



**HAL**  
open science

# **Implication du stress oxydant et du dysfonctionnement mitochondrial dans la genèse des symptômes sensitifs au cours des pathologies dysmyélinisantes – Etudes physiopathologiques et approches thérapeutiques**

Méline Bégou

## **► To cite this version:**

Méline Bégou. Implication du stress oxydant et du dysfonctionnement mitochondrial dans la genèse des symptômes sensitifs au cours des pathologies dysmyélinisantes – Etudes physiopathologiques et approches thérapeutiques. Sciences du Vivant [q-bio]. Université Clermont Auvergne (UCA), 2023. <tel-04719254>

**HAL Id: tel-04719254**

**<https://hal.science/tel-04719254v1>**

Submitted on 3 Oct 2024

**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.



Copyright - All rights reserved

## HABILITATION A DIRIGER DES RECHERCHES

Présentée par

**Mélina BEGOU**

Maître de conférences en pharmacologie  
Section CNU 86 : Personnels enseignants-chercheurs de pharmacie en  
sciences du médicament et des autres produits de santé

**IMPLICATION DU STRESS OXYDANT ET DU  
DYSFONCTIONNEMENT MITOCHONDRIAL DANS LA GENESE DES  
SYMPTOMES SENSITIFS AU COURS DES PATHOLOGIES  
DYSMYELINISANTES – ETUDES PHYSIOPATHOLOGIQUES ET  
APPROCHES THERAPEUTIQUES**

*Soutenue le 29 mars 2023 à l'Université Clermont Auvergne*

### Composition du jury

Rapporteurs : Pr Xavier AYRIGNAC  
Pr Ayikoé-Guy MENSAH-NYAGAN  
Dr Brahim NAIT-OUMESMAR

Membres invités : Dr Marie-Françoise SUAUD-CHAGNY  
Pr Odile BOESPFLUG-TANGUY

Responsable tutélaire : Pr Laurence DAULHAC-TERRAIL



A ma famille



On peut avoir trois principaux objets dans l'étude de la vérité : l'un, de la découvrir quand on la cherche ; l'autre, de la démontrer quand on la possède ; le dernier, de la discerner d'avec le faux quand on l'examine.

Blaise Pascal né le 19 juin 1623 à Clermont, en Auvergne

Je pense qu'à chaque époque on peut avoir une vie intéressante et utile. Ce qu'il faut c'est ne pas la gâcher et pouvoir se dire : « J'ai fait ce que j'ai pu. » C'est tout ce que l'on peut exiger de nous, et c'est aussi la seule chose capable de nous apporter un peu de bonheur.

Marie Skłodowska-Curie



Dis Cortex, tu veux faire quoi cette nuit ?

Comme chaque nuit,  
Minus ...



... **CONQUÉRIR LE MONDE**

A la petite fille idéaliste que j'étais  
et aux pauvres souris qui ont croisé mon chemin...



## Remerciements

Tout d'abord, je tiens à chaleureusement remercier les membres du jury qui m'ont fait l'honneur de lire et d'évaluer mon mémoire.

A mes rapporteurs le Pr Xavier Ayrignac, le Pr Ayikoé-Guy Mensah-Nyagan et le Dr Brahim Nait-Oumesmar, qui réalisent chacun des travaux de recherche de haut niveau sur : la caractérisation de critères diagnostiques et l'identification de biomarqueurs des pathologies neurologiques de la substance blanche pour le premier ; la neuroprotection et le développement de stratégies thérapeutiques contre les maladies neurologiques (neuropathies chimioinduites et sclérose en plaques) et neurodégénératