2008; Schaeffer et al. 2008; Meyer et al. 2010; Patte-Mensah et al. 2010; Schaeffer et al. 2010; Meyer et al. 2011; Klein et al. 2013; Meyer et al. 2013; Patte-Mensah et al. 2014; Wendt et al. 2014) et que nous avons brevetées (Mensah-Nyagan et al. WO 2012/127176 A1; Maître et al. WO 2013/024028 A1). Nous avons donc émis l'hypothèse que certaines de ces molécules, notamment les analogues originaux de neurostéroïdes (ANS), et les nouveaux inducteurs de metalloprotéases (NIM) pourraient servir à élaborer des stratégies neuroprotectrices pour traiter ou protéger les patients SEP contre la souffrance axonale/neuronale qui résulte des atteintes de la myéline. Il serait donc intéressant de tester également ces molécules dans notre modèle EAE.

Etant donné que l'ensemble de nos travaux chez l'animal est effectué en étroite collaboration avec les médecins-neurologues spécialistes de la SEP qui sont membres actifs de notre Unité INSERM (U1119) et du Centre d'Investigation Clinique de Strasbourg, nous

pouvons raisonnablement espérer que les résultats prometteurs issus de la thèse et les perspectives prévues contribueront à monter des essais cliniques permettant le transfert, vers la clinique humaine, de stratégies neuroprotectrices innovantes et efficaces contre la SEP.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

- Adeosun, S. O., X. Hou, et al. (2012). "Allopregnanolone reinstates tyrosine hydroxylase immunoreactive neurons and motor performance in an MPTP-lesioned mouse model of Parkinson's disease." *PLoS One* **7**(11): e50040.
- Aharoni, R. (2010). "Immunomodulatory drug treatment in multiple sclerosis." *Expert Rev Neurother* **10**(9): 1423-1436.
- Akdis, M., A. Aab, et al. (2016). "Interleukins (from IL-1 to IL-38), interferons, transforming growth factor beta, and TNF-alpha: Receptors, functions, and roles in diseases." *J Allergy Clin Immunol* **138**(4): 984-1010.
- Akwa, Y., H. Allain, et al. (2005). "Neuroprotection and neurodegenerative diseases: from biology to clinical practice." *Alzheimer Dis Assoc Disord* **19**(4): 226-239.
- Akwa, Y., N. Ladurelle, et al. (2001). "The synthetic enantiomer of pregnenolone sulfate is very active on memory in rats and mice, even more so than its physiological neurosteroid counterpart: distinct mechanisms?" *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(24): 14033-14037.
- Akwa, Y., R. H. Purdy, et al. (1999). "The amygdala mediates the anxiolytic-like effect of the neurosteroid allopregnanolone in rat." *Behav Brain Res* **106**(1-2): 119-125.
- Al Jumah, M. A. and M. H. Abumaree (2012). "The immunomodulatory and neuroprotective effects of mesenchymal stem cells (MSCs) in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE): a model of multiple sclerosis (MS)." *Int J Mol Sci* **13**(7): 9298-9331.
- Alizadeh, A., S. M. Dyck, et al. (2015). "Myelin damage and repair in pathologic CNS: challenges and prospects." *Front Mol Neurosci* **8**: 35.
- Alonso, A. and M. A. Hernan (2008). "Temporal trends in the incidence of multiple sclerosis: a systematic review." *Neurology* **71**(2): 129-135.
- Amankwah, N., R. A. Marrie, et al. (2017). "Multiple sclerosis in Canada 2011 to 2031: results of a microsimulation modelling study of epidemiological and economic impacts." *Health Promot Chronic Dis Prev Can* **37**(2): 37-48.
- Amor, S., P. A. Smith, et al. (2005). "Biozzi mice: of mice and human neurological diseases." *J Neuroimmunol* **165**(1-2): 1-10.
- Androutsou, M. E., A. Tapeinou, et al. (2017). "Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein and Multiple Sclerosis." *Med Chem*.
- Aouad, M., A. Charlet, et al. (2009). "Reduction and prevention of vincristine-induced neuropathic pain symptoms by the non-benzodiazepine anxiolytic etifoxine are mediated by 3alpha-reduced neurosteroids." *Pain* **147**(1-3): 54-59.
- Aouad, M., N. Petit-Demouliere, et al. (2014). "Etifoxine stimulates allopregnanolone synthesis in the spinal cord to produce analgesia in experimental mononeuropathy." *Eur J Pain* **18**(2): 258-268.
- Arbo, B. D., F. Benetti, et al. (2015). "Therapeutic actions of translocator protein (18 kDa) ligands in experimental models of psychiatric disorders and neurodegenerative diseases." *J Steroid Biochem Mol Biol* **154**: 68-74.
- Arnold, S. and C. Beyer (2009). "Neuroprotection by estrogen in the brain: the mitochondrial compartment as presumed therapeutic target." *J Neurochem* **110**(1): 1-11.
- ARSEP-fondation. (2017). "Prévalence de la sclérose en plaques dans le monde." from <https://www.arsep.org/fr/168-d%C3%A9finition%20et%20chiffres.html>.
- Awad, M. and M. Gavish (1987). "Binding of [3H]Ro 5-4864 and [3H]PK 11195 to cerebral cortex and peripheral tissues of various species: species differences and heterogeneity in peripheral benzodiazepine binding sites." *J Neurochem* **49**(5): 1407-1414.

- Azcoitia, I., E. Leonelli, et al. (2003). "Progesterone and its derivatives dihydroprogesterone and tetrahydroprogesterone reduce myelin fiber morphological abnormalities and myelin fiber loss in the sciatic nerve of aged rats." *Neurobiol Aging* **24**(6): 853-860.
- Baker, D., J. K. O'Neill, et al. (1990). "Induction of chronic relapsing experimental allergic encephalomyelitis in Biozzi mice." *J Neuroimmunol* **28**(3): 261-270.
- Bakuraysah, M. M., C. Siatskas, et al. (2016). "Hematopoietic stem cell transplantation for multiple sclerosis: is it a clinical reality?" *Stem Cell Res Ther* **7**: 12.
- Bali, A. and A. S. Jaggi (2014). "Multifunctional aspects of allopregnanolone in stress and related disorders." *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* **48**: 64-78.
- Bamm, V. V., M. De Avila, et al. (2011). "Structured functional domains of myelin basic protein: cross talk between actin polymerization and Ca(2+)-dependent calmodulin interaction." *Biophys J* **101**(5): 1248-1256.
- Bankston, A. N., M. D. Mandler, et al. (2013). "Oligodendroglia and neurotrophic factors in neurodegeneration." *Neurosci Bull* **29**(2): 216-228.
- Barnett, M. H., E. Mathey, et al. (2016). "Axonal damage in central and peripheral nervous system inflammatory demyelinating diseases: common and divergent pathways of tissue damage." *Curr Opin Neurol* **29**(3): 213-221.
- Barnett, M. H., D. B. Williams, et al. (2003). "Progressive increase in incidence and prevalence of multiple sclerosis in Newcastle, Australia: a 35-year study." *J Neurol Sci* **213**(1-2): 1-6.
- Barron, A. M., L. M. Garcia-Segura, et al. (2013). "Ligand for translocator protein reverses pathology in a mouse model of Alzheimer's disease." *J Neurosci* **33**(20): 8891-8897.
- Bashir, K. and J. N. Whitaker (1998). "Current immunotherapy in multiple sclerosis." *Immunol Cell Biol* **76**(1): 55-64.
- Baulieu, E. E. (1997). "Neurosteroids: of the nervous system, by the nervous system, for the nervous system." *Recent Prog Horm Res* **52**: 1-32.
- Baulieu, E. E. (1999). "Neuroactive neurosteroids: dehydroepiandrosterone (DHEA) and DHEA sulphate." *Acta Paediatr Suppl* **88**(433): 78-80.
- Baumann, N. and D. Pham-Dinh (2001). "Biology of oligodendrocyte and myelin in the mammalian central nervous system." *Physiol Rev* **81**(2): 871-927.
- Baxter, A. G. (2007). "The origin and application of experimental autoimmune encephalomyelitis." *Nat Rev Immunol* **7**(11): 904-912.
- Bayer-AG "Examen neurologique."
- Beato, M. and J. Klug (2000). "Steroid hormone receptors: an update." *Hum Reprod Update* **6**(3): 225-236.
- Bebo, B. F., Jr., A. Fyfe-Johnson, et al. (2001). "Low-dose estrogen therapy ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis in two different inbred mouse strains." *J Immunol* **166**(3): 2080-2089.
- Becher, B., B. G. Durell, et al. (2002). "Experimental autoimmune encephalitis and inflammation in the absence of interleukin-12." *J Clin Invest* **110**(4): 493-497.
- Belbasis, L., V. Bellou, et al. (2015). "Environmental risk factors and multiple sclerosis: an umbrella review of systematic reviews and meta-analyses." *Lancet Neurol* **14**(3): 263-273.
- Bengtsson, S. K., S. Nyberg, et al. (2015). "Isoallopregnanolone antagonize allopregnanolone-induced effects on saccadic eye velocity and self-reported sedation in humans." *Psychoneuroendocrinology* **52**: 22-31.
- Bergmann, C. C., T. E. Lane, et al. (2006). "Coronavirus infection of the central nervous system: host-virus stand-off." *Nat Rev Microbiol* **4**(2): 121-132.

- Betelli, E., M. P. Das, et al. (1998). "IL-10 is critical in the regulation of autoimmune encephalomyelitis as demonstrated by studies of IL-10- and IL-4-deficient and transgenic mice." J Immunol **161**(7): 3299-3306.
- Bhat, R., R. Axtell, et al. (2010). "Inhibitory role for GABA in autoimmune inflammation." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(6): 2580-2585.
- Bianchi, M. and E. E. Baulieu (2012). "3beta-Methoxy-pregnenolone (MAP4343) as an innovative therapeutic approach for depressive disorders." Proc Natl Acad Sci U S A **109**(5): 1713-1718.
- Biozzi, G., C. Stiffel, et al. (1972). "Cytodynamics of the immune response in two lines of mice genetically selected for "high" and "low" antibody synthesis." J Exp Med **135**(5): 1071-1094.
- Bird, T. D. (1993). "Charcot-Marie-Tooth Hereditary Neuropathy Overview."
- Biswas, G., S. Srinivasan, et al. (2008). "Dioxin-mediated tumor progression through activation of mitochondria-to-nucleus stress signaling." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(1): 186-191.
- Bittner, S., A. M. Afzali, et al. (2014). "Myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG35-55) induced experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) in C57BL/6 mice." J Vis Exp(86).
- Bornsen, L., J. R. Christensen, et al. (2012). "Effect of natalizumab on circulating CD4+ T-cells in multiple sclerosis." PLoS One **7**(11): e47578.
- Borowicz, K. K., B. Piskorska, et al. (2011). "Neuroprotective actions of neurosteroids." Front Endocrinol (Lausanne) **2**: 50.
- Bradl, M. and H. Lassmann (2010). "Oligodendrocytes: biology and pathology." Acta Neuropathol **119**(1): 37-53.
- Brinton, R. D. (2013). "Neurosteroids as regenerative agents in the brain: therapeutic implications." Nat Rev Endocrinol **9**(4): 241-250.
- Briskin, C. and B. O'Malley (2010). "Hormone action in the mammary gland." Cold Spring Harb Perspect Biol **2**(12): a003178.
- Brot, M. D., Y. Akwa, et al. (1997). "The anxiolytic-like effects of the neurosteroid allopregnanolone: interactions with GABA(A) receptors." Eur J Pharmacol **325**(1): 1-7.
- Brown, E. S., J. Park, et al. (2014). "A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of pregnenolone for bipolar depression." Neuropsychopharmacology **39**(12): 2867-2873.
- Budde, M. D., J. H. Kim, et al. (2008). "Axonal injury detected by in vivo diffusion tensor imaging correlates with neurological disability in a mouse model of multiple sclerosis." NMR Biomed **21**(6): 589-597.
- Calabresi, P. A., B. C. Kieseier, et al. (2014). "Pegylated interferon beta-1a for relapsing-remitting multiple sclerosis (ADVANCE): a randomised, phase 3, double-blind study." Lancet Neurol **13**(7): 657-665.
- Calabresi, P. A., E. W. Radue, et al. (2014). "Safety and efficacy of fingolimod in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis (FREEDOMS II): a double-blind, randomised, placebo-controlled, phase 3 trial." Lancet Neurol **13**(6): 545-556.
- Cappelli, A., G. Giuliani, et al. (2008). "Synthesis and structure-activity relationship studies in peripheral benzodiazepine receptor ligands related to alpidem." Bioorg Med Chem **16**(6): 3428-3437.
- Caruso, D., M. Melis, et al. (2014). "Neuroactive steroid levels in plasma and cerebrospinal fluid of male multiple sclerosis patients." J Neurochem **130**(4): 591-597.
- Castro-Manreza, M. E. and J. J. Montesinos (2015). "Immunoregulation by mesenchymal stem cells: biological aspects and clinical applications." J Immunol Res **2015**: 394917.
- Charcot.org "Nouvelles données épidémiologiques dans la SEP "

- Chen, M. K. and T. R. Guilarte (2008). "Translocator protein 18 kDa (TSPO): molecular sensor of brain injury and repair." *Pharmacol Ther* **118**(1): 1-17.
- Chen, S., J. M. Wang, et al. (2011). "Allopregnanolone promotes regeneration and reduces beta-amyloid burden in a preclinical model of Alzheimer's disease." *PLoS One* **6**(8): e24293.
- Chen, S. C., B. C. Liu, et al. (2006). "Intradermal pregnenolone sulfate attenuates capsaicin-induced nociception in rats." *Biochem Biophys Res Commun* **349**(2): 626-633.
- Cheng, W., Q. Zhao, et al. (2015). "IFN-beta inhibits T cells accumulation in the central nervous system by reducing the expression and activity of chemokines in experimental autoimmune encephalomyelitis." *Mol Immunol* **64**(1): 152-162.
- Chew, L. J. and C. A. DeBoy (2016). "Pharmacological approaches to intervention in hypomyelinating and demyelinating white matter pathology." *Neuropharmacology* **110**(Pt B): 605-625.
- Ching, A. S., B. Kuhnast, et al. (2012). "Current paradigm of the 18-kDa translocator protein (TSPO) as a molecular target for PET imaging in neuroinflammation and neurodegenerative diseases." *Insights Imaging* **3**(1): 111-119.
- Choi, Y. M. and K. H. Kim (2015). "Etifoxine for pain patients with anxiety." *Korean J Pain* **28**(1): 4-10.
- Cinone, N., H. D. Hotje, et al. (2000). "Development of a unique 3D interaction model of endogenous and synthetic peripheral benzodiazepine receptor ligands." *J Comput Aided Mol Des* **14**(8): 753-768.
- Clerico, M., G. Contessa, et al. (2007). "Interferon-beta1a for the treatment of multiple sclerosis." *Expert Opin Biol Ther* **7**(4): 535-542.
- Compston, A. (1999). "The genetic epidemiology of multiple sclerosis." *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **354**(1390): 1623-1634.
- Compston, A. (2005). "Decade of the brain." *Brain* **128**(Pt 8): 1741-1742.
- Compston, A. and A. Coles (2002). "Multiple sclerosis." *Lancet* **359**(9313): 1221-1231.
- Compston, A. and A. Coles (2008). "Multiple sclerosis." *Lancet* **372**(9648): 1502-1517.
- Confavreux, C., M. Hutchinson, et al. (1998). "Rate of pregnancy-related relapse in multiple sclerosis. Pregnancy in Multiple Sclerosis Group." *N Engl J Med* **339**(5): 285-291.
- Constantinescu, C. S., N. Farooqi, et al. (2011). "Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) as a model for multiple sclerosis (MS)." *Br J Pharmacol* **164**(4): 1079-1106.
- Corpechot, C., P. Robel, et al. (1981). "Characterization and measurement of dehydroepiandrosterone sulfate in rat brain." *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**(8): 4704-4707.
- Corpechot, C., M. Synguelakis, et al. (1983). "Pregnenolone and its sulfate ester in the rat brain." *Brain Res* **270**(1): 119-125.
- Costa, B., E. Da Pozzo, et al. (2016). "Long Residence Time at the Neurosteroidogenic 18 kDa Translocator Protein Characterizes the Anxiolytic Ligand XBD173." *ACS Chem Neurosci* **7**(8): 1041-1046.
- Costa, B., E. Da Pozzo, et al. (2012). "Translocator protein as a promising target for novel anxiolytics." *Curr Top Med Chem* **12**(4): 270-285.
- Costa, E. and A. Guidotti (1991). "Diazepam binding inhibitor (DBI): a peptide with multiple biological actions." *Life Sci* **49**(5): 325-344.
- Cua, D. J., H. Groux, et al. (1999). "Transgenic interleukin 10 prevents induction of experimental autoimmune encephalomyelitis." *J Exp Med* **189**(6): 1005-1010.
- Dai, T., X. Zhou, et al. (2014). "Etifoxine promotes glia-derived neurite outgrowth in vitro and in vivo." *J Reconstr Microsurg* **30**(6): 381-388.

- Darnaudey, M., M. Koehl, et al. (2000). "Pregnenolone sulfate increases hippocampal acetylcholine release and spatial recognition." *Brain Res* **852**(1): 173-179.
- Dastgheib, M., A. R. Dehpour, et al. (2015). "The effects of intra-dorsal hippocampus infusion of pregnenolone sulfate on memory function and hippocampal BDNF mRNA expression of biliary cirrhosis-induced memory impairment in rats." *Neuroscience* **306**: 1-9.
- Daugherty, D. J., V. Selvaraj, et al. (2013). "A TSPO ligand is protective in a mouse model of multiple sclerosis." *EMBO Mol Med* **5**(6): 891-903.
- de Seze, J. (2013). "Inflammatory Optic Neuritis: From Multiple Sclerosis to Neuromyelitis Optica." *Neuroophthalmology* **37**(4): 141-145.
- Dean, L. (2012). Diazepam Therapy and CYP2C19 Genotype. *Medical Genetics Summaries*. V. Pratt, H. McLeod, L. Dean, A. Malheiro and W. Rubinstein. Bethesda (MD).
- Deber, C. M. and S. J. Reynolds (1991). "Central nervous system myelin: structure, function, and pathology." *Clin Biochem* **24**(2): 113-134.
- Debruyne, J. C., J. Versijpt, et al. (2003). "PET visualization of microglia in multiple sclerosis patients using [¹¹C]PK11195." *Eur J Neurol* **10**(3): 257-264.
- Dendrou, C. A., L. Fugger, et al. (2015). "Immunopathology of multiple sclerosis." *Nat Rev Immunol* **15**(9): 545-558.
- Dhir, A. and S. Kulkarni (2008). "Involvement of sigma (sigma1) receptors in modulating the anti-depressant effect of neurosteroids (dehydroepiandrosterone or pregnenolone) in mouse tail-suspension test." *J Psychopharmacol* **22**(6): 691-696.
- Dimitrova-Shumkovska, J., L. Veenman, et al. (2015). The 18 kDa Translocator Protein, Apolipoprotein E and Platelets. *Thrombosis, Atherosclerosis and Atherothrombosis – New Insights and Experimental Protocols*. B.-M. M., InTechOpen.
- Djebaili, M., S. W. Hoffman, et al. (2004). "Allopregnanolone and progesterone decrease cell death and cognitive deficits after a contusion of the rat pre-frontal cortex." *Neuroscience* **123**(2): 349-359.
- Dolati, S., Z. Babaloo, et al. (2017). "Multiple sclerosis: Therapeutic applications of advancing drug delivery systems." *Biomed Pharmacother* **86**: 343-353.
- Dos Passos, G. R., D. K. Sato, et al. (2016). "Th17 Cells Pathways in Multiple Sclerosis and Neuromyelitis Optica Spectrum Disorders: Pathophysiological and Therapeutic Implications." *Mediators Inflamm* **2016**: 5314541.
- Dulamea, A. (2015). "Mesenchymal stem cells in multiple sclerosis - translation to clinical trials." *J Med Life* **8**(1): 24-27.
- Dupont, A. C., B. Largeau, et al. (2017). "Translocator Protein-18 kDa (TSPO) Positron Emission Tomography (PET) Imaging and Its Clinical Impact in Neurodegenerative Diseases." *Int J Mol Sci* **18**(4).
- Durelli, L., P. Barbero, et al. (2009). "Neutralizing antibodies in multiple sclerosis patients treated with 375 micrograms interferon-beta-1b." *Expert Opin Biol Ther* **9**(4): 387-397.
- Dutta, R. and B. D. Trapp (2011). "Mechanisms of neuronal dysfunction and degeneration in multiple sclerosis." *Prog Neurobiol* **93**(1): 1-12.
- Dyment, D. A., G. C. Ebers, et al. (2004). "Genetics of multiple sclerosis." *Lancet Neurol* **3**(2): 104-110.
- Einstein, E. R., D. M. Robertson, et al. (1962). "The isolation from bovine spinal cord of a homogeneous protein with encephalitogenic activity." *J Neurochem* **9**: 353-361.
- El Bitar, F., J. Meunier, et al. (2014). "Neuroprotection by the synthetic neurosteroid enantiomers ent-PREGS and ent-DHEAS against Abeta(2)(5)(-)(3)(5) peptide-induced toxicity in vitro and in vivo in mice." *Psychopharmacology (Berl)* **231**(17): 3293-3312.

- Erta, M., M. Giralt, et al. (2016). "Astrocytic IL-6 Influences the Clinical Symptoms of EAE in Mice." Brain Sci **6**(2).
- Evans, C., S. G. Beland, et al. (2013). "Incidence and prevalence of multiple sclerosis in the Americas: a systematic review." Neuroepidemiology **40**(3): 195-210.
- Evans, C. F., M. S. Horwitz, et al. (1996). "Viral infection of transgenic mice expressing a viral protein in oligodendrocytes leads to chronic central nervous system autoimmune disease." J Exp Med **184**(6): 2371-2384.
- Falkenstein, E., H. C. Tillmann, et al. (2000). "Multiple actions of steroid hormones--a focus on rapid, nongenomic effects." Pharmacol Rev **52**(4): 513-556.
- Farges, R., E. Joseph-Liauzun, et al. (1994). "Site-directed mutagenesis of the peripheral benzodiazepine receptor: identification of amino acids implicated in the binding site of Ro5-4864." Mol Pharmacol **46**(6): 1160-1167.
- Faroni, A. and V. Magnaghi (2011). "The neurosteroid allopregnanolone modulates specific functions in central and peripheral glial cells." Front Endocrinol (Lausanne) **2**: 103.
- Fazakerley, J. K. and M. J. Buchmeier (1993). "Pathogenesis of virus-induced demyelination." Adv Virus Res **42**: 249-324.
- Fazakerley, J. K., C. L. Cotterill, et al. (2006). "Virus tropism, distribution, persistence and pathology in the corpus callosum of the Semliki Forest virus-infected mouse brain: a novel system to study virus-oligodendrocyte interactions." Neuropathol Appl Neurobiol **32**(4): 397-409.
- Ferber, I. A., S. Brocke, et al. (1996). "Mice with a disrupted IFN-gamma gene are susceptible to the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE)." J Immunol **156**(1): 5-7.
- Ferri, C. and M. Fioranelli (2014). "The Role of Pregnenolone in Inflammatory Degenerative Brain Disease." Interdiscip J Microinflammation **1**(2).
- Filipi, M. L., J. Beavin, et al. (2014). "Nurses' perspective on approaches to limit flu-like symptoms during interferon therapy for multiple sclerosis." Int J MS Care **16**(1): 55-60.
- Finocchi, C. and M. Ferrari (2011). "Female reproductive steroids and neuronal excitability." Neurol Sci **32 Suppl 1**: S31-35.
- Flachenecker, P., T. Kumpfel, et al. (2002). "Fatigue in multiple sclerosis: a comparison of different rating scales and correlation to clinical parameters." Mult Scler **8**(6): 523-526.
- Fletcher, J. M., S. J. Lalor, et al. (2010). "T cells in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis." Clin Exp Immunol **162**(1): 1-11.
- Flood, J. F., J. E. Morley, et al. (1992). "Memory-enhancing effects in male mice of pregnenolone and steroids metabolically derived from it." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **89**(5): 1567-1571.
- Folch, J. and M. Lees (1951). "Proteolipides, a new type of tissue lipoproteins; their isolation from brain." J Biol Chem **191**(2): 807-817.
- Frei, K., H. P. Eugster, et al. (1997). "Tumor necrosis factor alpha and lymphotoxin alpha are not required for induction of acute experimental autoimmune encephalomyelitis." J Exp Med **185**(12): 2177-2182.
- Frei, K., S. Fredrikson, et al. (1991). "Interleukin-6 is elevated in plasma in multiple sclerosis." J Neuroimmunol **31**(2): 147-153.
- Frohman, T. C., W. Castro, et al. (2011). "Symptomatic therapy in multiple sclerosis." Ther Adv Neurol Disord **4**(2): 83-98.
- Fujinami, R. S., M. G. von Herrath, et al. (2006). "Molecular mimicry, bystander activation, or viral persistence: infections and autoimmune disease." Clin Microbiol Rev **19**(1): 80-94.

- Fukaya, T., T. Ishiyama, et al. (2013). "Identification of a novel benzoxazolone derivative as a selective, orally active 18 kDa translocator protein (TSPO) ligand." J Med Chem **56**(20): 8191-8195.
- Fulton, D., P. M. Paez, et al. (2010). "The multiple roles of myelin protein genes during the development of the oligodendrocyte." ASN Neuro **2**(1): e00027.
- Gaindh, D., K. S. Kavak, et al. (2016). "Decreased risk of cancer in multiple sclerosis patients and analysis of the effect of disease modifying therapies on cancer risk." J Neurol Sci **370**: 13-17.
- Gajofatto, A. and M. D. Benedetti (2015). "Treatment strategies for multiple sclerosis: When to start, when to change, when to stop?" World J Clin Cases **3**(7): 545-555.
- Gale, C. R. and C. N. Martyn (1995). "Migrant studies in multiple sclerosis." Prog Neurobiol **47**(4-5): 425-448.
- Galetta, K. M., J. Graves, et al. (2012). "Visual pathway axonal loss in benign multiple sclerosis: a longitudinal study." J Neuroophthalmol **32**(2): 116-123.
- Gatliff, J. and M. Campanella (2016). "TSPO: kaleidoscopic 18-kDa amid biochemical pharmacology, control and targeting of mitochondria." Biochem J **473**(2): 107-121.
- Gerhard, A., B. Neumaier, et al. (2000). "In vivo imaging of activated microglia using [11C]PK11195 and positron emission tomography in patients after ischemic stroke." Neuroreport **11**(13): 2957-2960.
- Ghezzi, P., E. D. Santo, et al. (2000). "Neurosteroid levels are increased in vivo after LPS treatment and negatively regulate LPS-induced TNF production." Eur Cytokine Netw **11**(3): 464-469.
- Gianfrancesco, M. A. and L. F. Barcellos (2016). "Obesity and Multiple Sclerosis Susceptibility: A Review." J Neurol Neuromedicine **1**(7): 1-5.
- Giatti, S., M. Boraso, et al. (2012). "Neuroactive steroids, their metabolites, and neuroinflammation." J Mol Endocrinol **49**(3): R125-134.
- Girard, C., S. Liu, et al. (2012). "Axonal regeneration and neuroinflammation: roles for the translocator protein 18 kDa." J Neuroendocrinol **24**(1): 71-81.
- Girard, C., S. Liu, et al. (2008). "Etifoxine improves peripheral nerve regeneration and functional recovery." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(51): 20505-20510.
- Gold, S. M. and R. R. Voskuhl (2009). "Estrogen and testosterone therapies in multiple sclerosis." Prog Brain Res **175**: 239-251.
- Goldmann, T. and M. Prinz (2013). "Role of microglia in CNS autoimmunity." Clin Dev Immunol **2013**: 208093.
- Gonzalez-Usano, A., O. Cauli, et al. (2014). "Pregnenolone sulfate restores the glutamate-nitric-oxide-cGMP pathway and extracellular GABA in cerebellum and learning and motor coordination in hyperammonemic rats." ACS Chem Neurosci **5**(2): 100-105.
- Goverman, J., A. Woods, et al. (1993). "Transgenic mice that express a myelin basic protein-specific T cell receptor develop spontaneous autoimmunity." Cell **72**(4): 551-560.
- Griffin, L. D., W. Gong, et al. (2004). "Niemann-Pick type C disease involves disrupted neurosteroidogenesis and responds to allopregnanolone." Nat Med **10**(7): 704-711.
- Griffiths, I. R., L. S. Mitchell, et al. (1989). "Expression of myelin protein genes in Schwann cells." J Neurocytol **18**(3): 345-352.
- Griggs, R. B., L. M. Yermakov, et al. (2017). "Formation and disruption of functional domains in myelinated CNS axons." Neurosci Res **116**: 77-87.
- Grigoriadis, N., M. Linnebank, et al. (2016). "Considerations on long-term immunointervention in the treatment of multiple sclerosis: an expert opinion." Expert Opin Pharmacother **17**(15): 2085-2095.
- Grigoriadis, N., V. van Pesch, et al. (2015). "A basic overview of multiple sclerosis immunopathology." Eur J Neurol **22 Suppl 2**: 3-13.

- Gudi, V., S. Gingele, et al. (2014). "Glial response during cuprizone-induced de- and remyelination in the CNS: lessons learned." Front Cell Neurosci **8**: 73.
- Guennoun, R., F. Labombarda, et al. (2015). "Progesterone and allopregnanolone in the central nervous system: response to injury and implication for neuroprotection." J Steroid Biochem Mol Biol **146**: 48-61.
- Guyre, P. M., M. T. Girard, et al. (1988). "Glucocorticoid effects on the production and actions of immune cytokines." J Steroid Biochem **30**(1-6): 89-93.
- Hafler, D. A., A. Compston, et al. (2007). "Risk alleles for multiple sclerosis identified by a genomewide study." N Engl J Med **357**(9): 851-862.
- Haines, J. D., M. Inglese, et al. (2011). "Axonal damage in multiple sclerosis." Mt Sinai J Med **78**(2): 231-243.
- Hamon, A., A. Morel, et al. (2003). "The modulatory effects of the anxiolytic etifoxine on GABA(A) receptors are mediated by the beta subunit." Neuropharmacology **45**(3): 293-303.
- Han, J., L. Sun, et al. (2016). "Role of regulatory b cells in neuroimmunologic disorders." J Neurosci Res **94**(8): 693-701.
- Harauz, G., N. Ishiyama, et al. (2004). "Myelin basic protein-diverse conformational states of an intrinsically unstructured protein and its roles in myelin assembly and multiple sclerosis." Micron **35**(7): 503-542.
- Harauz, G., V. Ladizhansky, et al. (2009). "Structural polymorphism and multifunctionality of myelin basic protein." Biochemistry **48**(34): 8094-8104.
- Harberts, E., D. Datta, et al. (2013). "Translocator protein 18 kDa (TSPO) expression in multiple sclerosis patients." J Neuroimmune Pharmacol **8**(1): 51-57.
- Harbo, H. F., R. Gold, et al. (2013). "Sex and gender issues in multiple sclerosis." Ther Adv Neurol Disord **6**(4): 237-248.
- Hart, S., I. Fonareva, et al. (2005). "Treatment for depression and its relationship to improvement in quality of life and psychological well-being in multiple sclerosis patients." Qual Life Res **14**(3): 695-703.
- Hatty, C. R., A. P. Le Brun, et al. (2014). "Investigating the interactions of the 18kDa translocator protein and its ligand PK11195 in planar lipid bilayers." Biochim Biophys Acta **1838**(3): 1019-1030.
- Herbert, A. L. and K. R. Monk (2017). "Advances in myelinating glial cell development." Curr Opin Neurobiol **42**: 53-60.
- Hoel, D. G., M. Berwick, et al. (2016). "The risks and benefits of sun exposure 2016." Dermatoendocrinol **8**(1): e1248325.
- Hofstetter, H. H., S. M. Ibrahim, et al. (2005). "Therapeutic efficacy of IL-17 neutralization in murine experimental autoimmune encephalomyelitis." Cell Immunol **237**(2): 123-130.
- Hofstetter, H. H., C. L. Shive, et al. (2002). "Pertussis toxin modulates the immune response to neuroantigens injected in incomplete Freund's adjuvant: induction of Th1 cells and experimental autoimmune encephalomyelitis in the presence of high frequencies of Th2 cells." J Immunol **169**(1): 117-125.
- Horishita, T., K. Minami, et al. (2002). "Alphaxalone, a neurosteroid anesthetic, inhibits norepinephrine transporter function in cultured bovine adrenal medullary cells." Anesth Analg **95**(6): 1661-1666, table of contents.
- Humble, S. R. (2016). "Neurosteroids are reduced in diabetic neuropathy and may be associated with the development of neuropathic pain." F1000Res **5**: 1923.
- Irvine, K. A. and W. F. Blakemore (2008). "Remyelination protects axons from demyelination-associated axon degeneration." Brain **131**(Pt 6): 1464-1477.

- Irwin, R. W., C. M. Solinsky, et al. (2014). "Frontiers in therapeutic development of allopregnanolone for Alzheimer's disease and other neurological disorders." Front Cell Neurosci **8**: 203.
- Irwin, R. W., C. M. Solinsky, et al. (2015). "Allopregnanolone preclinical acute pharmacokinetic and pharmacodynamic studies to predict tolerability and efficacy for Alzheimer's disease." PLoS One **10**(6): e0128313.
- Irwin, R. W., J. M. Wang, et al. (2011). "Neuroregenerative mechanisms of allopregnanolone in Alzheimer's disease." Front Endocrinol (Lausanne) **2**: 117.
- Ito, A., B. F. Bebo, Jr., et al. (2001). "Estrogen treatment down-regulates TNF-alpha production and reduces the severity of experimental autoimmune encephalomyelitis in cytokine knockout mice." J Immunol **167**(1): 542-552.
- Jahn, O., S. Tenzer, et al. (2009). "Myelin proteomics: molecular anatomy of an insulating sheath." Mol Neurobiol **40**(1): 55-72.
- Jaipuria, G., A. Leonov, et al. (2017). "Cholesterol-mediated allosteric regulation of the mitochondrial translocator protein structure." Nat Commun **8**: 14893.
- Jaremko, M., L. Jaremko, et al. (2015). "Structure of the mammalian TSPO/PBR protein." Biochem Soc Trans **43**(4): 566-571.
- JAX-Notes. (1987). "Alopecia in C57BL 6 and related mouse strains." No. 430, from <https://www.jax.org/news-and-insights/1987/october/alopecia-in-c57bl-6-and-related-mouse-strains>.
- Johnson, K. P., B. R. Brooks, et al. (1995). "Copolymer 1 reduces relapse rate and improves disability in relapsing-remitting multiple sclerosis: results of a phase III multicenter, double-blind placebo-controlled trial. The Copolymer 1 Multiple Sclerosis Study Group." Neurology **45**(7): 1268-1276.
- Jongen, P. J. (2017). "Health-Related Quality of Life in Patients with Multiple Sclerosis: Impact of Disease-Modifying Drugs." CNS Drugs **31**(7): 585-602.
- Jordan, C. A., V. L. Friedrich, Jr., et al. (1989). "Expression of viral and myelin gene transcripts in a murine CNS demyelinating disease caused by a coronavirus." Glia **2**(5): 318-329.
- Jorgensen, K. T., K. Rostgaard, et al. (2010). "Autoimmune diseases in women with Turner's syndrome." Arthritis Rheum **62**(3): 658-666.
- Kabat, H. (1947). "Studies of neuromuscular dysfunction; treatment of chronic multiple sclerosis with neostigmine and intensive muscle re-education." Perm Found Med Bull **5**(1): 1-14.
- Kaiser, H. (2003). "[Cortisone therapy today]." Wien Klin Wochenschr **115**(1-2): 6-21.
- Kansal, K., Z. Yang, et al. (2017). "Structural cerebellar correlates of cognitive and motor dysfunctions in cerebellar degeneration." Brain **140**(3): 707-720.
- Kappos, L., P. W. O'Connor, et al. (2013). "Clinical effects of natalizumab on multiple sclerosis appear early in treatment course." J Neurol **260**(5): 1388-1395.
- Kappos, L., E. W. Radue, et al. (2010). "A placebo-controlled trial of oral fingolimod in relapsing multiple sclerosis." N Engl J Med **362**(5): 387-401.
- Karch, J. and J. D. Molkenin (2014). "Identifying the components of the elusive mitochondrial permeability transition pore." Proc Natl Acad Sci U S A **111**(29): 10396-10397.
- Karlstetter, M., C. Nothdurfter, et al. (2014). "Translocator protein (18 kDa) (TSPO) is expressed in reactive retinal microglia and modulates microglial inflammation and phagocytosis." J Neuroinflammation **11**: 3.
- Karlstetter, M., R. Scholz, et al. (2015). "Retinal microglia: just bystander or target for therapy?" Prog Retin Eye Res **45**: 30-57.

- Kawano, T., T. Soga, et al. (2011). "The involvement of the neurosteroid allopregnanolone in the antihyperalgesic effect of paroxetine in a rat model of neuropathic pain." Neuroreport **22**(18): 984-988.
- Kebir, H., K. Kreymborg, et al. (2007). "Human TH17 lymphocytes promote blood-brain barrier disruption and central nervous system inflammation." Nat Med **13**(10): 1173-1175.
- Khalaj, A. J., J. Hasselmann, et al. (2016). "Nudging oligodendrocyte intrinsic signaling to remyelinate and repair: Estrogen receptor ligand effects." J Steroid Biochem Mol Biol **160**: 43-52.
- Kim, S., S. M. Liva, et al. (1999). "Estradiol ameliorates autoimmune demyelinating disease: implications for multiple sclerosis." Neurology **52**(6): 1230-1238.
- Kingwell, E., J. J. Marriott, et al. (2013). "Incidence and prevalence of multiple sclerosis in Europe: a systematic review." BMC Neurol **13**: 128.
- Kipp, M., S. Nyamoya, et al. (2017). "Multiple sclerosis animal models: a clinical and histopathological perspective." Brain Pathol **27**(2): 123-137.
- Kita, A., T. Kinoshita, et al. (2009). "Lack of tolerance to anxiolysis and withdrawal symptoms in mice repeatedly treated with AC-5216, a selective TSPO ligand." Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry **33**(6): 1040-1045.
- Kita, A., H. Kohayakawa, et al. (2004). "Antianxiety and antidepressant-like effects of AC-5216, a novel mitochondrial benzodiazepine receptor ligand." Br J Pharmacol **142**(7): 1059-1072.
- Klangkalya, B. and A. Chan (1988). "Structure-activity relationships of steroid hormones on muscarinic receptor binding." J Steroid Biochem **29**(1): 111-118.
- Klein, C., C. Patte-Mensah, et al. (2013). "The neuroprotector kynurenic acid increases neuronal cell survival through neprilysin induction." Neuropharmacology **70**: 254-260.
- Koenig, H. L., M. Schumacher, et al. (1995). "Progesterone synthesis and myelin formation by Schwann cells." Science **268**(5216): 1500-1503.
- Komegae, E. N., T. A. Souza, et al. (2017). "Multiple functional therapeutic effects of TnP: A small stable synthetic peptide derived from fish venom in a mouse model of multiple sclerosis." PLoS One **12**(2): e0171796.
- Korn, T., E. Bettelli, et al. (2009). "IL-17 and Th17 Cells." Annu Rev Immunol **27**: 485-517.
- Korn, T., J. Reddy, et al. (2007). "Myelin-specific regulatory T cells accumulate in the CNS but fail to control autoimmune inflammation." Nat Med **13**(4): 423-431.
- Kornek, B., M. K. Storch, et al. (2000). "Multiple sclerosis and chronic autoimmune encephalomyelitis: a comparative quantitative study of axonal injury in active, inactive, and remyelinated lesions." Am J Pathol **157**(1): 267-276.
- Korneyev, A., B. S. Pan, et al. (1993). "Stimulation of brain pregnenolone synthesis by mitochondrial diazepam binding inhibitor receptor ligands in vivo." J Neurochem **61**(4): 1515-1524.
- Kroenke, M. A. and B. M. Segal (2011). "IL-23 modulated myelin-specific T cells induce EAE via an IFN γ driven, IL-17 independent pathway." Brain Behav Immun **25**(5): 932-937.
- Kronenfeld, N., M. Berlin, et al. (2017). "Use of Psychotropic Medications in Breastfeeding Women." Birth Defects Res **109**(12): 957-997.
- Kuwabara, T., F. Ishikawa, et al. (2017). "The Role of IL-17 and Related Cytokines in Inflammatory Autoimmune Diseases." Mediators Inflamm **2017**: 3908061.
- Lagarde, J., M. Sarazin, et al. (2017). "In vivo PET imaging of neuroinflammation in Alzheimer's disease." J Neural Transm (Vienna).
- Lambert, J. J., D. Belelli, et al. (1995). "Neurosteroids and GABAA receptor function." Trends Pharmacol Sci **16**(9): 295-303.

- Lang, M. and R. A. Prayson (2016). "Tuberous sclerosis complex coexistent with hippocampal sclerosis." *J Clin Neurosci* **24**: 28-29.
- Langer-Gould, A., L. Qian, et al. (2014). "Vaccines and the risk of multiple sclerosis and other central nervous system demyelinating diseases." *JAMA Neurol* **71**(12): 1506-1513.
- Langrish, C. L., Y. Chen, et al. (2005). "IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation." *J Exp Med* **201**(2): 233-240.
- Lassmann, H., J. van Horssen, et al. (2012). "Progressive multiple sclerosis: pathology and pathogenesis." *Nat Rev Neurol* **8**(11): 647-656.
- Le Fur, G., M. L. Perrier, et al. (1983). "Peripheral benzodiazepine binding sites: effect of PK 11195, 1-(2-chlorophenyl)-N-methyl-N-(1-methylpropyl)-3-isoquinolinecarboxamide. I. In vitro studies." *Life Sci* **32**(16): 1839-1847.
- Le Fur, G., N. Vaucher, et al. (1983). "Differentiation between two ligands for peripheral benzodiazepine binding sites, [3H]RO5-4864 and [3H]PK 11195, by thermodynamic studies." *Life Sci* **33**(5): 449-457.
- Le Melleo, J. M. and G. B. Baker (2002). "Neuroactive steroids and anxiety disorders." *J Psychiatry Neurosci* **27**(3): 161-165.
- Lebrun, C., M. Bertagna, et al. (2011). "Cutaneous Side-effects of Immunomodulators in MS." *Int MS J* **17**(3): 88-94.
- Lee, J. Y., K. Taghian, et al. (2014). "Axonal degeneration in multiple sclerosis: can we predict and prevent permanent disability?" *Acta Neuropathol Commun* **2**: 97.
- Leitner, H. (2010). "Influence of neurosteroids on the pathogenesis of multiple sclerosis." *Med Hypotheses* **75**(2): 229-234.
- LeVine, S. M., D. Wong, et al. (1990). "Developmental expression of proteolipid protein and DM20 mRNAs and proteins in the rat brain." *Dev Neurosci* **12**(4-5): 235-250.
- Li, F., J. Liu, et al. (2015). "Evolving understanding of translocator protein 18 kDa (TSPO)." *Pharmacol Res* **99**: 404-409.
- Li, F., J. Liu, et al. (2016). "Translocator Protein 18 kDa (TSPO): An Old Protein with New Functions?" *Biochemistry* **55**(20): 2821-2831.
- Li, H., Z. Yao, et al. (2001). "Cholesterol binding at the cholesterol recognition/ interaction amino acid consensus (CRAC) of the peripheral-type benzodiazepine receptor and inhibition of steroidogenesis by an HIV TAT-CRAC peptide." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(3): 1267-1272.
- Lincoln, M. R., A. Montpetit, et al. (2005). "A predominant role for the HLA class II region in the association of the MHC region with multiple sclerosis." *Nat Genet* **37**(10): 1108-1112.
- Lingor, P., J. C. Koch, et al. (2012). "Axonal degeneration as a therapeutic target in the CNS." *Cell Tissue Res* **349**(1): 289-311.
- Linnington, C., M. Bradl, et al. (1988). "Augmentation of demyelination in rat acute allergic encephalomyelitis by circulating mouse monoclonal antibodies directed against a myelin/oligodendrocyte glycoprotein." *Am J Pathol* **130**(3): 443-454.
- Liu, G. J., R. J. Middleton, et al. (2014). "The 18 kDa translocator protein, microglia and neuroinflammation." *Brain Pathol* **24**(6): 631-653.
- Liu, Y., B. Zhu, et al. (2003). "Bilirubin as a potent antioxidant suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis: implications for the role of oxidative stress in the development of multiple sclerosis." *J Neuroimmunol* **139**(1-2): 27-35.
- Liu, Z., X. Hu, et al. (2007). "Induction of oligodendrocyte differentiation by Olig2 and Sox10: evidence for reciprocal interactions and dosage-dependent mechanisms." *Dev Biol* **302**(2): 683-693.

- Loggia, M. L., D. B. Chonde, et al. (2015). "Evidence for brain glial activation in chronic pain patients." *Brain* **138**(Pt 3): 604-615.
- Longone, P., F. di Michele, et al. (2011). "Neurosteroids as neuromodulators in the treatment of anxiety disorders." *Front Endocrinol (Lausanne)* **2**: 55.
- Lopez De Padilla, C. M., C. S. Crowson, et al. (2015). "Interferon-regulated chemokine score associated with improvement in disease activity in refractory myositis patients treated with rituximab." *Clin Exp Rheumatol* **33**(5): 655-663.
- Louapre, C., E. Maillart, et al. (2013). "[New and emerging treatments for multiple sclerosis]." *Med Sci (Paris)* **29**(12): 1105-1110.
- Lubetzki, C. and B. Stankoff (2014). "Demyelination in multiple sclerosis." *Handb Clin Neurol* **122**: 89-99.
- Lubina-Dabrowska, N., A. Stepien, et al. (2017). "Effects of IFN-beta1a and IFN-beta1b treatment on the expression of cytokines, inducible NOS (NOS type II), and myelin proteins in animal model of multiple sclerosis." *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* **65**(4): 325-338.
- Lublin, F. D. and S. C. Reingold (1996). "Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey. National Multiple Sclerosis Society (USA) Advisory Committee on Clinical Trials of New Agents in Multiple Sclerosis." *Neurology* **46**(4): 907-911.
- Lucchinetti, C., W. Bruck, et al. (2000). "Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination." *Ann Neurol* **47**(6): 707-717.
- Luchetti, S., K. Bossers, et al. (2011). "Neurosteroid biosynthetic pathways changes in prefrontal cortex in Alzheimer's disease." *Neurobiol Aging* **32**(11): 1964-1976.
- Luchetti, S., I. Huitinga, et al. (2011). "Neurosteroid and GABA-A receptor alterations in Alzheimer's disease, Parkinson's disease and multiple sclerosis." *Neuroscience* **191**: 6-21.
- Luchtman, D. W., E. Ellwardt, et al. (2014). "IL-17 and related cytokines involved in the pathology and immunotherapy of multiple sclerosis: Current and future developments." *Cytokine Growth Factor Rev* **25**(4): 403-413.
- Mackenzie, S. D., S. Blois, et al. (2012). "Oral thermal injury associated with puncture of a salbutamol metered-dose inhaler in a dog." *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)* **22**(4): 494-497.
- Mahad, D. H., B. D. Trapp, et al. (2015). "Pathological mechanisms in progressive multiple sclerosis." *Lancet Neurol* **14**(2): 183-193.
- Mailand, M. T. and J. L. Frederiksen (2017). "Vaccines and multiple sclerosis: a systematic review." *J Neurol* **264**(6): 1035-1050.
- Majewska, M. D. (1992). "Neurosteroids: endogenous bimodal modulators of the GABAA receptor. Mechanism of action and physiological significance." *Prog Neurobiol* **38**(4): 379-395.
- Makhani, N., S. A. Morrow, et al. (2014). "MS incidence and prevalence in Africa, Asia, Australia and New Zealand: A systematic review." *Mult Scler Relat Disord* **3**(1): 48-60.
- Maksay, G., B. Laube, et al. (2001). "Subunit-specific modulation of glycine receptors by neurosteroids." *Neuropharmacology* **41**(3): 369-376.
- Mandia, D., O. E. Ferraro, et al. (2014). "Environmental factors and multiple sclerosis severity: a descriptive study." *Int J Environ Res Public Health* **11**(6): 6417-6432.
- Marinelli, C., T. Bertalot, et al. (2016). "Systematic Review of Pharmacological Properties of the Oligodendrocyte Lineage." *Front Cell Neurosci* **10**: 27.

- Martinez-Caceres, E. M., M. A. Barrau, et al. (2002). "Treatment with methylprednisolone in relapses of multiple sclerosis patients: immunological evidence of immediate and short-term but not long-lasting effects." *Clin Exp Immunol* **127**(1): 165-171.
- Martins, T. B., J. W. Rose, et al. (2011). "Analysis of proinflammatory and anti-inflammatory cytokine serum concentrations in patients with multiple sclerosis by using a multiplexed immunoassay." *Am J Clin Pathol* **136**(5): 696-704.
- Marx, C. E., D. W. Bradford, et al. (2011). "Pregnenolone as a novel therapeutic candidate in schizophrenia: emerging preclinical and clinical evidence." *Neuroscience* **191**: 78-90.
- Marx, C. E., R. S. Keefe, et al. (2009). "Proof-of-concept trial with the neurosteroid pregnenolone targeting cognitive and negative symptoms in schizophrenia." *Neuropsychopharmacology* **34**(8): 1885-1903.
- Marziniak, M. and S. Meuth (2014). "Current perspectives on interferon Beta-1b for the treatment of multiple sclerosis." *Adv Ther* **31**(9): 915-931.
- Matejuk, A., K. Adlard, et al. (2001). "17 beta-estradiol inhibits cytokine, chemokine, and chemokine receptor mRNA expression in the central nervous system of female mice with experimental autoimmune encephalomyelitis." *J Neurosci Res* **65**(6): 529-542.
- Matejuk, A., A. C. Bakke, et al. (2004). "Estrogen treatment induces a novel population of regulatory cells, which suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis." *J Neurosci Res* **77**(1): 119-126.
- Maurice, T., V. L. Phan, et al. (1999). "Neuroactive neurosteroids as endogenous effectors for the sigma1 (sigma1) receptor: pharmacological evidence and therapeutic opportunities." *Jpn J Pharmacol* **81**(2): 125-155.
- Mayo, W., M. Le Moal, et al. (2001). "Pregnenolone sulfate and aging of cognitive functions: behavioral, neurochemical, and morphological investigations." *Horm Behav* **40**(2): 215-217.
- McCarthy, D. P., M. H. Richards, et al. (2012). "Mouse models of multiple sclerosis: experimental autoimmune encephalomyelitis and Theiler's virus-induced demyelinating disease." *Methods Mol Biol* **900**: 381-401.
- McCoy, M. K. and M. G. Tansey (2008). "TNF signaling inhibition in the CNS: implications for normal brain function and neurodegenerative disease." *J Neuroinflammation* **5**: 45.
- McDonald, W. I., A. Compston, et al. (2001). "Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis." *Ann Neurol* **50**(1): 121-127.
- McFarland, H. F. (1999). "Correlation between MR and clinical findings of disease activity in multiple sclerosis." *AJNR Am J Neuroradiol* **20**(10): 1777-1778.
- Meamar, R., S. Nematollahi, et al. (2016). "The role of stem cell therapy in multiple sclerosis: An overview of the current status of the clinical studies." *Adv Biomed Res* **5**: 46.
- Mecha, M., F. J. Carrillo-Salinas, et al. (2013). "Viral models of multiple sclerosis: neurodegeneration and demyelination in mice infected with Theiler's virus." *Prog Neurobiol* **101-102**: 46-64.
- Mehndiratta, M. M. and N. S. Gulati (2014). "Central and peripheral demyelination." *J Neurosci Rural Pract* **5**(1): 84-86.
- Meinl, E. and R. Hohlfeld (2002). "Immunopathogenesis of multiple sclerosis: MBP and beyond." *Clin Exp Immunol* **128**(3): 395-397.
- Melcangi, R. C., D. Caruso, et al. (2012). "Modifications of neuroactive steroid levels in an experimental model of nigrostriatal degeneration: potential relevance to the pathophysiology of Parkinson's disease." *J Mol Neurosci* **46**(1): 177-183.
- Melcangi, R. C. and G. C. Panzica (2014). "Allopregnanolone: state of the art." *Prog Neurobiol* **113**: 1-5.

- Mellon, S. H. (2007). "Neurosteroid regulation of central nervous system development." Pharmacol Ther **116**(1): 107-124.
- Mellon, S. H. and L. D. Griffin (2002). "Neurosteroids: biochemistry and clinical significance." Trends Endocrinol Metab **13**(1): 35-43.
- Mendel, I., N. Kerlero de Rosbo, et al. (1995). "A myelin oligodendrocyte glycoprotein peptide induces typical chronic experimental autoimmune encephalomyelitis in H-2b mice: fine specificity and T cell receptor V beta expression of encephalitogenic T cells." Eur J Immunol **25**(7): 1951-1959.
- Mendu, S. K., A. Bhandage, et al. (2012). "Different subtypes of GABA-A receptors are expressed in human, mouse and rat T lymphocytes." PLoS One **7**(8): e42959.
- Mensah-Nyagan, A. G., D. Beaujean, et al. (2001). "Anatomical and biochemical evidence for the synthesis of unconjugated and sulfated neurosteroids in amphibians." Brain Res Brain Res Rev **37**(1-3): 13-24.
- Mensah-Nyagan, A. G., J. L. Do-Rego, et al. (1999). "Neurosteroids: expression of steroidogenic enzymes and regulation of steroid biosynthesis in the central nervous system." Pharmacol Rev **51**(1): 63-81.
- Mensah-Nyagan, A. G., J. L. Do-Rego, et al. (2001). "Regulation of neurosteroid biosynthesis in the frog diencephalon by GABA and endozepines." Horm Behav **40**(2): 218-225.
- Mensah-Nyagan, A. G., L. Meyer, et al. (2009). "Evidence for a key role of steroids in the modulation of pain." Psychoneuroendocrinology **34 Suppl 1**: S169-177.
- Meyer, L., C. Patte-Mensah, et al. (2010). "Cellular and functional evidence for a protective action of neurosteroids against vincristine chemotherapy-induced painful neuropathy." Cell Mol Life Sci **67**(17): 3017-3034.
- Meyer, L., C. Patte-Mensah, et al. (2011). "Allopregnanolone prevents and suppresses oxaliplatin-evoked painful neuropathy: multi-parametric assessment and direct evidence." Pain **152**(1): 170-181.
- Meyer, L., C. Patte-Mensah, et al. (2013). "Neurosteroid 3alpha-androstanediol efficiently counteracts paclitaxel-induced peripheral neuropathy and painful symptoms." PLoS One **8**(11): e80915.
- Michalski, D., S. Liebig, et al. (2011). "Pain in patients with multiple sclerosis: a complex assessment including quantitative and qualitative measurements provides for a disease-related biopsychosocial pain model." J Pain Res **4**: 219-225.
- Midi_Pyrénées_Sclérose_En_Plaques.
- Mikova, O., R. Yakimova, et al. (2001). "Increased serum tumor necrosis factor alpha concentrations in major depression and multiple sclerosis." Eur Neuropsychopharmacol **11**(3): 203-208.
- Miller, A., M. Korem, et al. (2005). "Vitamin B12, demyelination, remyelination and repair in multiple sclerosis." J Neurol Sci **233**(1-2): 93-97.
- Miller, S. D., W. J. Karpus, et al. (2010). "Experimental autoimmune encephalomyelitis in the mouse." Curr Protoc Immunol **Chapter 15**: Unit 15 11.
- Miller, W. L. and R. J. Auchus (2011). "The molecular biology, biochemistry, and physiology of human steroidogenesis and its disorders." Endocr Rev **32**(1): 81-151.
- Milo, R. and E. Kahana (2010). "Multiple sclerosis: geoeidemiology, genetics and the environment." Autoimmun Rev **9**(5): A387-394.
- Miron, V. E. (2017). "Microglia-driven regulation of oligodendrocyte lineage cells, myelination, and remyelination." J Leukoc Biol **101**(5): 1103-1108.
- Monnet, F. P., V. Mahe, et al. (1995). "Neurosteroids, via sigma receptors, modulate the [3H]norepinephrine release evoked by N-methyl-D-aspartate in the rat hippocampus." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(9): 3774-3778.

- Moore, S., A. J. Khalaj, et al. (2014). "Restoration of axon conduction and motor deficits by therapeutic treatment with glatiramer acetate." *J Neurosci Res* **92**(12): 1621-1636.
- Morando, S., T. Vigo, et al. (2012). "The therapeutic effect of mesenchymal stem cell transplantation in experimental autoimmune encephalomyelitis is mediated by peripheral and central mechanisms." *Stem Cell Res Ther* **3**(1): 3.
- Morell, P. and R. H. Quarles (1999). Characteristic Composition of Myelin. *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects*. 6th edition. A. S. f. Neurochemistry, Lippincott Williams & Wilkins.
- Morin, D., J. Musman, et al. (2016). "Mitochondrial translocator protein (TSPO): From physiology to cardioprotection." *Biochem Pharmacol* **105**: 1-13.
- Mullin, A. P., C. Cui, et al. (2017). "rHlgM22 enhances remyelination in the brain of the cuprizone mouse model of demyelination." *Neurobiol Dis* **105**: 142-155.
- Muls, N., K. Jnaoui, et al. (2012). "Upregulation of IL-17, but not of IL-9, in circulating cells of CIS and relapsing MS patients. Impact of corticosteroid therapy on the cytokine network." *J Neuroimmunol* **243**(1-2): 73-80.
- Munzel, E. J. and A. Williams (2013). "Promoting remyelination in multiple sclerosis-recent advances." *Drugs* **73**(18): 2017-2029.
- Naylor, J. C., J. D. Kilts, et al. (2010). "Allopregnanolone levels are reduced in temporal cortex in patients with Alzheimer's disease compared to cognitively intact control subjects." *Biochim Biophys Acta* **1801**(8): 951-959.
- Nelson, A. D. and P. M. Jenkins (2017). "Axonal Membranes and Their Domains: Assembly and Function of the Axon Initial Segment and Node of Ranvier." *Front Cell Neurosci* **11**: 136.
- Nezhadi, A., V. Sheibani, et al. (2016). "Neurosteroid allopregnanolone attenuates cognitive dysfunctions in 6-OHDA-induced rat model of Parkinson's disease." *Behav Brain Res* **305**: 258-264.
- Nguyen, N., E. Fakra, et al. (2006). "Efficacy of etifoxine compared to lorazepam monotherapy in the treatment of patients with adjustment disorders with anxiety: a double-blind controlled study in general practice." *Hum Psychopharmacol* **21**(3): 139-149.
- Noorbakhsh, F., G. B. Baker, et al. (2014). "Allopregnanolone and neuroinflammation: a focus on multiple sclerosis." *Front Cell Neurosci* **8**: 134.
- Noorbakhsh, F., K. K. Ellestad, et al. (2011). "Impaired neurosteroid synthesis in multiple sclerosis." *Brain* **134**(Pt 9): 2703-2721.
- Nothdurfter, C., T. C. Baghai, et al. (2012). "Translocator protein (18 kDa) (TSPO) as a therapeutic target for anxiety and neurologic disorders." *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* **262 Suppl 2**: S107-112.
- Nothdurfter, C., S. Tanasic, et al. (2011). "Modulation of ligand-gated ion channels as a novel pharmacological principle." *Pharmacopsychiatry* **44 Suppl 1**: S27-34.
- O'Connell, K., N. Tubridy, et al. (2017). "Incidence of multiple sclerosis in the Republic of Ireland: A prospective population-based study." *Mult Scler Relat Disord* **13**: 75-80.
- Oleszak, E. L., J. R. Chang, et al. (2004). "Theiler's virus infection: a model for multiple sclerosis." *Clin Microbiol Rev* **17**(1): 174-207.
- Orefice, N., A. Carotenuto, et al. (2016). "Assessment of neuroactive steroids in cerebrospinal fluid comparing acute relapse and stable disease in relapsing-remitting multiple sclerosis." *J Steroid Biochem Mol Biol* **159**: 1-7.
- Orton, S. M., B. M. Herrera, et al. (2006). "Sex ratio of multiple sclerosis in Canada: a longitudinal study." *Lancet Neurol* **5**(11): 932-936.
- Orton, S. M., L. Wald, et al. (2011). "Association of UV radiation with multiple sclerosis prevalence and sex ratio in France." *Neurology* **76**(5): 425-431.

- Osorio, M. J., D. H. Rowitch, et al. (2017). "Concise Review: Stem Cell-Based Treatment of Pelizaeus-Merzbacher Disease." *Stem Cells* **35**(2): 311-315.
- Osuji, I. J., E. Vera-Bolanos, et al. (2010). "Pregnenolone for cognition and mood in dual diagnosis patients." *Psychiatry Res* **178**(2): 309-312.
- Ouchi, Y., E. Yoshikawa, et al. (2005). "Microglial activation and dopamine terminal loss in early Parkinson's disease." *Ann Neurol* **57**(2): 168-175.
- Owen, D. R., Q. Guo, et al. (2014). "Determination of [(11)C]PBR28 binding potential in vivo: a first human TSPO blocking study." *J Cereb Blood Flow Metab* **34**(6): 989-994.
- Owen, D. R., A. J. Lewis, et al. (2011). "Variation in binding affinity of the novel anxiolytic XBD173 for the 18 kDa translocator protein in human brain." *Synapse* **65**(3): 257-259.
- Palaszynski, K. M., H. Liu, et al. (2004). "Estriol treatment ameliorates disease in males with experimental autoimmune encephalomyelitis: implications for multiple sclerosis." *J Neuroimmunol* **149**(1-2): 84-89.
- Papadopoulos, D., S. Grondal, et al. (1992). "Levels of cytochrome P-450, steroidogenesis and microsomal and cytosolic epoxide hydrolases in normal human adrenal tissue and corresponding tumors." *Cancer Biochem Biophys* **12**(4): 283-291.
- Papadopoulos, V., Y. Aghazadeh, et al. (2015). "Translocator protein-mediated pharmacology of cholesterol transport and steroidogenesis." *Mol Cell Endocrinol* **408**: 90-98.
- Papadopoulos, V. and A. S. Brown (1995). "Role of the peripheral-type benzodiazepine receptor and the polypeptide diazepam binding inhibitor in steroidogenesis." *J Steroid Biochem Mol Biol* **53**(1-6): 103-110.
- Papadopoulos, V., J. Fan, et al. (2017). "Translocator protein (18 kDa): an update on its function in steroidogenesis." *J Neuroendocrinol*.
- Papadopoulos, V. and L. Lecanu (2009). "Translocator protein (18 kDa) TSPO: an emerging therapeutic target in neurotrauma." *Exp Neurol* **219**(1): 53-57.
- Papadopoulos, V., L. Lecanu, et al. (2006). "Peripheral-type benzodiazepine receptor in neurosteroid biosynthesis, neuropathology and neurological disorders." *Neuroscience* **138**(3): 749-756.
- Parekh, P. I., A. E. Petro, et al. (1998). "Reversal of diet-induced obesity and diabetes in C57BL/6J mice." *Metabolism* **47**(9): 1089-1096.
- Parnell, G. P. and D. R. Booth (2017). "The Multiple Sclerosis (MS) Genetic Risk Factors Indicate both Acquired and Innate Immune Cell Subsets Contribute to MS Pathogenesis and Identify Novel Therapeutic Opportunities." *Front Immunol* **8**: 425.
- Paterson, P. Y. (1976). Experimental autoimmune encephalomyelitis: induction, pathogenesis and suppression. *textbook in immunopathology, P.A.M. à H.S.M. Eberhard*. New York, Grune and Stratton: 179-213.
- Pathak, S. and H. E. Webb (1983). "Effect of myocrisin (sodium auro-thio-malate) on the morphogenesis of avirulent Semliki Forest virus in mouse brain: an electron microscopical study." *Neuropathol Appl Neurobiol* **9**(4): 313-327.
- Patte-Mensah, C., C. Kibaly, et al. (2006). "Neurogenic pain and steroid synthesis in the spinal cord." *J Mol Neurosci* **28**(1): 17-31.
- Patte-Mensah, C., L. Meyer, et al. (2010). "Selective regulation of 3 alpha-hydroxysteroid oxido-reductase expression in dorsal root ganglion neurons: a possible mechanism to cope with peripheral nerve injury-induced chronic pain." *Pain* **150**(3): 522-534.
- Patte-Mensah, C., L. Meyer, et al. (2014). "Potential role of allopregnanolone for a safe and effective therapy of neuropathic pain." *Prog Neurobiol* **113**: 70-78.
- Pawlikowski, M. (1993). Immunomodulating effects of peripherally acting benzodiazepines. *Peripheral benzodiazepine receptors*. E. Giesen-Crouse. London, Academic Press: 125-136.

- Pawlikowski, M. (1993). Immunomodulating effects of peripherally acting benzodiazepines. . E. Giesen-Crouse. London, Academic Press: 125–135.
- Pearson, J. F., S. Alla, et al. (2016). "Multiple Sclerosis impact on employment and income in New Zealand." Acta Neurol Scand.
- Peschl, P., M. Bradl, et al. (2017). "Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein: Deciphering a Target in Inflammatory Demyelinating Diseases." Front Immunol **8**: 529.
- Péter, Á. (2012). The Cuprizone-Induced Experimental Demyelination – A Promising Animal Model for Multiple Sclerosis Type III-IV. Medical School, Department of Neurology Pécs, Hungary, University of Pécs, Hungary. Ph.D.
- Podbielska, M., N. L. Banik, et al. (2013). "Myelin recovery in multiple sclerosis: the challenge of remyelination." Brain Sci **3**(3): 1282-1324.
- Poirier, J. (ARSEP). "Le système nerveux, central et périphérique : formation, fonction et rôle."
- Poisbeau, P., A. F. Keller, et al. (2014). "Analgesic strategies aimed at stimulating the endogenous production of allopregnanolone." Front Cell Neurosci **8**: 174.
- Polman, C. H., P. W. O'Connor, et al. (2006). "A randomized, placebo-controlled trial of natalizumab for relapsing multiple sclerosis." N Engl J Med **354**(9): 899-910.
- Poyraz, T., E. Idiman, et al. (2013). "The cooling effect on proinflammatory cytokines interferon-gamma, tumor necrosis factor-alpha, and nitric oxide in patients with multiple sclerosis." ISRN Neurol **2013**: 964572.
- Praet, J., C. Guglielmetti, et al. (2014). "Cellular and molecular neuropathology of the cuprizone mouse model: clinical relevance for multiple sclerosis." Neurosci Biobehav Rev **47**: 485-505.
- Prasad, M., J. Kaur, et al. (2015). "Mitochondria-associated endoplasmic reticulum membrane (MAM) regulates steroidogenic activity via steroidogenic acute regulatory protein (StAR)-voltage-dependent anion channel 2 (VDAC2) interaction." J Biol Chem **290**(5): 2604-2616.
- Prisms_Study_Group, the University of British Columbia, et al. (2001). "PRISMS-4: Long-term efficacy of interferon-beta-1a in relapsing MS." Neurology **56**(12): 1628-1636.
- Proietti Onori, M., C. Ceci, et al. (2014). "A behavioural test battery to investigate tic-like symptoms, stereotypies, attentional capabilities, and spontaneous locomotion in different mouse strains." Behav Brain Res **267**: 95-105.
- Purohit, B., E. Ganewatte, et al. (2015). "Balo's Concentric Sclerosis with Acute Presentation and Co-Existing Multiple Sclerosis-Typical Lesions on MRI." Case Rep Neurol **7**(1): 44-50.
- Qi, X., J. Xu, et al. (2012). "Translocator protein (18 kDa): a promising therapeutic target and diagnostic tool for cardiovascular diseases." Oxid Med Cell Longev **2012**: 162934.
- Quiros, P. M., A. Mottis, et al. (2016). "Mitonuclear communication in homeostasis and stress." Nat Rev Mol Cell Biol **17**(4): 213-226.
- Rahmlow, M. R. and O. Kantarci (2013). "Fulminant demyelinating diseases." Neurohospitalist **3**(2): 81-91.
- Rajapaksha, M., J. Kaur, et al. (2013). "Cholesterol-mediated conformational changes in the steroidogenic acute regulatory protein are essential for steroidogenesis." Biochemistry **52**(41): 7242-7253.
- Ramagopalan, S. V. and G. C. Ebers (2009). "Multiple sclerosis: major histocompatibility complexity and antigen presentation." Genome Med **1**(11): 105.
- Ramagopalan, S. V., J. C. Knight, et al. (2009). "Multiple sclerosis and the major histocompatibility complex." Curr Opin Neurol **22**(3): 219-225.
- Ransohoff, R. M. (2012). "Animal models of multiple sclerosis: the good, the bad and the bottom line." Nat Neurosci **15**(8): 1074-1077.

- Ravikumar, B., D. Crawford, et al. (2016). "Differential efficacy of the TSPO ligands etifoxine and XBD-173 in two rodent models of Multiple Sclerosis." *Neuropharmacology* **108**: 229-237.
- Rayavarapu, S., J. H. Van der Meulen, et al. (2010). "Characterization of dysferlin deficient SJL/J mice to assess preclinical drug efficacy: fasudil exacerbates muscle disease phenotype." *PLoS One* **5**(9): e12981.
- Reddy, D. S. (2010). "Neurosteroids: endogenous role in the human brain and therapeutic potentials." *Prog Brain Res* **186**: 113-137.
- Reyes-Garcia, M. G., F. Hernandez-Hernandez, et al. (2007). "GABA (A) receptor subunits RNA expression in mice peritoneal macrophages modulate their IL-6/IL-12 production." *J Neuroimmunol* **188**(1-2): 64-68.
- Riccio, P. and R. Rossano (2015). "Nutrition facts in multiple sclerosis." *ASN Neuro* **7**(1).
- Rieckmann, P., A. Boyko, et al. (2015). "Achieving patient engagement in multiple sclerosis: A perspective from the multiple sclerosis in the 21st Century Steering Group." *Mult Scler Relat Disord* **4**(3): 202-218.
- Ritsner, M. S. (2010). "Pregnenolone, dehydroepiandrosterone, and schizophrenia: alterations and clinical trials." *CNS Neurosci Ther* **16**(1): 32-44.
- Rivera, V. M., M. T. Medina, et al. (2014). "Multiple sclerosis care in Latin America." *Neurology* **82**(18): 1660-1661.
- Robinson, A. P., C. T. Harp, et al. (2014). "The experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) model of MS: utility for understanding disease pathophysiology and treatment." *Handb Clin Neurol* **122**: 173-189.
- Rocca, P., G. Bellone, et al. (1993). "Peripheral-type benzodiazepine receptors and diazepam binding inhibitor-like immunoreactivity distribution in human peripheral blood mononuclear cells." *Immunopharmacology* **25**(2): 163-178.
- Rojas-Gutierrez, E., G. Munoz-Arenas, et al. (2017). "Alzheimer's disease and metabolic syndrome: A link from oxidative stress and inflammation to neurodegeneration." *Synapse*.
- Rovaris, M. and M. Filippi (2003). "Interventions for the prevention of brain atrophy in multiple sclerosis : current status." *CNS Drugs* **17**(8): 563-575.
- Rupprecht, R. and F. Holsboer (1999). "Neuroactive steroids: mechanisms of action and neuropsychopharmacological perspectives." *Trends Neurosci* **22**(9): 410-416.
- Rupprecht, R., V. Papadopoulos, et al. (2010). "Translocator protein (18 kDa) (TSPO) as a therapeutic target for neurological and psychiatric disorders." *Nat Rev Drug Discov* **9**(12): 971-988.
- Rupprecht, R., G. Rammes, et al. (2009). "Translocator protein (18 kD) as target for anxiolytics without benzodiazepine-like side effects." *Science* **325**(5939): 490-493.
- Scarf, A. M., C. Luus, et al. (2012). "Evidence for complex binding profiles and species differences at the translocator protein (TSPO) (18 kDa)." *Curr Mol Med* **12**(4): 488-493.
- Schaefer, C., T. R. Hidalgo, et al. (2006). "Gene-based delivery of IFN-beta is efficacious in a murine model of experimental allergic encephalomyelitis." *J Interferon Cytokine Res* **26**(7): 449-454.
- Schaeffer, V., L. Meyer, et al. (2008). "Dose-dependent and sequence-sensitive effects of amyloid-beta peptide on neurosteroidogenesis in human neuroblastoma cells." *Neurochem Int* **52**(6): 948-955.
- Schaeffer, V., L. Meyer, et al. (2010). "Progress in dorsal root ganglion neurosteroidogenic activity: basic evidence and pathophysiological correlation." *Prog Neurobiol* **92**(1): 33-41.

- Schaeffer, V., C. Patte-Mensah, et al. (2008). "Selective regulation of neurosteroid biosynthesis in human neuroblastoma cells under hydrogen peroxide-induced oxidative stress condition." *Neuroscience* **151**(3): 758-770.
- Scheikl, T., B. Pignolet, et al. (2010). "Transgenic mouse models of multiple sclerosis." *Cell Mol Life Sci* **67**(23): 4011-4034.
- Schlichter, R., V. Rybalchenko, et al. (2000). "Modulation of GABAergic synaptic transmission by the non-benzodiazepine anxiolytic etifoxine." *Neuropharmacology* **39**(9): 1523-1535.
- Schmidt, K. L., D. S. Pradhan, et al. (2008). "Neurosteroids, immunosteroids, and the Balkanization of endocrinology." *Gen Comp Endocrinol* **157**(3): 266-274.
- Scholz, R., A. Caramoy, et al. (2015). "Targeting translocator protein (18 kDa) (TSPO) dampens pro-inflammatory microglia reactivity in the retina and protects from degeneration." *J Neuroinflammation* **12**: 201.
- Schorlemmer, H. U. and F. R. Seiler (1991). "15-Deoxyspergualin (15-DOS) for therapy in an animal model of multiple sclerosis (MS): disease modifying activity on acute and chronic relapsing experimental allergic encephalomyelitis (EAE)." *Agents Actions* **34**(1-2): 156-160.
- Schroeter, M., G. Stoll, et al. (2003). "CD8+ phagocyte recruitment in rat experimental autoimmune encephalomyelitis: association with inflammatory tissue destruction." *Am J Pathol* **163**(4): 1517-1524.
- Schule, C., C. Nothdurfter, et al. (2014). "The role of allopregnanolone in depression and anxiety." *Prog Neurobiol* **113**: 79-87.
- Schule, C., E. Romeo, et al. (2006). "Influence of mirtazapine on plasma concentrations of neuroactive steroids in major depression and on 3alpha-hydroxysteroid dehydrogenase activity." *Mol Psychiatry* **11**(3): 261-272.
- Schumacher, M., Y. Akwa, et al. (2000). "Steroid synthesis and metabolism in the nervous system: trophic and protective effects." *J Neurocytol* **29**(5-6): 307-326.
- Schumacher, M., C. Mattern, et al. (2014). "Revisiting the roles of progesterone and allopregnanolone in the nervous system: resurgence of the progesterone receptors." *Prog Neurobiol* **113**: 6-39.
- Schumacher, M., P. Robel, et al. (1996). "Development and regeneration of the nervous system: a role for neurosteroids." *Dev Neurosci* **18**(1-2): 6-21.
- Selmi, C. (2008). "The X in sex: how autoimmune diseases revolve around sex chromosomes." *Best Pract Res Clin Rheumatol* **22**(5): 913-922.
- Selvaraj, V., D. M. Stocco, et al. (2015). "Minireview: translocator protein (TSPO) and steroidogenesis: a reappraisal." *Mol Endocrinol* **29**(4): 490-501.
- Seminog, O. O., A. B. Seminog, et al. (2015). "Associations between Klinefelter's syndrome and autoimmune diseases: English national record linkage studies." *Autoimmunity* **48**(2): 125-128.
- Setiawan, E., A. A. Wilson, et al. (2015). "Role of translocator protein density, a marker of neuroinflammation, in the brain during major depressive episodes." *JAMA Psychiatry* **72**(3): 268-275.
- Shirani, A. and H. Tremlett (2010). "The effect of smoking on the symptoms and progression of multiple sclerosis: a review." *J Inflamm Res* **3**: 115-126.
- Siddiqui, S. V., U. Chatterjee, et al. (2008). "Neuropsychology of prefrontal cortex." *Indian J Psychiatry* **50**(3): 202-208.
- Sikora, M. J. (2016). "Family Matters: Collaboration and Conflict Among the Steroid Receptors Raises a Need for Group Therapy." *Endocrinology* **157**(12): 4553-4560.

- Simon-O'Brien, E., D. Gauthier, et al. (2016). "Etifoxine improves sensorimotor deficits and reduces glial activation, neuronal degeneration, and neuroinflammation in a rat model of traumatic brain injury." J Neuroinflammation **13**(1): 203.
- Simons, M., T. Misgeld, et al. (2014). "A unified cell biological perspective on axon-myelin injury." J Cell Biol **206**(3): 335-345.
- Singh, C., L. Liu, et al. (2012). "Allopregnanolone restores hippocampal-dependent learning and memory and neural progenitor survival in aging 3xTgAD and nonTg mice." Neurobiol Aging **33**(8): 1493-1506.
- Skolnick, P., S. M. Paul, et al. (1979). "Brain benzodiazepine levels following intravenous administration of [34]diazepam: relationship to the potentiation of purinergic depression of central nervous system neurons." Can J Physiol Pharmacol **57**(9): 1040-1042.
- Skripuletz, T., V. Gudi, et al. (2011). "De- and remyelination in the CNS white and grey matter induced by cuprizone: the old, the new, and the unexpected." Histol Histopathol **26**(12): 1585-1597.
- Slavin, A. J., T. G. Johns, et al. (1997). "Regulation of myelin oligodendrocyte glycoprotein in different species throughout development." Dev Neurosci **19**(1): 69-78.
- Smith-Bouvier, D. L., A. A. Divekar, et al. (2008). "A role for sex chromosome complement in the female bias in autoimmune disease." J Exp Med **205**(5): 1099-1108.
- Soellner, I. A., J. Rabe, et al. (2013). "Differential aspects of immune cell infiltration and neurodegeneration in acute and relapse experimental autoimmune encephalomyelitis." Clin Immunol **149**(3): 519-529.
- Sospedra, M. and R. Martin (2005). "Immunology of multiple sclerosis." Annu Rev Immunol **23**: 683-747.
- Soustiel, J. F., M. Zaaroor, et al. (2008). "Neuroprotective effect of Ro5-4864 following brain injury." Exp Neurol **214**(2): 201-208.
- Spindler, K. R., L. Fang, et al. (2001). "SJL/J mice are highly susceptible to infection by mouse adenovirus type 1." J Virol **75**(24): 12039-12046.
- Sporkel, O., T. Uschkureit, et al. (2002). "Oligodendrocytes expressing exclusively the DM20 isoform of the proteolipid protein gene: myelination and development." Glia **37**(1): 19-30.
- Stadelmann, C., C. Wegner, et al. (2011). "Inflammation, demyelination, and degeneration - recent insights from MS pathology." Biochim Biophys Acta **1812**(2): 275-282.
- Stanisic, V., D. M. Lonard, et al. (2010). "Modulation of steroid hormone receptor activity." Prog Brain Res **181**: 153-176.
- Stankiewicz, J. M., H. Kolb, et al. (2013). "Role of immunosuppressive therapy for the treatment of multiple sclerosis." Neurotherapeutics **10**(1): 77-88.
- Stein, D. J. (2015). "Etifoxine versus alprazolam for the treatment of adjustment disorder with anxiety: a randomized controlled trial." Adv Ther **32**(1): 57-68.
- Steinman, L. (1999). "Assessment of animal models for MS and demyelinating disease in the design of rational therapy." Neuron **24**(3): 511-514.
- Steinman, L. and S. S. Zamvil (2006). "How to successfully apply animal studies in experimental allergic encephalomyelitis to research on multiple sclerosis." Ann Neurol **60**(1): 12-21.
- Strott, C. A. (2002). "Sulfonation and molecular action." Endocr Rev **23**(5): 703-732.
- Stuart, G. and K. S. Krikorian (1928). "The neuro-paralytic accidents of anti-rabies treatment." Ann. Trop. Med. Parasitol. **22**: 50.
- Su, K. G., G. Banker, et al. (2009). "Axonal degeneration in multiple sclerosis: the mitochondrial hypothesis." Curr Neurol Neurosci Rep **9**(5): 411-417.

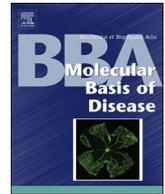
- Subramanian, S., A. Matejuk, et al. (2003). "Oral feeding with ethinyl estradiol suppresses and treats experimental autoimmune encephalomyelitis in SJL mice and inhibits the recruitment of inflammatory cells into the central nervous system." *J Immunol* **170**(3): 1548-1555.
- Sun, C., X. Ou, et al. (2012). "Allopregnanolone increases the number of dopaminergic neurons in substantia nigra of a triple transgenic mouse model of Alzheimer's disease." *Curr Alzheimer Res* **9**(4): 473-480.
- Sundberg, J. P., B. Rozell, et al. (2011). "Association between hair-induced oronasal inflammation and ulcerative dermatitis in C57BL/6 mice." *Comp Med* **61**(3): 204-205; author reply 205.
- Suridjan, I., P. M. Rusjan, et al. (2014). "Neuroinflammation in healthy aging: a PET study using a novel Translocator Protein 18kDa (TSPO) radioligand, [(18F)-FEPPA]." *Neuroimage* **84**: 868-875.
- Svejgaard, A. (2008). "The immunogenetics of multiple sclerosis." *Immunogenetics* **60**(6): 275-286.
- Taleb, O., F. Bouzobra, et al. (2017). "Behavioral and electromyographic assessment of oxaliplatin-induced motor dysfunctions: Evidence for a therapeutic effect of allopregnanolone." *Behav Brain Res* **320**: 440-449.
- Taliani, S., I. Pugliesi, et al. (2011). "Structural requirements to obtain highly potent and selective 18 kDa Translocator Protein (TSPO) Ligands." *Curr Top Med Chem* **11**(7): 860-886.
- Tan, K. R., U. Rudolph, et al. (2011). "Hooked on benzodiazepines: GABAA receptor subtypes and addiction." *Trends Neurosci* **34**(4): 188-197.
- Taves, M. D., C. Ma, et al. (2011). "Measurement of steroid concentrations in brain tissue: methodological considerations." *Front Endocrinol (Lausanne)* **2**: 39.
- Teige, I., A. Treschow, et al. (2003). "IFN-beta gene deletion leads to augmented and chronic demyelinating experimental autoimmune encephalomyelitis." *J Immunol* **170**(9): 4776-4784.
- Thompson, A. J., D. H. Miller, et al. (1990). "Patterns of disease activity in multiple sclerosis." *BMJ* **301**(6742): 44-45.
- Timby, E., M. Balgard, et al. (2006). "Pharmacokinetic and behavioral effects of allopregnanolone in healthy women." *Psychopharmacology (Berl)* **186**(3): 414-424.
- Torkildsen, O., L. A. Brunborg, et al. (2008). "The cuprizone model for demyelination." *Acta Neurol Scand Suppl* **188**: 72-76.
- Torkildsen, O., K. M. Myhr, et al. (2016). "Disease-modifying treatments for multiple sclerosis - a review of approved medications." *Eur J Neurol* **23** Suppl 1: 18-27.
- Trebst, C., S. Jarius, et al. (2014). "Update on the diagnosis and treatment of neuromyelitis optica: recommendations of the Neuromyelitis Optica Study Group (NEMOS)." *J Neurol* **261**(1): 1-16.
- Tuohy, V. K., Z. Lu, et al. (1989). "Identification of an encephalitogenic determinant of myelin proteolipid protein for SJL mice." *J Immunol* **142**(5): 1523-1527.
- Tvrdeić, A. and L. Poljak. (2016). "Neurosteroids, GABAA receptors and neurosteroid based drugs: are we witnessing the dawn of the new psychiatric drugs?" *Endocrine Oncology and Metabolism*. from <http://eom.hdeo.eu/wp-content/uploads/2017/02/vol2-iss1-7Tvrdetic.pdf>.
- Valera, S., M. Ballivet, et al. (1992). "Progesterone modulates a neuronal nicotinic acetylcholine receptor." *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(20): 9949-9953.
- Vallee, M. (2016). "Neurosteroids and potential therapeutics: Focus on pregnenolone." *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* **160**: 78-87.

- Vallee, M., W. Mayo, et al. (2001). "Neurosteroids in learning and memory processes." Int Rev Neurobiol **46**: 273-320.
- van Broekhoven, F. and R. J. Verkes (2003). "Neurosteroids in depression: a review." Psychopharmacology (Berl) **165**(2): 97-110.
- Vanderlugt, C. L. and S. D. Miller (2002). "Epitope spreading in immune-mediated diseases: implications for immunotherapy." Nat Rev Immunol **2**(2): 85-95.
- Vanherwegen, A. S., C. Gysemans, et al. (2017). "Vitamin D endocrinology on the cross-road between immunity and metabolism." Mol Cell Endocrinol.
- Vassall, K. A., V. V. Bamm, et al. (2015). "MyelStones: the executive roles of myelin basic protein in myelin assembly and destabilization in multiple sclerosis." Biochem J **472**(1): 17-32.
- Veenman, L., A. Vainshtein, et al. (2016). "Tetrapyrroles as Endogenous TSPO Ligands in Eukaryotes and Prokaryotes: Comparisons with Synthetic Ligands." Int J Mol Sci **17**(6).
- Vega-Riquer, J. M., G. Mendez-Victoriano, et al. (2017). "Five decades of cuprizone, an updated model to replicate demyelinating diseases." Curr Neuropharmacol.
- Veiga, S., I. Azcoitia, et al. (2005). "Ro5-4864, a peripheral benzodiazepine receptor ligand, reduces reactive gliosis and protects hippocampal hilar neurons from kainic acid excitotoxicity." J Neurosci Res **80**(1): 129-137.
- Verma, A. and S. H. Snyder (1988). "Characterization of porphyrin interactions with peripheral type benzodiazepine receptors." Mol Pharmacol **34**(6): 800-805.
- Versijpt, J., J. C. Debruyne, et al. (2005). "Microglial imaging with positron emission tomography and atrophy measurements with magnetic resonance imaging in multiple sclerosis: a correlative study." Mult Scler **11**(2): 127-134.
- Virtanen, J. O. and S. Jacobson (2012). "Viruses and multiple sclerosis." CNS Neurol Disord Drug Targets **11**(5): 528-544.
- Vowinckel, E., D. Reutens, et al. (1997). "PK11195 binding to the peripheral benzodiazepine receptor as a marker of microglia activation in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis." J Neurosci Res **50**(2): 345-353.
- Vyklicky, V., B. Krausova, et al. (2015). "Block of NMDA receptor channels by endogenous neurosteroids: implications for the agonist induced conformational states of the channel vestibule." Sci Rep **5**: 10935.
- Waldner, H., M. J. Whitters, et al. (2000). "Fulminant spontaneous autoimmunity of the central nervous system in mice transgenic for the myelin proteolipid protein-specific T cell receptor." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(7): 3412-3417.
- Wang, J. M., C. Singh, et al. (2010). "Allopregnanolone reverses neurogenic and cognitive deficits in mouse model of Alzheimer's disease." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(14): 6498-6503.
- Wang, J. Y., A. M. Trivedi, et al. (2017). "Open-Label Allopregnanolone Treatment of Men with Fragile X-Associated Tremor/Ataxia Syndrome." Neurotherapeutics.
- Wang, M. (2011). "Neurosteroids and GABA-A Receptor Function." Front Endocrinol (Lausanne) **2**: 44.
- Wang, M., X. Wang, et al. (2014). "Macroglia-microglia interactions via TSPO signaling regulates microglial activation in the mouse retina." J Neurosci **34**(10): 3793-3806.
- Weill-Engerer, S., J. P. David, et al. (2002). "Neurosteroid quantification in human brain regions: comparison between Alzheimer's and nondemented patients." J Clin Endocrinol Metab **87**(11): 5138-5143.
- Weiner, H. L. (2004). "Immunosuppressive treatment in multiple sclerosis." J Neurol Sci **223**(1): 1-11.

- Weinstock-Guttman, B., K. V. Nair, et al. (2017). "Two decades of glatiramer acetate: From initial discovery to the current development of generics." *J Neurol Sci* **376**: 255-259.
- Wendt, G., V. Kemmel, et al. (2014). "Gamma-hydroxybutyrate, acting through an anti-apoptotic mechanism, protects native and amyloid-precursor-protein-transfected neuroblastoma cells against oxidative stress-induced death." *Neuroscience* **263**: 203-215.
- West, L. A., R. D. Horvat, et al. (2001). "Steroidogenic acute regulatory protein and peripheral-type benzodiazepine receptor associate at the mitochondrial membrane." *Endocrinology* **142**(1): 502-505.
- Whitman, S. C. (2004). "A practical approach to using mice in atherosclerosis research." *Clin Biochem Rev* **25**(1): 81-93.
- Willenborg, D. O., S. Fordham, et al. (1996). "IFN-gamma plays a critical down-regulatory role in the induction and effector phase of myelin oligodendrocyte glycoprotein-induced autoimmune encephalomyelitis." *J Immunol* **157**(8): 3223-3227.
- Williamson, E. M., S. Chahin, et al. (2016). "Vaccines in Multiple Sclerosis." *Curr Neurol Neurosci Rep* **16**(4): 36.
- Wu, F. S., T. T. Gibbs, et al. (1991). "Pregnenolone sulfate: a positive allosteric modulator at the N-methyl-D-aspartate receptor." *Mol Pharmacol* **40**(3): 333-336.
- Wu, G. F. and E. Alvarez (2011). "The immunopathophysiology of multiple sclerosis." *Neurol Clin* **29**(2): 257-278.
- Wullschleger, A., V. Kapina, et al. (2013). "Cerebrospinal fluid interleukin-6 in central nervous system inflammatory diseases." *PLoS One* **8**(8): e72399.
- Xie, C., Y. Q. Liu, et al. (2016). "Induced Stem Cells as a Novel Multiple Sclerosis Therapy." *Curr Stem Cell Res Ther* **11**(4): 313-320.
- Xie, M., J. E. Tobin, et al. (2010). "Rostrocaudal analysis of corpus callosum demyelination and axon damage across disease stages refines diffusion tensor imaging correlations with pathological features." *J Neuropathol Exp Neurol* **69**(7): 704-716.
- Yanagibashi, K., Y. Ohno, et al. (1989). "Peripheral-type benzodiazepine receptors are involved in the regulation of cholesterol side chain cleavage in adrenocortical mitochondria." *J Biochem* **106**(6): 1026-1029.
- Yang, T., Q. Zheng, et al. (2017). "Effect of catalpol on remyelination through experimental autoimmune encephalomyelitis acting to promote Olig1 and Olig2 expressions in mice." *BMC Complement Altern Med* **17**(1): 240.
- Yasin, N., L. Veenman, et al. (2017). "Classical and Novel TSPO Ligands for the Mitochondrial TSPO Can Modulate Nuclear Gene Expression: Implications for Mitochondrial Retrograde Signaling." *Int J Mol Sci* **18**(4).
- Yates, M. A., Y. Li, et al. (2010). "Progesterone treatment reduces disease severity and increases IL-10 in experimental autoimmune encephalomyelitis." *J Neuroimmunol* **220**(1-2): 136-139.
- Yellayi, S., B. Hilliard, et al. (2011). "A single intrathecal injection of DNA and an asymmetric cationic lipid as lipoplexes ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis." *Mol Pharm* **8**(5): 1980-1984.
- Zamvil, S. S., D. J. Mitchell, et al. (1986). "T-cell epitope of the autoantigen myelin basic protein that induces encephalomyelitis." *Nature* **324**(6094): 258-260.
- Zappia, E., S. Casazza, et al. (2005). "Mesenchymal stem cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis inducing T-cell anergy." *Blood* **106**(5): 1755-1761.
- Zendedel, A., C. Beyer, et al. (2013). "Cuprizone-induced demyelination as a tool to study remyelination and axonal protection." *J Mol Neurosci* **51**(2): 567-572.
- Zhang, J. N., U. Michel, et al. (2016). "Calpain-mediated cleavage of collapsin response mediator protein-2 drives acute axonal degeneration." *Sci Rep* **6**: 37050.

- Zhang, M. R., K. Kumata, et al. (2007). "¹¹C-AC-5216: a novel PET ligand for peripheral benzodiazepine receptors in the primate brain." *J Nucl Med* **48**(11): 1853-1861.
- Zhang, Q., Z. Li, et al. (2016). "Myricetin alleviates cuprizone-induced behavioral dysfunction and demyelination in mice by Nrf2 pathway." *Food Funct* **7**(10): 4332-4342.
- Zhang, Y., S. Yu, et al. (2017). "The ligands of translocator protein inhibit human Th1 responses and the rejection of murine skin allografts." *Clin Sci (Lond)* **131**(4): 297-308.
- Zimmerberg, B. and R. C. Brown (1998). "Prenatal experience and postnatal stress modulate the adult neurosteroid and catecholaminergic stress responses." *Int J Dev Neurosci* **16**(3-4): 217-228.
- Zorumski, C. F., S. M. Paul, et al. (2013). "Neurosteroids, stress and depression: potential therapeutic opportunities." *Neurosci Biobehav Rev* **37**(1): 109-122.
- Zorzella-Pezavento, S. F., F. Chiuso-Minicucci, et al. (2017). "pVAXhsp65 Vaccination Primes for High IL-10 Production and Decreases Experimental Encephalomyelitis Severity." *J Immunol Res* **2017**: 6257958.

ANNEXE:
ARTICLE PUBLIE



The translocator protein ligand XBD173 improves clinical symptoms and neuropathological markers in the SJL/J mouse model of multiple sclerosis



Géraldine Leva^a, Christian Klein^a, Jérémie Benyounes^a, François Hallé^b, Frédéric Bihel^b,
Nicolas Collongues^a, Jérôme De Seze^a, Ayikoe-Guy Mensah-Nyagan^{a,*,1},
Christine Patte-Mensah^{a,*,1}

^a Biopathologie de la Myéline, Neuroprotection et Stratégies Thérapeutiques, INSERM U1119, Fédération de Médecine Translationnelle de Strasbourg (FMTS), Université de Strasbourg, Bâtiment 3 de la Faculté de Médecine, 11 rue Humann, 67 000 Strasbourg, France

^b Laboratoire d'innovation thérapeutique (LIT) CNRS UMR 7200, Faculté de Pharmacie de Strasbourg, 74 route du Rhin, CS 60024, 67401 Illkirch Cedex, France

ARTICLE INFO

Keywords:

Multiple sclerosis
Experimental autoimmune encephalomyelitis
XBD173
TSPO
Neurodegeneration
Neuroinflammation

ABSTRACT

Multiple sclerosis (MS) is a severe autoimmune disease characterized by inflammatory, demyelinating and neurodegenerative components causing motor, sensory, visual and/or cognitive symptoms. The relapsing-remitting MS affecting 85% of patients is reliably mimicked by the proteolipid-protein (PLP)-induced experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) SJL/J-mouse model. Significant progress was made for MS treatment but the development of effective therapies devoid of severe side-effects remains a great challenge. Here, we combine clinical, behavioral, histopathological, biochemical and molecular approaches to demonstrate that low and well tolerated doses (10–20 mg/kg) of TSPO ligand XBD173 (Emapunil) efficiently ameliorate clinical signs and neuropathology of PLP-EAE mice. In addition to the conventional clinical scoring of symptoms, we applied the robust behavioral Catwalk-method to confirm that XBD173 (10 mg/kg) increases the maximum contact area parameter at EAE-disease peak, indicating an improvement/recovery of motor functions. Consistently, histopathological studies coupled with microscope-cellSens quantification and RT-qPCR analyzes showed that XBD173 prevented demyelination by restoring normal protein and mRNA levels of myelin basic protein that was significantly repressed in PLP-EAE mice spinal cord and brain. Interestingly, ELISA-based measurement revealed that XBD173 increased allopregnanolone concentrations in PLP-EAE mice spinal and brain tissues. Furthermore, flow cytometry assessment demonstrated that XBD173 therapy decreased serum level of pro-inflammatory cytokines, including interleukin-17A, Interleukin-6 and tumor-necrosis-factor alpha in PLP-EAE mice. As the optimal XBD173 dosing exerting the maximal beneficial action in EAE mice is the lower 10 mg/kg dose, the paper opens interesting perspectives for the development of efficient and safe therapies against MS with slight or no side-effects.

1. Introduction

Multiple sclerosis (MS) is a complex autoimmune disease of the central nervous system (CNS) that affects mainly the brain, spinal cord and optic nerves with a female to male incidence of 2:1 [1–3]. Two major forms of MS are usually considered, the progressive form (PMS) which concerns 15% of patients and the most common relapsing-remitting course (RRMS) affecting about 85% of MS patients [3]. Both MS forms are characterized by inflammatory and degenerative components including inflammatory lesions associated with oligodendrocyte destruction and axonal degeneration [4–6]. The PMS or RRMS in humans are mimicked by the murine experimental autoimmune

encephalomyelitis (EAE) models induced by myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG) or by the proteolipid protein (PLP), respectively [6–8]. A series of immunomodulators, immunosuppressors and humanized monoclonal antibodies are currently available to reduce the symptoms in patients but effective treatments allowing the long term eradication of MS are still missing. Moreover, there are several side-effects associated with MS medications such as flu-like symptoms, chills, muscle and joint pain, liver dysfunctions, mood disorders [9,10]. Thus, under MS therapies, patients need to cope with various constraints including frequent blood tests, MRI analyzes and medical consultations to ensure the effectiveness of treatments and to identify the severity of side-effects that may require stopping or changing of the

* Corresponding authors.

E-mail addresses: gmensah@unistra.fr (A.-G. Mensah-Nyagan), cmensah@unistra.fr (C. Patte-Mensah).

¹ Equal contribution as last authors.

ongoing therapy. Therefore, the characterization of effective and safe MS drugs with no or little side-effects remains a great challenge for biomedical researchers. In particular, the identification of novel compounds that may efficiently protect against demyelination processes or against the destruction of myelin basic protein (MBP) that importantly determines axonal myelination [11,12] may be helpful to prevent MS-evoked axonal damages which cause severe disability and represent a major health concern with heavy socio-economic consequences.

The translocator protein (TSPO) is an 18 kDa protein located on the outer mitochondrial membrane that pivotally controls cholesterol translocation, steroid synthesis in endocrine glands and neurosteroid production (neurosteroidogenesis) in glial and neuronal cells [13–17]. TSPO, which has several effects on immune cells including inhibition of lymphoid cell proliferation, secretion of cytokines by macrophages, is involved in the modulation of inflammatory responses occurring in neurodegenerative diseases [18,19]. Interestingly, it has been shown that the modulation of TSPO by its partial ligand etifoxine decreased peripheral immune cell infiltration of the spinal cord, and increased oligodendroglial regeneration after inflammatory demyelination in the progressive EAE-MOG mice model. Because TSPO activation induces the production of neurosteroids which have been shown to exert anti-inflammatory, anxiolytic and neuroprotective actions in various experimental models [20–28], TSPO ligand-based therapy appears as a promising strategy to explore for the development of effective treatments against neurodegenerative disorders. In support of this idea, upregulation of TSPO was evidenced in CNS disorders, including Alzheimer's disease [29,30], Huntington's disease [31], brain tumor [32] traumatic brain injury [33] and MS [34,35]. Consistently, it has been reported that the demyelination observed in MS patients may be correlated to a deficit of neurosteroidogenesis [36–38]. Also, treatments of MS murine models with neurosteroids such as progesterone, allopregnanolone or testosterone reduced neuroinflammatory lesions, myelin and axonal injury and improved neurobehavioral symptoms [37,39–42]. The phenylpurine XBD173, also called Emapunil, is one of the most selective and high affinity TSPO ligand which stimulates neurosteroidogenesis [43,44]. XBD173 is characterized by previous elegant translational studies as an effective and nontoxic drug able to reduce efficiently anxiety in humans without exerting benzodiazepine-like side effects [20,45–47]. Therefore, XBD173 raises a great interest and hope to develop safe therapeutic strategy against TSPO-sensitive neuroinflammatory and/or neurodegenerative disorders. Recent investigations which have shown TSPO induction in retinal degenerations have also demonstrated that XBD173 is effective to dampen pro-inflammatory microglia reactivity in the retina and to protect from degeneration [48–50]. Surprisingly regarding MS, a previous study which used rodent EAE-MOG PMS models to assess the potential therapeutic effects of XBD173 (30 mg/kg) concluded that XBD173 is not efficient to improve MS clinical symptoms [51]. Because the RRMS is the most common pathology affecting 85% of patients, here we combined several methods including behavioral evaluation, histo-pathological analyzes, reverse transcription coupled to real-time PCR quantification (RT-qPCR) and flow cytometry to investigate the effect of XBD173 on clinical symptoms, inflammatory and demyelinating markers in the PLP-induced EAE SJL/J mice that represent a well-established model for the study of RRMS [6–8].

2. Materials and methods

2.1. Animals

Nine/ten-week-old SJL/jRj female mice were used in the present study. Animal handling were performed according to the European Community Council Directives (86/609/EC) and a local agreement delivered by the Alsace Department of Veterinary Public Health (Agreement number 67-186). The animals were obtained from a commercial source (Janvier, Le Genest-St-Isle, France) and housed under

standard laboratory conditions in a 12 h light/dark cycle with food and water ad libitum. Before starting the experiments, the animals were allowed a one-week acclimatization period after delivery in our animal house.

2.2. Induction of EAE

EAE was induced in 9–11-week-old mice by subcutaneous injection of an emulsion containing 150 µg proteolipid protein (PLP_{139–151}) peptide (Eurogentec, Liège, Belgium) emulsified 1:1 in Complete Freund's Adjuvant (CFA) to each hind flank (100 µl by flank). The CFA is prepared from Incomplete Freund's Adjuvant (IFA) (Santa Cruz Biotechnology, INC, Heidelberg, Germany) with mycobacterium tuberculosis (Difco Laboratories, Franklin Lakes, NJ) at 5 mg/ml. Then, the mice received 200 ng pertussis toxin (Enzo lifes sciences, Lausen, Swiss) in 200 µl sterile phosphate-buffered saline (PBS) intraperitoneally (i.p.) on day 0 and day 2 post-immunization (D0 and D2). Control mice were immunized without PLP_{139–151} according to a similar schedule. Clinical evaluation of symptoms was performed daily according to the standard EAE grading scale. The standard grading scale ranges from 0 to 10; 0: No clinical signs; 1: Partially limp tail; 2: Paralyzed tail; 3: Hind limb paresis, uncoordinated movement; 4: One hind limb paralyzed; 5: Both hind limbs paralyzed; 6: Hind limbs paralyzed, weakness in forelimbs; 7: Hind limbs paralyzed, one forelimb paralyzed; 8: Hind limbs paralyzed, both forelimbs paralyzed; 9: Moribund; 10: Death. The first measurement of the disease was taken on the day of EAE-induction (D0), and all the subsequent measurements were recorded every 24 h until sacrifice, as well as measuring the weight of animals.

2.3. Drug treatment

XBD173 was synthesized by our chemist partners (F. Hallé and F. Bihel) according to the experimental procedure reported by Zhang et al. [52]. The mice received i.p. injections (200 µl) of XBD173 at a dose of 10, 20 or 30 mg/kg (n = 26 for the groups 10 and 20 mg/kg, at the beginning of the experiments and n = 8 for the group 30 mg/kg), depending on the body weight, dissolved in hydroxypropyl cellulose (HPC) 0.3% (Alfa Aesar, Haverhill, Massachusetts, USA) and vehicle mice were injected with HPC 0.3% (n = 23, at the beginning of the experiments) according to a similar schedule. Mice were treated every two days from D4 until sacrifice.

2.4. Locomotion-data acquisition and analysis: Catwalk test

The motor evaluation was performed during the course of the disease and treatment with XBD173. Quantitative fully automated gait recording with the CatWalk System (CatWalk XT, Noldus Information Technology, Netherlands) was performed from D3 until the sacrifice depending on the severity of EAE-symptoms. Animals had to pass the platform until a member is paralyzed. Therefore, sample size per time point differs. The test was performed in a darkened room. The CatWalk System consists of a glass walkway that is illuminated by fluorescent light. When the paw is in contact with the upper surface of walkway, the print light is reflected downward. The system is furthermore equipped with a high speed color camera connected to a computer with the appropriate detection software (CatwalkXT9.1). The animal goes across a glass plate voluntarily, and its footprints are captured. The runs are limited between 0.50 and 10 s for the complete walkway. A maximum allowed speed variation of 60% is required for runs to be considered as valid. Compliant runs are classified for all limbs. To validate a run, the animal must cross the corridor within the time allowed and without stopping. The software measures various parameters including the maximum contact area analyzed in this study. The results of the maximum contact area (cm²) parameter are expressed as the mean value of the two hind paw footprint. The mice were first allowed to

habituate to the apparatus 3 days before immunization by crossing once the corridor without registration. Moreover, 20 min before the experiment, the animals were placed in the behavioral testing room. Catwalk test was realized twice a week.

2.5. Tissues conservation

Half of the animals were sacrificed at the peak of the disease and half before the relapse. The animals were deeply anesthetized with ketamine (200 mg/kg)/Rompun (20 mg/kg) (Centravet, France). Blood was removed, centrifuged at 1500g at 4 °C for 30 min and the serum was stored at – 80 °C. A part of the tissues was immediately frozen in liquid nitrogen and stored at – 80 °C until molecular biology experiments. The other part of the tissues was fixed in 4% paraformaldehyde (PFA) solution for 72 h at 4 °C. Afterwards, the tissues were immerse in PBS containing 15% sucrose for 24 h and then transferred into 30% sucrose PBS for 24 h. Tissues were then placed in embedding medium (OCT, Tissue-Tek, Reichert-Jung, Nussloch, Germany) and immediately frozen at – 80 °C.

2.6. Immunohistochemical studies

Spinal cord coronal and brain sagittal sections (15 µm thick) were cut in a Cryostat CM1950 (Leica, Wetzlar, Germany) and mounted on glass slides Superfrost plus (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, United States). After fixation of the sections in PFA 4% for 15 min, the tissues were permeabilized with ethanol 100% for 5 min. Non-specific binding sites were blocked with 5% fetal calf serum (Fisher scientific, Massachusetts, United States) in PBS for 20 min at room temperature. Afterwards, spinal cord and brain sections were incubated overnight at 4 °C with a rabbit polyclonal antibody against the myelin basic protein (MBP) diluted at 1:250 in PBS containing 5% fetal calf serum (Abcam, Cambridge, UK). The procedure was carried on by rinsing all of the tissue sections three times in PBS (15 min/rinse) and transferring them for 2 h into Alexa-488-conjugated goat anti-rabbit (GAR/Alexa-488, Abcam, Cambridge, UK) diluted at 1:500 in PBS. Finally, the sections were rinsed for 45 min in PBS and mounted in glycerol medium (Abcam, Cambridge, UK). Although specificity of the antibodies has previously been demonstrated [53], internal control experiments were performed in the present work as follows: (i) substitution of MBP antibody with 5% fetal calf serum in PBS, (ii) replacement of MBP antibody by non-immune rabbit serum, (iii) pre-incubation of MBP antibody with purified MBP. The preparations were examined under an Olympus u-TBI 90 fluorescent microscope (Shinjuku, Tokyo, Japan). Images were processed using Olympus cellSens Dimension Desktop software supplied with the camera. In the spinal cord, MBP immunofluorescence quantification was achieved in the white matter. In the brain, MBP counting was performed on 5 mice per group in a region of interest of 70,000 µm² of cortex, and 20,000 µm² for corpus callosum and cerebellum per slide labeled with MBP antibody. Results are given as the mean of the percent of MBP-immunofluorescence area over the total region of interest area.

For another part of the glass slides, after the brain sections were incubated overnight at 4 °C with a rabbit polyclonal antibody against MBP diluted at 1:250 in PBS containing 5% fetal calf serum (Abcam, Cambridge, UK), antibody binding to tissue sections was visualized with biotinylated anti-rabbit IgG (Vectastain®, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) and Avidin–Biotin-complex (ABC-peroxidase kit; Vectastain®, Vector Laboratories), followed by development with SG substrate (Vector® SG SK-4700, Vector Laboratories) for MBP. Slides were viewed using a Nikon® SMZ18 microscope connected to a Nikon® Digital Sight DS-Fi2 digital camera.

2.7. Reverse transcription and real time qPCR

The NucleoZOL reagent (Macherey-Nagel, Hoerdt, France) was used

according to the manufacturer's instructions for the extraction of total RNA from three regions of interest, cerebellum; corpus callosum and cortex of animals in control, vehicle and XBD173 treated groups. Reverse transcription was performed with 1 µg RNA using Bio-Rad iScript™ (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) using cDNA synthesis kits according to the manufacturer's protocol. The qPCR was performed with a thermal iCycler (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) using Bio-Rad SYBRGreen® dye. For each sample, the reaction mix was a make-up of 320 nM forward primer, 320 nM reverse primer, 12.5 nM probe and 2 µl cDNA template in a total reaction volume of 20 µl. To calculate starting quantities, a standard curve based on successive cDNA dilutions was set up by using the iCycler iQ optical system software (Bio-Rad 3.1 version). Starting quantities of genes of interest were reported to those of the HMBS and cyclophilin A genes (used as housekeeping genes) in the same plate to ensure an accurate calculation. All samples were analyzed in triplicate. Specificity of the amplification was controlled by a melting curve ranging from 62 °C to 95 °C and allowing the identification of a single peak corresponding to the amplicon. The primer sequences for MBP were: 5'-CAA-CAG-GAA-ACG-GGG-ACT-TA-3' (forward) and 5'-ATC-AAC-CAT-CAC-CTG-CCT-TC-3' (reverse). The primers sequences for the house keeping genes for HMBS were: 5'-GAT-GGG-CAA-CTG-TAC-CTG-ACT-G-3' (forward) and 5'-CTG-GGC-TCC-TCT-TGG-AAT-G-3' (reverse), and for cyclophilinA were: 5'-GTG-GCA-AGA-TCG-AAG-TGG-AGA-AAC-3'(forward) and 5'- TAA-AAA-TCA-GGC-CTG-TGG-AAT-GTG-3' (reverse).

2.8. ELISA-based assessment of allopregnanolone concentrations

The spinal cord and brain from control, vehicle and XBD173-treated mice were collected. The same quantity (40 mg) of spinal and brain tissues were separately homogenized and extracted by 15 ml acetonitrile. The tissue homogenate solutions were centrifuged at 10,000g for 10 min at 4 °C. The supernatants were collected and 30 ml of hexane were added. The organic phase containing non-conjugated steroids was recovered. Allopregnanolone concentration was quantified in the spinal cord and brain tissue homogenates by Enzyme Immunoassay kit (Arbor assay, Arbor, USA) according to the manufacturer's protocol. Optical density (OD) values were determined at 450 nm in ELISA plate reader (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA). Allopregnanolone concentrations were calculated by the software included in the kit and expressed in pg/ml.

2.9. Flow cytometry assessment of interleukin concentrations

The blood of controls, vehicle- and XBD173-treated mice was collected and centrifuged at 1500g, for 30 min at 4 °C. The serum from each group was stored at – 80 °C and different cytokines were dosed at the disease peak. The concentrations of Interleukin-17A (IL-17A), Interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor alpha (TNF-α) were measured using a BD Cytometric Bead Array (CBA) Mouse Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit (BioScience, Montana, United States) according to the manufacturer's protocol. Cytokine concentrations were determined by comparison with a standard curve and presented as pg/ml. The limit of detection was 0.8, 1.4 and 0.9 pg/ml for IL-17A, IL-6 and TNF-α, respectively. Individual samples were quantified on a BD Accuri C6 plus flow cytometer (BioScience, Montana, United States), and the data were analyzed using the BD Accuri C6 software.

2.10. Statistical analysis

All data represent the mean ± SEM. Statistical differences were assessed by analysis of one or two way ANOVA followed by Tukey's or Bonferroni's multiple comparisons test. Statistical analysis was performed with GraphPad-Prism software (GraphPad-Prism, San Diego, CA, USA). The data which did not exhibit a Gaussian distribution were analyzed by the non-parametric Mann-Whitney *U* test. A *p*-value

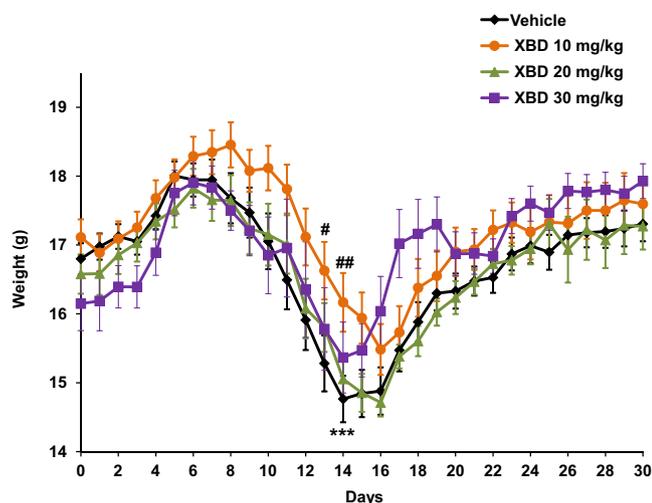


Fig. 1. SJL/J mice weight kinetics for vehicle- and XBD173-treatment. Weight was monitored daily in vehicle- and XBD173 (10, 20 and 30 mg/kg)-treated animals. Treatments were administered every two days from day 4 after immunization until the end of the experiments [n = 23 in vehicle-, n = 26 in XBD173 (10 or 20 mg/kg)- and n = 8 in XBD173 (30 mg/kg) groups]. Each value is expressed as mean \pm SEM. *** p < 0.001 compared D14 to D0 for the vehicle using one-way ANOVA followed by Tukey's *post-hoc* test. ## p < 0.01, # p < 0.05 compared XBD173 10 mg/kg to vehicle using two-way ANOVA followed by Bonferroni's test.

of < 0.05 was considered significant.

3. Results

3.1. Effect of XBD173 on clinical score in EAE mice

The selection of XBD173 doses tested (10 and 20 mg/kg) in the present work was based on previous studies which demonstrated that similar doses of XBD173 counter-regulate microgliosis, decrease inflammatory symptoms and have neuroprotective effect against retinal degenerations in mice [48,50]. Furthermore, we have also checked the action of XBD173 (30 mg/kg) on the clinical score of PLP-EAE RRMS mice because a previous study indicated that XBD173 at 30 mg/kg did not improve clinical symptoms in the rodent EAE-MOG PMS models [51]. Nine/ten-week-old SJL/jRj female mice were treated with XBD173 (10, 20 or 30 mg/kg) every two days from day 4 after immunization (D4) until the end of the experiments. Animal weight (Fig. 1) and neurological deficits (Fig. 2) were monitored daily. The clinical score was determined according to a scale from 0 to 10, as described above in the **Materials and Methods**. A body weight loss was the first disease symptom detectable which started around D9 and progressed to D14–16. During this specific phase of the disease, EAE mice lost approximately 15% of their body weight from D0 to D14 (Fig. 1). The body weight loss was significantly reduced in XBD173 (10 mg/kg)-treated mice compared to XBD173 (20 or 30 mg/kg) or vehicle-treated mice (Fig. 1). After D14–16, the body weight restarted to increase in all mice groups.

Clinical grading scale-based observations confirmed the expected relapsing-remitting course of EAE in SJL/jRj mice. As shown in Fig. 2A, the peak of EAE onset occurred on D14–16. When the mice were treated with XBD173 at 10 or 20 mg/kg, the occurrence of first clinical signs was significantly delayed compared to XBD173 (30 mg/kg) or vehicle-treated animals (Fig. 2A). Furthermore, at D14, the average clinical score (CS) was significantly reduced by XBD173 10 or 20 mg/kg (CS: 1.5 or 2, respectively) compared to XBD173 (30 mg/kg) or the vehicle (CS: 3.5 or 4, respectively). The time-course evaluation revealed that XBD173 at 10 mg/kg was more effective than 20 and 30 mg/kg doses (Fig. 2A). The decrease of clinical symptom severity evoked by 10 and 20 mg/kg doses of XBD173 was strongly pronounced between D12 and

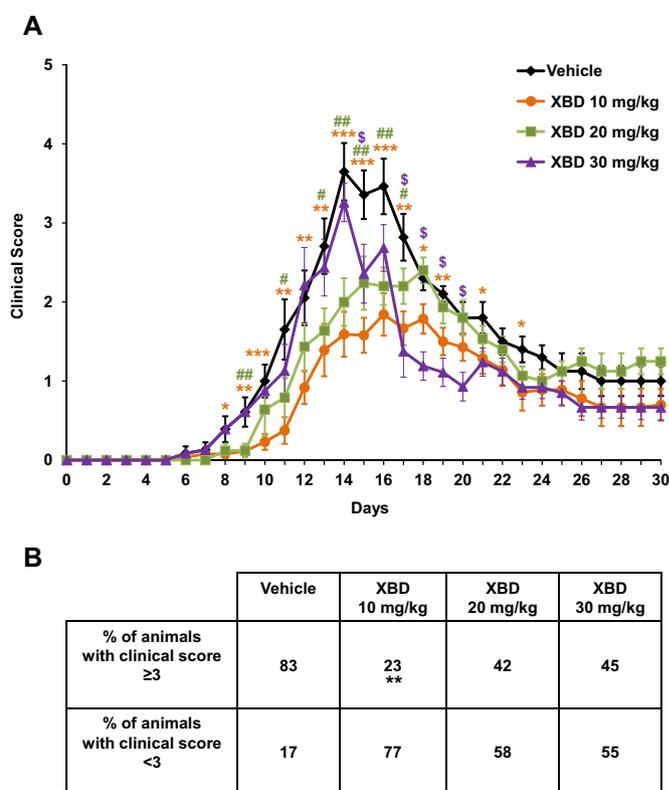


Fig. 2. Clinical score for vehicle- and XBD173-treatment. (A) Time-course evaluation of vehicle- and XBD173 (10, 20 or 30 mg/kg)-treated mice. Each value is expressed as mean \pm SEM. *** p < 0.001, ** p < 0.01, * p < 0.05 compared to vehicle using Mann-Whitney test. (B) Percentages of EAE mice, treated with the vehicle or XBD173 (10, 20 or 30 mg/kg) at the EAE peak (D14/D15), having a high (≥ 3) or low (< 3) clinical score (CS). Vehicle (n = 23); XBD173 at 10 or 20 mg/kg (n = 26/groups); XBD173 at 30 mg/kg (n = 8). ** p < 0.01 compared to vehicle using Mann-Whitney test.

D17. The dose 30 mg/kg of XBD173 also induced a beneficial action but this effect mainly occurred from D15 to D18. Moreover, by using as reference the CS 3, which corresponds to uncoordinated movements at EAE peak and constitutes a key index to evaluate the disease progression, we found that the percentages of EAE mice displaying a CS lower than 3 were 77%, 58% and 55% for XBD173 (10 mg/kg)-, XBD173 (20 mg/kg)- and XBD173 (30 mg/kg)-treated mice, respectively and only 17% for the vehicle-treated mice (Fig. 2B). Thus, 10 mg/kg of XBD173 appears as the optimal dose to ameliorate efficiently the CS in PLP-EAE RRMS mice and the dose enhancement resulted in a progressive decrease of the drug efficacy. Noteworthy is however the fact that 30 mg/kg dose of XBD173 (not active in EAE-MOG PMS rodent [51]) significantly reduced the CS in PLP-EAE RRMS mice even though this dose remained the less effective among the 3 tested doses (10, 20 and 30 mg/kg) in preventing the symptom severity at the disease peak.

Because the clinical scoring-based investigations revealed only slight or moderate differences between the effects of XBD173 at 20 mg/kg and 30 mg/kg, and in order to comply with ethical regulations (avoidance of the use of excessive number of animals), all additional experiments described below were performed using the two relevant 10 and 20 mg/kg doses of XBD173.

3.2. Effect of XBD173 on motor function

To strengthen our clinical scoring-based observations, we have also used the Catwalk system to perform a walking track test to ensure the evaluation of motor functions in the EAE mice. The maximum contact area (cm²) parameter of each hind paw footprint was provided by the Catwalk System (Fig. 3). Fig. 3 shows that the maximal contact area

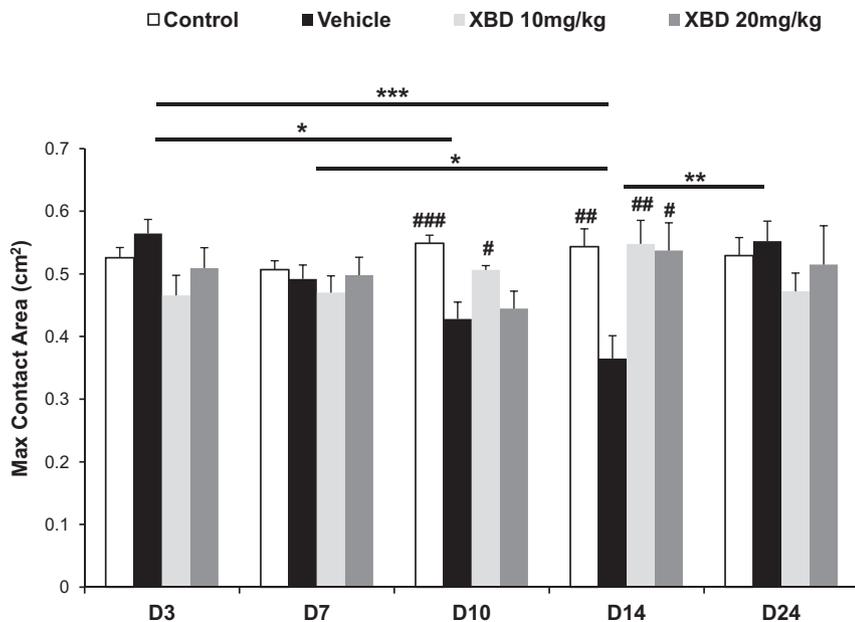


Fig. 3. Effect of XBD173 on motor activity. The max contact area (cm^2) was measured by the Catwalk System in the non-immunized control group and in EAE mice treated with the vehicle or XBD173 (10 mg/kg or 20 mg/kg) at D3, D7, D10, D14 and D24. Each value is expressed as mean + SEM. *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$, statistical differences between vehicle group; ## compared to vehicle using ANOVA test.

parameter of EAE mice (compared to the non-immunized controls) progressively decreased from D3 to D14 before increasing to retrieve the normal value at D24. This time-course profile of the motor symptoms is perfectly correlated to the disease progression assessed on CS basis as the maximum contact area parameter of the EAE mice dropped significantly to reach the lowest value at D14 which corresponds to the disease peak associated to the highest CS. At D10, the maximum contact area parameter significantly decreased in vehicle- and XBD173 (20 mg/kg)-but not in XBD173 (10 mg/kg)-treated EAE mice. Interestingly, when the EAE peaked at D14 with the highest CS and the lowest value of maximum contact area parameter, XBD173 (10 or 20 mg/kg) treatment, but not the vehicle, successfully restored the normal value of this motor Catwalk index. At D24 corresponding to the remission phase, the maximum contact area value reversed back to the normal level (observed at D3) in all experimental groups (Fig. 3).

3.3. Effect of XBD173 on MBP distribution and expression level in the brain and spinal cord

The distribution and expression levels of MBP in the brain and spinal cord were analyzed at the disease peak (D14). The overall cerebral distribution of MBP-immunoreactivity was revealed by SG kit in the brain of non-immunized control animals (Fig. 4A) or in EAE mice treated with the vehicle (Fig. 4B), XBD173 10 mg/kg (Fig. 4C) or XBD173 20 mg/kg (Fig. 4D). The density of MBP-like immunostaining strongly decreased in the brain of vehicle-treated EAE compared to the controls (Fig. 4A, B). XBD173 (10 or 20 mg/kg) treatment significantly prevented EAE-induced decreased density of MBP-immunoreactivity in the mouse brain (Fig. 4C, D).

To further characterize the impact of EAE development on MBP expression level and distribution, we have also performed immunofluorescence analyzes to assess MBP-immunofluorescent material in the spinal cord (Fig. 5) and 3 functionally important brain structures (Fig. 6), including the cerebellum (Cer), corpus callosum (CC) and cortex (C), that are known to be strongly myelinated in the normal or nonpathological brain. Indeed, an intense MBP-immunofluorescent labeling was visualized in the spinal cord white matter (Fig. 5A), Cer, CC and C (Fig. 6A–E) of non-immunized control mice. By contrast, MBP-positive staining was strongly reduced in the spinal cord (Fig. 5B), Cer, CC and C of EAE mice receiving the vehicle (Fig. 6F–H). XBD173 (10 mg/kg) treatment successfully counteracted EAE-induced decreased MBP-immunofluorescence in both the spinal cord (Fig. 5C) and

brain (Fig. 6I–K). The dose 20 mg/kg of XBD173, which was less effective than 10 mg/kg but also improved MBP expression in the Cer, CC and C (Fig. 6L–N), did not ameliorate significantly the level of MBP-immunostaining in the spinal cord (Fig. 5D).

Quantitative analyzes with the Olympus cellSens Dimension Desktop software revealed that both 10 and 20 mg/kg doses of XBD173 were able to restore normal level of MBP expression in the CC and C of EAE mice but, in the Cer and spinal cord, only 10 mg/kg dosing of XBD173 was effective in protecting against EAE-evoked demyelination or decreased MBP expression although a trend but not statistically significant beneficial effect was seen for the 20 mg/kg dose (Fig. 7).

3.4. Stimulatory effect of XBD173 on MBP gene expression (mRNA level) in spinal and brain structures

The levels of transcripts encoding MBP in the spinal cord, Cer, CC and C were examined at D14 by RT-qPCR in non-immunized control animals and EAE mice receiving the vehicle or XBD173 treatment (Fig. 8). MBP mRNA level detected in spinal and brain structures of vehicle-treated EAE mice was notably lower (3.6-, 2.17-, 2.75- or 1.4-fold lower in the spinal cord, Cer, CC or C, respectively) than in the controls (Fig. 8). XBD173 treatment stimulated MBP gene expression and increased MBP mRNA levels in the central nervous system of EAE mice (Fig. 8). At 10 mg/kg, XBD173 totally reversed to normal values EAE-induced decreased MBP mRNA levels in the spinal cord, Cer, CC and C while the dose of 20 mg/kg, which restored normal value of MBP mRNA level in the C, exerted only a partial restoration in the CC and a positive trend but not statistically significant action in the spinal cord and Cer (Fig. 8).

3.5. Effect of XBD173 on neurosteroid allopregnanolone concentration in spinal and brain tissue homogenates

Because XBD173 is known to be a selective and high-affinity ligand of TSPO inducing the production of the neuroprotective neurosteroid allopregnanolone [24,25,47,54,55] we used the ELISA method to assess allopregnanolone concentrations in the spinal cord and brain of control animals and EAE mice receiving the vehicle or XBD173 treatment (Fig. 9). Decreased concentrations of allopregnanolone were found in both spinal (Fig. 9A) and brain (Fig. 9B) tissues of vehicle-treated EAE mice compared to the non-immunized controls. Interestingly, XBD173 treatment (10 or 20 mg/kg) significantly increased allopregnanolone

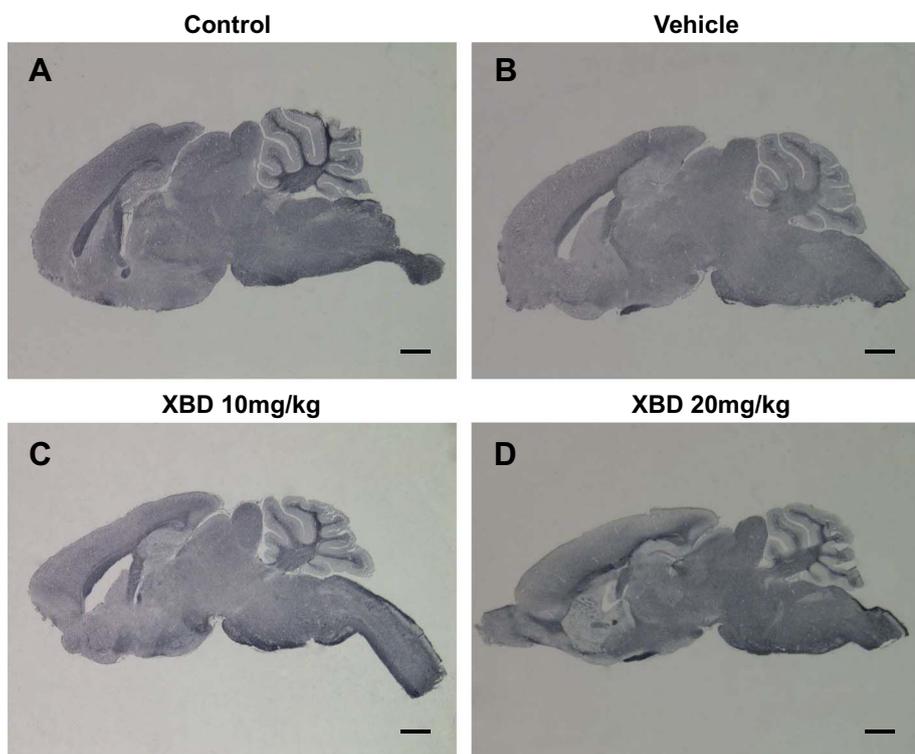


Fig. 4. Cerebral distribution of MBP-immunoreactivity at D14. SG kit was used to reveal the overall distribution of MBP-immunostaining in the brain of non-immunized control animals (A) or EAE mice treated with the vehicle (B), XBD173 at 10 mg/kg (C) or XBD173 at 20 mg/kg (D). Scale bar = 1000 μ m.

concentrations in spinal and brain tissues of EAE mice (Fig. 9).

3.6. Effect of XBD173 on interleukin serum concentrations

Interleukin IL-17A is a crucial effector cytokine with proinflammatory effects that induces also the expression of other

proinflammatory cytokines including IL-6 and TNF- α [56–59]. Thus, IL-17-producing cells are thought to be essential inflammatory mediators in autoimmune diseases such as the EAE [56–59]. By using a BD Cytometric Bead Array cytokine kit, we investigated IL-17A, IL-6 and TNF- α serum concentrations in control and EAE mice at the disease peak (Fig. 10). IL-17A (Fig. 10A), IL-6 (Fig. 10B) and TNF- α (Fig. 10C)

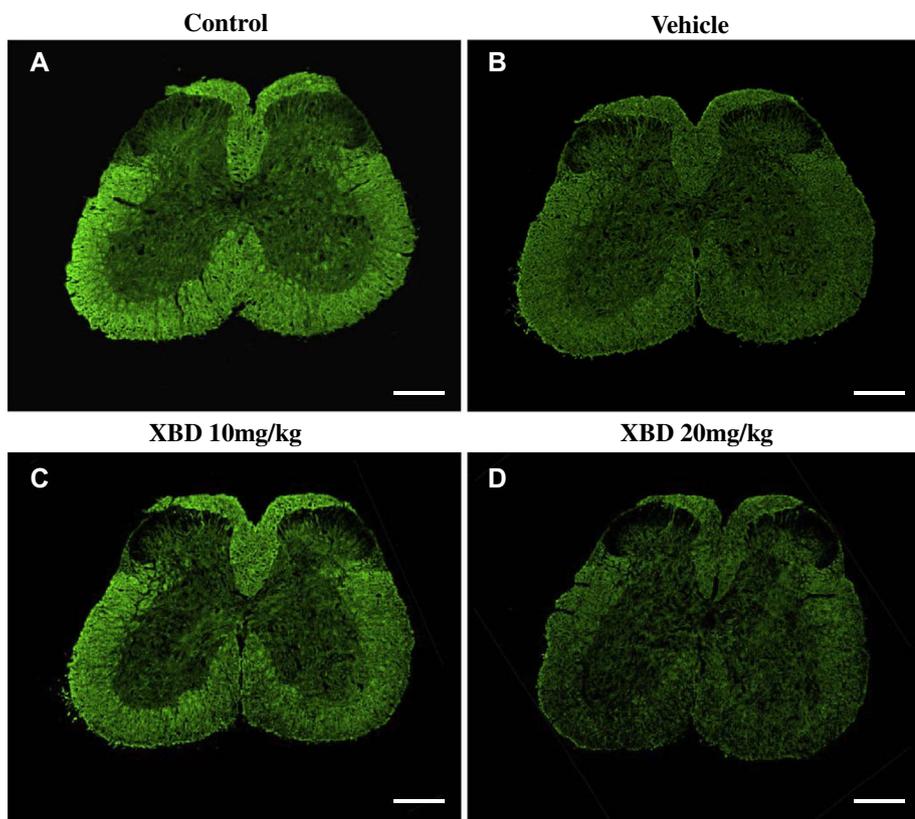


Fig. 5. MBP-immunofluorescent material in the spinal cord at the disease peak (D14). Distribution of MBP-immunostaining in the spinal cord of non-immunized control animals (A) or EAE mice treated with the vehicle (B), XBD173 at 10 mg/kg (C) or XBD173 at 20 mg/kg (D). The sections were labeled with a polyclonal anti-MBP revealed with Alexa-488-conjugated goat anti-rabbit. Scale bar = 200 μ m.

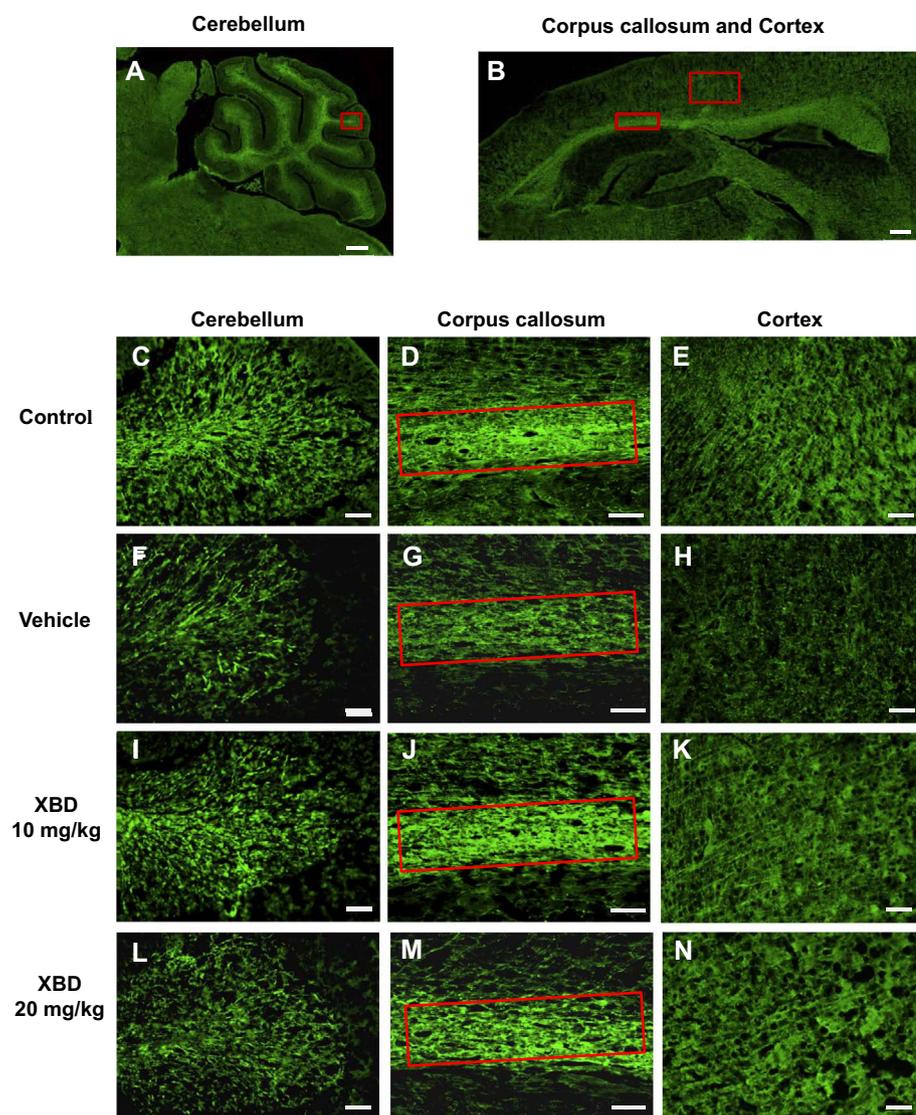


Fig. 6. Localization of MBP-immunostaining in the cerebellum, corpus callosum and cerebral cortex at D14. (A, B) Overview of the cerebellum (A), corpus callosum and cortex (B). Scale bar = 500 μm. (C–N) Photomicrographs of the cerebellum (C, F, I, L), corpus callosum (D, G, J, M) and cerebral cortex (E, H, K, N) in non-immunized control animals (C–E) and EAE mice treated with the vehicle (F–H), XBD173 (10 mg/kg) (I–K) or XBD173 (20 mg/kg) (L–N). The sections were labeled with a polyclonal anti-MBP revealed with Alexa-488-conjugated goat anti-rabbit. Scale bar = 40 μm.

concentrations significantly increased, about 2.5-, 1.5 and 2 fold respectively, in the serum of EAE mice treated with the vehicle compared to non-immunized control animals. Both XBD173 10 and 20 mg/kg treatments successfully decreased IL-17A and TNF- α serum concentrations in EAE mice (Fig. 10A and C). Furthermore, the dose of XBD173 at 10 mg/kg was also capable to reverse to normal value IL-6 serum concentration that was elevated in the EAE mice (Fig. 10B).

4. Discussion

Although significant progress has recently been made for the treatment of MS, the development of effective therapies devoid of severe side effects and/or heavy constraints remain a serious challenge. The present paper shows that a low and well tolerated dose (10 mg/kg) of the TSPO ligand XBD173 (Emapunil) efficiently reduces the severity of clinical and behavioral symptoms in PLP-induced EAE SJL/jRj mice that reliably mimic the RRMS form affecting over 85% of MS patients. In addition to the clinical observational method conventionally used in the literature to score the disease progression and symptoms, we have used an original, robust and strongly objective approach based on the Catwalk system to confirm the characterization of EAE-evoked motor symptoms in order to determine precisely XBD173 beneficial actions against PLP-induced RRMS symptoms in mice. Our results show that XBD173 increases the maximum contact area parameter at the disease

peak indicating an improvement of motor functions and gait posture recovery. This observation is perfectly consistent with our clinical scoring revealing that XBD173 treatment at 10 mg/kg dose also decreased significantly the percentage of PLP-induced EAE mice displaying a high CS over 3 which corresponds to hind limb paresis and uncoordinated movement. In agreement with our results, recent investigations demonstrated that the same dose of XBD173 (10 mg/kg) effectively decreased microglial pro-inflammatory responses *in vivo* and ameliorated light-induced retinal degeneration in mice [50]. More importantly, XBD173, which is well tolerated in humans and induces antipanic action with no sedative or withdrawal symptoms contrary to benzodiazepines [20,54], may fully be relevant for clinical uses in MS patients. Altogether, these data strongly support the idea that XBD173 offers promising opportunities to develop effective and safe therapeutic strategies against MS. To our knowledge, this is the first report of XBD173-induced beneficial effect against MS symptoms. Indeed, a previous study which has tested XBD173 in the MOG-induced EAE in mice and dark agouti rats, concluded that XBD173 is not effective to ameliorate clinical symptoms in these rodent models mimicking human PMS while Etifoxine, another TSPO ligand, was effective [51]. The dose of XBD173 tested by this previous investigation (30 mg/kg) is 3 times higher than 10 mg/kg which is optimally effective in the present work. Of note is the fact that the present study also reveals that XBD173 at 30 mg/kg (ineffective in EAE-MOG PMS rodent [51]) has slightly but

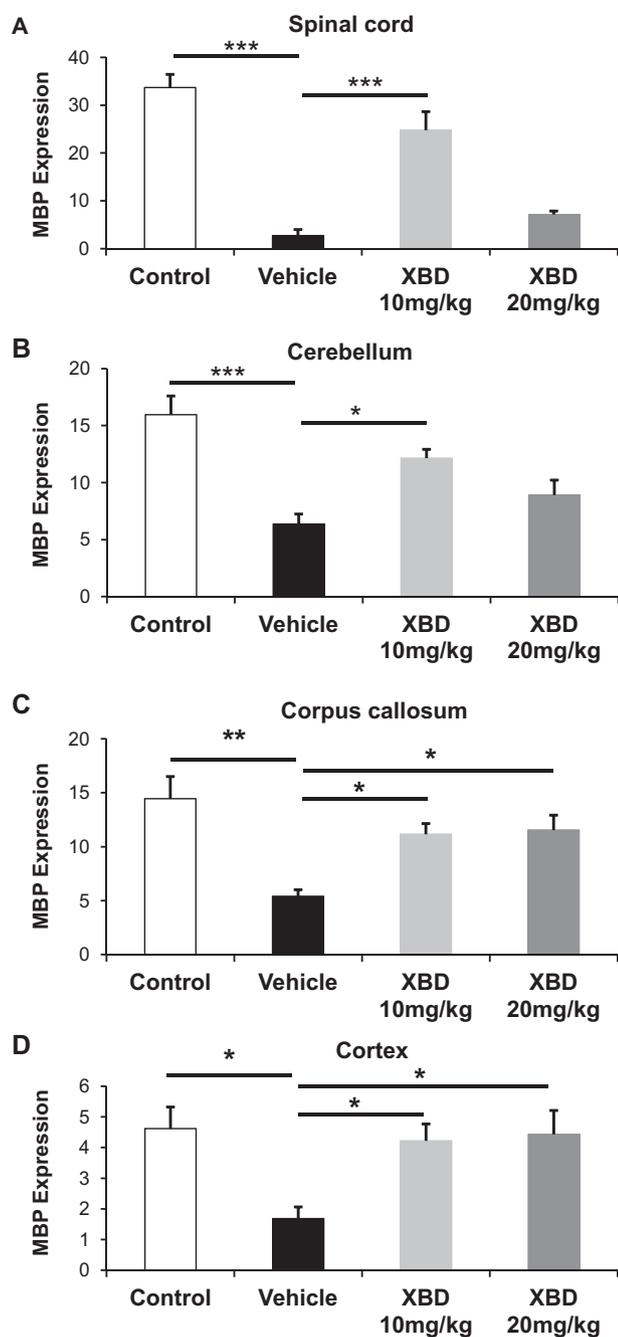


Fig. 7. Microscopic and camera-assisted cellSens Dimension Desktop Software quantification of MBP expression in the spinal cord white matter (A), cerebellum (B), corpus callosum (C), cerebral cortex (D) at the disease peak (D14). Each chart bar represents the mean (+ SEM) of the percent of MBP-immunofluorescent area over the total region of the interest area measured in sections dissected from non-immunized control animals and from EAE mice treated with the vehicle, XBD173 (10 mg/kg) or XBD173 (20 mg/kg). *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ compared to vehicle using ANOVA test.

significantly decreased the severity of clinical symptoms in PLP-EAE RRMS mice. These data suggest that XBD173 efficacy in MS treatment may specifically depends on MS forms with the possibility that XBD173 ameliorates efficiently RRMS symptoms affecting over 85% of MS patients but not the PMS form that concerns 15% of patients. However, further investigations will be necessary to clarify whether XBD173 doses lower than 30 mg/kg may not be also effective in the MOG-induced EAE models. Indeed, it appears more encouraging and reasonable to expect the development of safe and effective therapeutic strategy devoid of side-effects on the basis of preclinical data obtained with low

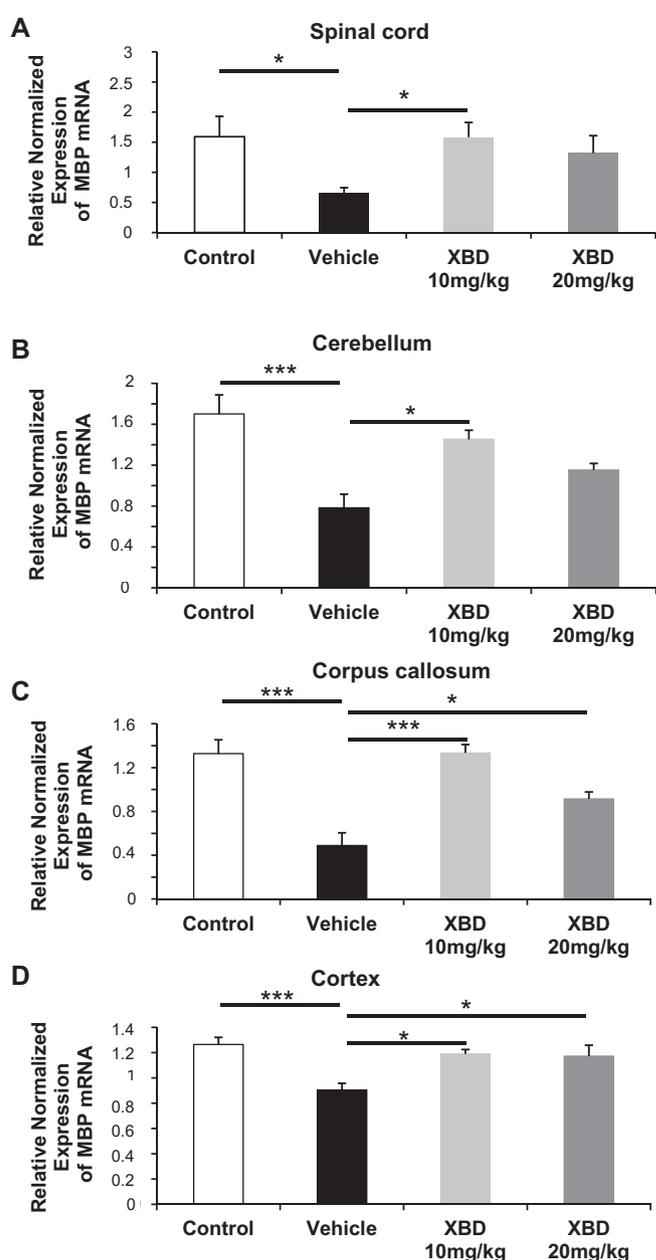


Fig. 8. Expression of MBP gene in spinal and brain structures at D14. Levels of mRNA encoding MBP in the spinal cord (A), cerebellum (B), corpus callosum (C) and cerebral cortex (D). The level of transcripts encoding MBP is expressed as the mean (+ SEM) of the relative normalized MBP mRNA expressed in non-immunized control animals and in EAE mice treated with the vehicle or XBD173 at 10 or 20 mg/kg. *** $p < 0.001$, * $p < 0.05$ compared to vehicle using ANOVA test.

but not high dosing of XBD173. Interestingly, the efficacy of XBD173 at 10 mg/kg evidenced in RRMS mice models by the present work is perfectly concordant with previous studies which also found that the same dose (10 mg/kg) of XBD173 efficiently protected against neuroinflammatory symptoms and retinal degeneration in mice [48,50].

The present study also shows an inverted dose-response relationship between the 3 tested doses of XBD173 and their respective efficacy. Indeed, XBD173 efficacy to decrease the severity of clinical symptoms, which was optimally high with the lowest 10 mg/kg dose, appeared moderate or slight (but significant) with the higher XBD173 doses of 20 and 30 mg/kg. The compound XBD173 is a selective and high-affinity ligand of TSPO that has recently been characterized as having also a long Residence Time at TSPO binding site to induce potent neurosteroidogenic activity [55]. This observation suggests that the repeated

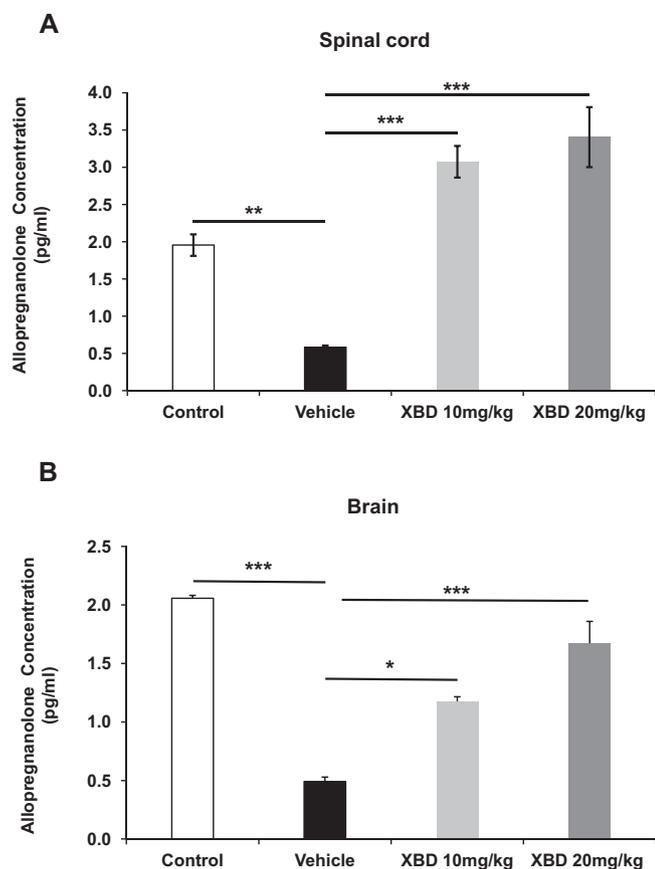


Fig. 9. Allopregnanolone concentrations in non-immunized control and in EAE mice spinal cord and brain at D14. The levels of allopregnanolone, that were measured by ELISA-based method in spinal (A) and brain (B) tissue homogenates using an Enzyme Immunoassay kit, are expressed in pg/ml according to the manufacturer's protocol and software (see [Materials and Methods](#)). Each value is expressed as mean (+ SEM) of allopregnanolone concentrations in non-immunized control animals and EAE mice treated with the vehicle, XBD173 at 10 or 20 mg/kg. *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ compared to the vehicle using ANOVA test ($n = 5$ for all groups).

administrations (every 2 days) of low doses of XBD173 may be sufficient to strongly or optimally activate TSPO to generate long term beneficial actions in EAE mice whereas repeated XBD173 high dose injections may induce TSPO desensitization (at least partially) after a transient beneficial effect. Further studies will certainly be necessary to check this hypothesis but the idea is strongly supported by previous data showing that very low concentrations of diazepam-binding inhibitor-derived peptides (endogenous/natural TSPO ligands) or Ro5-4864 (synthetic TSPO ligand) induced a dose-dependent increase in [3H]thymidine incorporation in rat astrocytes via TSPO modulation while the effect gradually declined at higher doses [60].

In addition to clinical scoring, behavioral assessment and time-course evaluation of the disease symptoms in PLP-induced EAE mice, we have also performed histo-pathological studies, RT-PCR and flow cytometry analyzes to determine the effect of XBD173 on tissue and cellular markers in order to get inside into the mechanisms that may eventually be involved in XBD173-induced beneficial action in RRMS mouse model. Consistently with our clinical and behavioral observations, we found that XBD173 treatment restored normal values of protein and mRNA expression levels of the major myelin protein MBP that was significantly repressed in PLP-induced EAE mice spinal and brain structures. MBP pivotally determines myelination in the CNS and MBP repression causes demyelinating disorders including MS, the pathogenesis of which has well been correlated to antibodies against MBP [61–65]. Our SG kit-based studies of MBP cerebral distribution show an overall decreased density of MBP-like immunoreactivity which reveals

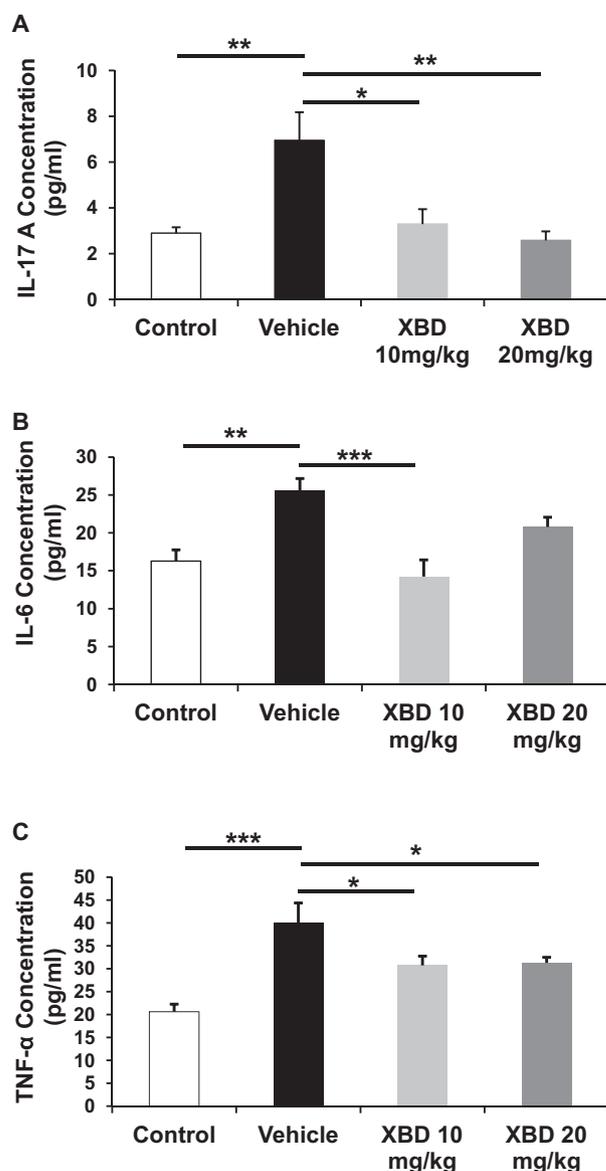


Fig. 10. Flow cytometry quantification of XBD173 effect on IL-17 (A), IL-6 (B) and TNF- α (C) serum concentrations at D14. Each value is expressed as mean (+ SEM) of IL-17, IL-6 and TNF- α concentration in non-immunized control animals ($n = 7$) and EAE mice treated with the vehicle ($n = 8$), XBD173 at 10 mg/kg ($n = 5$) and XBD173 at 20 mg/kg ($n = 6$). *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ compared to the vehicle using ANOVA test.

the occurrence of demyelination in EAE mice brain. XBD173 treatment, but not the vehicle, clearly improves MBP cerebral distribution and restored normal level of myelination in EAE-treated mice. Furthermore, RT-qPCR analyzes revealed that XBD173 treatment promoted the activation of MBP gene expression and the microscopic cellSens Dimension quantification of MBP-immunofluorescent material confirmed that XBD173 also induced increased level of the protein MBP in EAE mice spinal and brain structures. Interestingly, we found that XBD173 therapy efficiently repaired MBP repression and demyelination in the corpus callosum (the largest myelinated brain structure), cerebral cortex, cerebellum and spinal cord which control numerous physiological functions including motor and sensory activities, inter hemispheric communication, gait, posture, movement coordination, cognitive and visual functions that are affected in MS [4,66–70]. Additional works will certainly be necessary to elucidate the signaling pathways triggered by XBD173 to promote MBP gene and protein expression. However, since XBD173 activates TSPO-mediated cholesterol

translocation and pregnenolone synthesis launching therefore the production of neuroprotective neurosteroids such as progesterone and allopregnanolone, XBD173-evoked MBP expression may result from cellular signaling cascades involving neurosteroids [24,25,71–74]. In support of this idea, alteration of neurosteroid production was evidenced in MS patients and decreased severity of EAE symptoms was observed in rodent treated with progesterone or allopregnanolone [36–38,40,75]. More importantly, ELISA-based measurement performed in the present work showed that the concentrations of allopregnanolone were dramatically reduced in the spinal cord and brain tissues of vehicle-treated EAE mice compared to the non-immunized controls. Consistently, XBD173 treatments, which improved clinical symptoms and neuropathological markers, also significantly increased allopregnanolone concentrations in EAE mice spinal and brain tissues. Altogether, these data strongly support the involvement of XBD173-evoked TSPO activation and neurosteroid production in the mechanisms determining the beneficial effects exerted by XBD173 therapy in EAE mice. However, it is important to recall that the induction of anti-inflammatory processes remains a major component accounting for the elucidation of the mechanisms involved in TSPO activation-evoked protective action in EAE mice. Indeed, previous investigations using high dosage (30 mg/kg) of XBD173 showed that XBD173 strongly activated pregnenolone production but was not able to reduce the clinical symptoms in MOG-EAE rodent whereas Etifoxine (50 mg/kg) which did not induce high neurosteroidogenic level exerted beneficial effect [51]. Consequently, the positive modulation of neurosteroid production may not be the only one mechanism activated by XBD173 to prevent or counteract PLP-induced clinical, behavioral, histological and molecular parameters we observed in SJL/J mice. Therefore, we have also performed flow cytometry analyzes to determine the effect of XBD173 treatment on serum concentration of pro-inflammatory cytokines such as IL17A, IL6 and TNF- α that are considered to be pivotal effectors in autoimmune diseases [57–58]. Indeed, MS relapses are characterized by a shift of serum cytokines towards a pro-inflammatory profile and an increased serum level of IL-17 is now well established as a relevant index to assess this pro-inflammatory state leading to sustaining tissue damage in chronic neuroinflammation [59,76]. Our data show that XBD173 (10 or 20 mg/kg) treatment reversed to normal values IL-17A serum level which significantly increased (2.5 fold) in EAE mice. In addition, XBD173 (10 or 20 mg/kg) also successfully decreased TNF- α serum level in EAE mice. The optimal XBD173 dose of 10 mg/kg completely reversed to normal value IL-6 serum concentration that was elevated in the EAE mice. Altogether, our results suggest that XBD173 may interact with TSPO to decrease the production of pro-inflammatory cytokines in immune cells, preventing therefore neuroinflammation-evoked demyelinating process or central lesions generating EAE disease symptoms and severity. In support of this idea, TSPO ligand Etifoxine, which prevented the CNS infiltration by CD4 + cells in MOG-induced EAE rodent, also decreased interferon- γ and IL-17 mRNA expression in CD4 + cells [77]. Furthermore, it has recently been demonstrated that TSPO ligands FGIN1-27 and Ro5-4864, which blocked dose-dependently cytokine production in purified human CD4 + T-cells, also inhibited interferon- γ synthesis by CD4 + T-cells [78]. Therefore, the activation of anti-inflammatory process or the down-regulation of pro-inflammatory effectors seems to critically determine XBD173-evoked beneficial effect in EAE mice.

In conclusion, the present work shows that TSPO ligand XBD173 therapy (i) decreases pro-inflammatory cytokine (IL-17, IL6 and TNF- α) production, (ii) increases allopregnanolone synthesis in the spinal cord and brain, (iii) counteracts MBP gene repression-evoked demyelination, (iv) delays the occurrence of first disease signs and (v) reduces efficiently the severity of clinical and behavioral symptoms in PLP-induced EAE mice that mimic the human RRMS form. As the optimal XBD173 dosage (10 mg/kg), which effectively exerts maximal beneficial effects in PLP-EAE mice, represents a low and well tolerated dose, the paper opens interesting perspectives for further research that may help to

develop efficient and safe therapies against MS with slight or no side-effects.

Transparency document

The <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbadis.2017.09.007> associate with this article can be found, in online version.

Acknowledgments

This work was supported by grants from Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM, France) and Université de Strasbourg (France). Authors would like to thank Dr. Laurence Meyer for the useful advises on the Catwalk test and Dr. Susana Brun for the helpful discussions on flow cytometry.

References

- [1] M. Sospedra, R. Martin, Immunology of multiple sclerosis, *Annu. Rev. Immunol.* 23 (2005) 683–747.
- [2] B.D. Trapp, K.A. Nave, Multiple sclerosis: an immune or neurodegenerative disorder, *Annu. Rev. Neurosci.* 31 (2008) 247–269.
- [3] R. Milo, E. Kahana, Multiple sclerosis: geoepidemiology, genetics and the environment, *Autoimmun. Rev.* 9 (2010) A387–94.
- [4] A. Compston, A. Coles, Multiple sclerosis, *Lancet* 372 (2008) 1502–1517.
- [5] H. Lassmann, Multiple sclerosis: lessons from molecular neuropathology, *Exp. Neurol.* 262 (Pt A) (2014) 2–7.
- [6] M. Kipp, S. Nyamoya, T. Hochstrasser, S. Amor, Multiple sclerosis animal models: a clinical and histopathological perspective, *Brain Pathol.* 27 (2017) 123–137.
- [7] A.P. Robinson, C.T. Harp, A. Noronha, S.D. Miller, The experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) model of MS: utility for understanding disease pathophysiology and treatment, *Handb. Clin. Neurol.* 122 (2014) 173–189.
- [8] C.S. Constantinescu, N. Farooqi, K. O'Brien, B. Gran, Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) as a model for multiple sclerosis (MS), *Br. J. Pharmacol.* 164 (2011) 1079–1106.
- [9] C. Eckstein, M.T. Bhatti, Currently approved and emerging oral therapies in multiple sclerosis: an update for the ophthalmologist, *Surv. Ophthalmol.* 61 (2016) 318–332.
- [10] P. McNamara, G. Sugrue, B. Murray, P.J. MacMahon, Current and emerging therapies in multiple sclerosis: implications for the radiologist, part 1—mechanisms, efficacy, and safety, *AJNR Am. J. Neuroradiol.* 38 (2017) 1672–1680.
- [11] J.D. Haines, M. Inglese, P. Casaccia, Axonal damage in multiple sclerosis, *Mt Sinai J. Med.* 78 (2011) 231–243.
- [12] K. Frid, O. Einstein, Y. Friedman-Levi, O. Binyamin, T. Ben-Hur, R. Gabizon, Aggregation of MBP in chronic demyelination, *Ann. Clin. Transl. Neurol.* 2 (2015) 711–721.
- [13] E. Costa, J. Auta, A. Guidotti, A. Korneyev, E. Romeo, The pharmacology of neurosteroidogenesis, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 49 (1994) 385–389.
- [14] M. Garnier, N. Boujrad, S.O. Ogwuegbu, J.R. Hudson Jr., V. Papadopoulos, The polypeptide diazepam-binding inhibitor and a higher affinity mitochondrial peripheral-type benzodiazepine receptor sustain constitutive steroidogenesis in the R2C Leydig tumor cell line, *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 22105–22112.
- [15] E.E. Baulieu, Neuroactive neurosteroids: dehydroepiandrosterone (DHEA) and DHEA sulphate, *Acta Paediatr. Suppl.* 88 (1999) 78–80.
- [16] A.G. Mensah-Nyagan, J.L. Do-Rego, D. Beaujean, V. Luu-The, G. Pelletier, H. Vaudry, Neurosteroids: expression of steroidogenic enzymes and regulation of steroid biosynthesis in the central nervous system, *Pharmacol. Rev.* 51 (1999) 63–81.
- [17] V. Papadopoulos, L. Lecanu, R.C. Brown, Z. Han, Z.X. Yao, Peripheral-type benzodiazepine receptor in neurosteroid biosynthesis, neuropathology and neurological disorders, *Neuroscience* 138 (2006) 749–756.
- [18] M. Pawlikowski, Immunomodulating effects of peripherally acting benzodiazepines, in: E. Giesen-Crouse (Ed.), *Peripheral Benzodiazepine Receptors*, Academic Press, London, 1993, pp. 125–135.
- [19] X. Qi, J. Xu, F. Wang, J. Xiao, Translocator protein (18 kDa): a promising therapeutic target and diagnostic tool for cardiovascular diseases, *Oxidative Med. Cell. Longev.* 2012 (2012) 162934.
- [20] R. Rupprecht, G. Rammes, D. Eser, T.C. Baghai, C. Schule, C. Nothdurfter, T. Troxler, C. Gentsch, H.O. Kalkman, F. Chaperon, V. Uzunov, K.H. McAllister, V. Bertina-Anglade, C.D. La Rochelle, D. Tuerck, A. Floesser, B. Kiese, M. Schumacher, R. Landgraf, F. Holsboer, K. Kucher, Translocator protein (18 kD) as target for anxiolytics without benzodiazepine-like side effects, *Science* 325 (2009) 490–493.
- [21] V. Schaeffer, L. Meyer, C. Patte-Mensah, A.G. Mensah-Nyagan, Progress in dorsal root ganglion neurosteroidogenic activity: basic evidence and pathophysiological correlation, *Prog. Neurobiol.* 92 (2010) 33–41.
- [22] K.K. Borowicz, B. Piskorska, M. Banach, S.J. Czuczwar, Neuroprotective actions of neurosteroids, *Front. Endocrinol. (Lausanne)* 2 (2011) 50.
- [23] G.C. Panzica, J. Balthazart, C.A. Frye, L.M. Garcia-Segura, A.E. Herbison, A.G. Mensah-Nyagan, M.M. McCarthy, R.C. Melcangi, Milestones on steroids and

- the nervous system: 10 years of basic and translational research, *J. Neuroendocrinol.* 24 (2012) 1–15.
- [24] R.D. Brinton, Neurosteroids as regenerative agents in the brain: therapeutic implications, *Nat. Rev. Endocrinol.* 9 (2013) 241–250.
- [25] C. Patte-Mensah, L. Meyer, O. Taleb, A.G. Mensah-Nyagan, Potential role of allopregnanolone for a safe and effective therapy of neuropathic pain, *Prog. Neurobiol.* 113 (2014) 70–78.
- [26] P. Porcu, A.M. Barron, C.A. Frye, A.A. Walf, S.Y. Yang, X.Y. He, A.L. Morrow, G.C. Panzica, R.C. Melcangi, Neurosteroidogenesis today: novel targets for neuroactive steroid synthesis and action and their relevance for translational research, *J. Neuroendocrinol.* 28 (2016) 12351.
- [27] M. Karout, M. Miesch, P. Geoffroy, S. Kraft, H.D. Hofmann, A.G. Mensah-Nyagan, M. Kirsch, Novel analogs of allopregnanolone show improved efficiency and specificity in neuroprotection and stimulation of proliferation, *J. Neurochem.* 139 (2016) 782–794.
- [28] S.S. Andrabi, S. Parvez, H. Tabassum, Progesterone induced neuroprotection in reperfusion promoted mitochondrial dysfunction following focal cerebral ischemia in rats, *Dis. Model. Mech.* 10 (2017) 787–796.
- [29] P. Edison, H.A. Archer, A. Gerhard, R. Hinz, N. Pavese, F.E. Turkheimer, A. Hammers, Y.F. Tai, N. Fox, A. Kennedy, M. Rossor, D.J. Brooks, Microglia, amyloid, and cognition in Alzheimer's disease: an [11C](R)PK11195-PET and [11C]PIB-PET study, *Neurobiol. Dis.* 32 (2008) 412–419.
- [30] F. Yasuno, M. Ota, J. Kosaka, H. Ito, M. Higuchi, T.K. Doronbekov, S. Nozaki, Y. Fujimura, M. Koeda, T. Asada, T. Suhara, Increased binding of peripheral benzodiazepine receptor in Alzheimer's disease measured by positron emission tomography with [11C]DAA1106, *Biol. Psychiatry* 64 (2008) 835–841.
- [31] K. Messmer, G.P. Reynolds, Increased peripheral benzodiazepine binding sites in the brain of patients with Huntington's disease, *Neurosci. Lett.* 241 (1998) 53–56.
- [32] E. Vlodaysky, J.F. Soustiel, Immunohistochemical expression of peripheral benzodiazepine receptors in human astrocytomas and its correlation with grade of malignancy, proliferation, apoptosis and survival, *J. Neuro-Oncol.* 81 (2007) 1–7.
- [33] V. Papadopoulos, L. Lecanu, Translocator protein (18 kDa) TSPO: an emerging therapeutic target in neurotrauma, *Exp. Neurol.* 219 (2009) 53–57.
- [34] E. Vowinckel, D. Reutens, B. Becher, G. Verge, A. Evans, T. Owens, J.P. Antel, PK11195 binding to the peripheral benzodiazepine receptor as a marker of microglia activation in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis, *J. Neurosci. Res.* 50 (1997) 345–353.
- [35] J. Versijpt, J.C. Debruyne, K.J. Van Laere, F. De Vos, J. Keppens, K. Strijckmans, E. Achten, G. Slegers, R.A. Dierckx, J. Korf, J.L. De Reuck, Microglial imaging with positron emission tomography and atrophy measurements with magnetic resonance imaging in multiple sclerosis: a correlative study, *Mult. Scler.* 11 (2005) 127–134.
- [36] H. Leitner, Influence of neurosteroids on the pathogenesis of multiple sclerosis, *Med. Hypotheses* 75 (2010) 229–234.
- [37] F. Noorbakhsh, K.K. Ellestad, F. Maingat, K.G. Warren, M.H. Han, L. Steinman, G.B. Baker, C. Power, Impaired neurosteroid synthesis in multiple sclerosis, *Brain* 134 (2011) 2703–2721.
- [38] D. Caruso, M. Melis, G. Fenu, S. Giatti, S. Romano, M. Grimoldi, D. Crippa, M.G. Marroso, G. Cavaletti, R.C. Melcangi, Neuroactive steroid levels in plasma and cerebrospinal fluid of male multiple sclerosis patients, *J. Neurochem.* 130 (2014) 591–597.
- [39] H.J. Yu, J. Fei, X.S. Chen, Q.Y. Cai, H.L. Liu, G.D. Liu, Z.X. Yao, Progesterone attenuates neurological behavioral deficits of experimental autoimmune encephalomyelitis through remyelination with nucleus-sublocalized Olig1 protein, *Neurosci. Lett.* 476 (2010) 42–45.
- [40] S. Giatti, M. Boraso, R.C. Melcangi, B. Viviani, Neuroactive steroids, their metabolites, and neuroinflammation, *J. Mol. Endocrinol.* 49 (2012) R125–34.
- [41] L.I. Garay, M.C. Gonzalez Deniselle, M.E. Brocca, A. Lima, P. Roig, A.F. De Nicola, Progesterone down-regulates spinal cord inflammatory mediators and increases myelination in experimental autoimmune encephalomyelitis, *Neuroscience* 226 (2012) 40–50.
- [42] R. Hussain, A.M. Ghoumari, B. Bielecki, J. Steibel, N. Boehm, P. Liere, W.B. Macklin, N. Kumar, R. Habert, S. Mhaouty-Kodja, F. Tronche, R. Sitruk-Ware, M. Schumacher, M.S. Ghandour, The neural androgen receptor: a therapeutic target for myelin repair in chronic demyelination, *Brain* 136 (2013) 132–146.
- [43] C. Schule, C. Nothdurfter, R. Rupprecht, The role of allopregnanolone in depression and anxiety, *Prog. Neurobiol.* 113 (2014) 79–87.
- [44] V. Papadopoulos, Y. Aghazadeh, J. Fan, E. Campioli, B. Zirkov, A. Midzak, Translocator protein-mediated pharmacology of cholesterol transport and steroidogenesis, *Mol. Cell. Endocrinol.* 408 (2015) 90–98.
- [45] A. Kita, H. Kohayakawa, T. Kinoshita, Y. Ochi, K. Nakamichi, S. Kurumiya, K. Furukawa, M. Oka, Antianxiety and antidepressant-like effects of AC-5216, a novel mitochondrial benzodiazepine receptor ligand, *Br. J. Pharmacol.* 142 (2004) 1059–1072.
- [46] A. Kita, T. Kinoshita, H. Kohayakawa, K. Furukawa, A. Akaike, Lack of tolerance to anxiolysis and withdrawal symptoms in mice repeatedly treated with AC-5216, a selective TSPO ligand, *Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatry* 33 (2009) 1040–1045.
- [47] C. Nothdurfter, G. Rammes, T.C. Baghai, C. Schule, M. Schumacher, V. Papadopoulos, R. Rupprecht, Translocator protein (18 kDa) as a target for novel anxiolytics with a favourable side-effect profile, *J. Neuroendocrinol.* 24 (2012) 82–92.
- [48] M. Karlstetter, C. Nothdurfter, A. Aslanidis, K. Moeller, F. Horn, R. Scholz, H. Neumann, B.H. Weber, R. Rupprecht, T. Langmann, Translocator protein (18 kDa) (TSPO) is expressed in reactive retinal microglia and modulates microglial inflammation and phagocytosis, *J. Neuroinflammation* 11 (2014) 3.
- [49] M. Wang, X. Wang, L. Zhao, W. Ma, I.R. Rodriguez, R.N. Fariss, W.T. Wong, Macroglia-microglia interactions via TSPO signaling regulates microglial activation in the mouse retina, *J. Neurosci.* 34 (2014) 3793–3806.
- [50] R. Scholz, A. Caramoy, M.B. Bluckory, K. Rashid, M. Chen, H. Xu, C. Grimm, T. Langmann, Targeting translocator protein (18 kDa) (TSPO) dampens pro-inflammatory microglia reactivity in the retina and protects from degeneration, *J. Neuroinflammation* 12 (2015) 201.
- [51] B. Ravikumar, D. Crawford, T. Dellovade, A. Savinainen, D. Graham, P. Liere, J.P. Oudinet, M. Webb, H. Hering, Differential efficacy of the TSPO ligands etifoxine and XBD-173 in two rodent models of multiple sclerosis, *Neuropharmacology* 108 (2016) 229–237.
- [52] M.R. Zhang, K. Kumata, J. Maeda, K. Yanamoto, A. Hatori, M. Okada, M. Higuchi, S. Obayashi, T. Suhara, K. Suzuki, 11C-AC-5216: a novel PET ligand for peripheral benzodiazepine receptors in the primate brain, *J. Nucl. Med.* 48 (2007) 1853–1861.
- [53] S. Chen, H. Zhang, H. Pu, G. Wang, W. Li, R.K. Leak, J. Chen, A.K. Liou, X. Hu, n-3 PUFA supplementation benefits microglial responses to myelin pathology, *Sci Rep* 4 (2014) 7458.
- [54] R. Rupprecht, V. Papadopoulos, G. Rammes, T.C. Baghai, J. Fan, N. Akula, G. Groyer, D. Adams, M. Schumacher, Translocator protein (18 kDa) (TSPO) as a therapeutic target for neurological and psychiatric disorders, *Nat. Rev. Drug Discov.* 9 (2010) 971–988.
- [55] B. Costa, E. Da Pozzo, C. Cavallini, S. Taliani, F. Da Settimo, C. Martini, Long residence time at the neurosteroidogenic 18 kDa translocator protein characterizes the anxiolytic ligand XBD173, *ACS Chem. Neurosci.* 7 (2016) 1041–1046.
- [56] K. Shan, R. Pang, C. Zhao, X. Liu, W. Gao, J. Zhang, D. Zhao, Y. Wang, Y. Qiu, IL-17-triggered downregulation of miR-907 results in high HIF-1 α expression and consequent IL-1 β and IL-6 production by astrocytes in EAE mice, *Cell. Mol. Immunol.* (2017), <http://dx.doi.org/10.1038/cmi.2017.12> (Epub ahead of print).
- [57] T. Kuwabara, F. Ishikawa, M. Kondo, T. Kakiuchi, The role of IL-17 and related cytokines in inflammatory autoimmune diseases, *Mediat. Inflamm.* 2017 (2017) 3908061.
- [58] M. Akdis, A. Aab, C. Altunbulakli, K. Azkur, R.A. Costa, R. Cramer, S. Duan, T. Eiwegger, A. Eljaszewicz, R. Ferstl, R. Frei, M. Garbani, A. Globinska, L. Hess, C. Huitema, T. Kubo, Z. Komlosi, P. Konieczna, N. Kovacs, U.C. Kucuksezzer, N. Meyer, H. Morita, J. Olzhausen, L. O'Mahony, M. Pezer, M. Prati, A. Rebana, C. Rhyner, A. Rinaldi, M. Sokolowska, B. Stanic, K. Sugita, A. Treis, W. van de Veen, K. Wanke, M. Wawrzyniak, P. Wawrzyniak, O.F. Wirz, J.S. Zakzuk, C.A. Akdis, Interleukins (from IL-1 to IL-38), interferons, transforming growth factor beta, and TNF-alpha: receptors, functions, and roles in diseases, *J. Allergy Clin. Immunol.* 138 (2016) 984–1010.
- [59] T. Korn, E. Bettelli, M. Oukka, V.K. Kuchroo, IL-17 and Th17 cells, *Annu. Rev. Immunol.* 27 (2009) 485–517.
- [60] P. Gandolfo, C. Patte, J. Leprince, J.L. Rego, A.G. Mensah-Nyagan, H. Vaudry, M.C. Tonon, The triakontatetraeneuropeptide (TTN) stimulates thymidine incorporation in rat astrocytes through peripheral-type benzodiazepine receptors, *J. Neurochem.* 75 (2000) 701–707.
- [61] C.M. Deber, S.J. Reynolds, Central nervous system myelin: structure, function, and pathology, *Clin. Biochem.* 24 (1991) 113–134.
- [62] H. Inouye, D.A. Kirschner, Folding and function of the myelin proteins from primary sequence data, *J. Neurosci. Res.* 28 (1991) 1–17.
- [63] T. Berger, P. Rubner, F. Schautzer, R. Egg, H. Ulmer, I. Mayringer, E. Dilitz, F. Deisenhammer, M. Reindl, Antimyelin antibodies as a predictor of clinically definite multiple sclerosis after a first demyelinating event, *N. Engl. J. Med.* 349 (2003) 139–145.
- [64] A. Massella, G. D'Intino, M. Fernandez, S. Sivilla, L. Lorenzini, S. Giatti, R.C. Melcangi, L. Calza, L. Giardino, Gender effect on neurodegeneration and myelin markers in an animal model for multiple sclerosis, *BMC Neurosci.* 13 (2012) 12.
- [65] T. Yang, Q. Zheng, S. Wang, L. Fang, L. Liu, H. Zhao, L. Wang, Y. Fan, Effect of catalpol on remyelination through experimental autoimmune encephalomyelitis acting to promote Olig1 and Olig2 expressions in mice, *BMC Complement. Altern. Med.* 17 (2017) 240.
- [66] S.V. Siddiqui, U. Chatterjee, D. Kumar, A. Siddiqui, N. Goyal, Neuropsychology of prefrontal cortex, *Indian J. Psychiatry* 50 (2008) 202–208.
- [67] J.E. Desmond, Trends in cerebellar research, *Behav. Neurol.* 23 (2010) 1–2.
- [68] L.B. Hinkley, E.J. Marco, A.M. Findlay, S. Honma, R.J. Jeremy, Z. Strominger, P. Bukshpun, M. Wakahiro, W.S. Brown, L.K. Paul, A.J. Barkovich, P. Mukherjee, S.S. Nagarajan, E.H. Sherr, The role of corpus callosum development in functional connectivity and cognitive processing, *PLoS One* 7 (2012) e39804.
- [69] J. Peterburs, J.E. Desmond, The role of the human cerebellum in performance monitoring, *Curr. Opin. Neurobiol.* 40 (2016) 38–44.
- [70] K. Kansal, Z. Yang, A.M. Fishman, H.I. Sair, S.H. Ying, B.M. Jedynek, J.L. Prince, C.U. Onyike, Structural cerebellar correlates of cognitive and motor dysfunctions in cerebellar degeneration, *Brain* 140 (2017) 707–720.
- [71] M. Djebaili, S.W. Hoffman, D.G. Stein, Allopregnanolone and progesterone decrease cell death and cognitive deficits after a contusion of the rat pre-frontal cortex, *Neuroscience* 123 (2004) 349–359.
- [72] M. Djebaili, Q. Guo, E.H. Pettus, S.W. Hoffman, D.G. Stein, The neurosteroids progesterone and allopregnanolone reduce cell death, gliosis, and functional deficits after traumatic brain injury in rats, *J. Neurotrauma* 22 (2005) 106–118.
- [73] X.L. Yao, J. Liu, E. Lee, G.S. Ling, J.T. McCabe, Progesterone differentially regulates pro- and anti-apoptotic gene expression in cerebral cortex following traumatic brain injury in rats, *J. Neurotrauma* 22 (2005) 656–668.
- [74] R.W. Irwin, C.M. Solinsky, R.D. Brinton, Frontiers in therapeutic development of allopregnanolone for Alzheimer's disease and other neurological disorders, *Front. Cell. Neurosci.* 8 (2014) 203.
- [75] M.A. Yates, Y. Li, P. Chlebeck, T. Proctor, A.A. Vandenbark, H. Offner, Progesterone

- treatment reduces disease severity and increases IL-10 in experimental autoimmune encephalomyelitis, *J. Neuroimmunol.* 220 (2010) 136–139.
- [76] D.W. Luchtman, E. Ellwardt, C. Larochele, F. Zipp, IL-17 and related cytokines involved in the pathology and immunotherapy of multiple sclerosis: current and future developments, *Cytokine Growth Factor Rev.* 25 (2014) 403–413.
- [77] D.J. Daugherty, V. Selvaraj, O.V. Chechneva, X.B. Liu, D.E. Pleasure, W. Deng, A TSPO ligand is protective in a mouse model of multiple sclerosis, *EMBO Mol. Med.* 5 (2013) 891–903.
- [78] Y. Zhang, S. Yu, X. Li, B. Yang, C. Wu, The ligands of translocator protein inhibit human Th1 responses and the rejection of murine skin allografts, *Clin. Sci. (Lond.)* 131 (2017) 297–308.

**Neuroprotection dans des modèles animaux de la sclérose en plaques:
évaluation pluridisciplinaire de la capacité du XBD173, un ligand du
translocator protein, à améliorer les symptômes cliniques et les marqueurs
neuropathologiques**

Résumé

La sclérose en plaques (SEP) est une maladie auto-immune inflammatoire chronique qui détériore la myéline centrale des patients. Des progrès ont été réalisés dans le traitement de la SEP mais il n'existe pas encore de neuroprotecteurs efficaces contre les dommages axonaux entraînant un lourd handicap. Ce travail de thèse a évalué le potentiel du XBD173, un ligand du *translocator protein* contrôlant la neurostéroïdogénèse et la neuroinflammation, à améliorer les symptômes dans un modèle de SEP induit par la protéolipide-protéine (souris EAE-PLP) qui mime la forme rémittente-récurrente de la SEP (85% des patients). Nos résultats montrent qu'à faible dose, le XBD173, qui diminue les taux sériques d'interleukines pro-inflammatoires et empêche la répression des marqueurs myélinique et axonal, améliore aussi la symptomatologie des souris EAE-PLP. L'effet bénéfique du XBD173 contre les signes cliniques est reproduit chez les souris EAE-MOG mimant la forme progressive de la SEP. La thèse ouvre des perspectives pour l'élaboration de stratégies efficaces contre la SEP sans induire d'effets secondaires majeurs.

Mots clés: Ligand du *translocator protein* ; Neuroprotection; Neurostéroïdes; Sclérose en plaques; Stratégie thérapeutique; TSPO; XBD173 ou Emapunil.

Abstract

Multiple sclerosis (MS) is a chronic inflammatory autoimmune disease affecting the central myelin. Progress has been made for MS treatment, but effective neuroprotective drugs against MS-evoked axonal damages and severe disability are still missing. This thesis assessed the potential of XBD173, a ligand of the translocator protein controlling neurosteroidogenesis and neuroinflammation, to improve symptoms in the proteolipid protein-induced MS model (EAE-PLP mice) that mimics the relapsing-remitting form affecting 85% of MS patients. Our results show that XBD173 at low dose decreases serum levels of pro-inflammatory interleukins, prevents the repression of myelin and axonal markers, and also ameliorates clinical deficits in EAE-PLP mice. The beneficial effect of XBD173 against clinical symptoms was also observed in the EAE-MOG mice mimicking the progressive MS. Promising perspectives are open for the development of effective strategies against MS with little or no serious side effects.

Keywords: Ligand of translocator protein; Multiple sclerosis; Neuroprotection; Neurosteroids; Therapeutic strategy; TSPO; XBD173 or Emapunil.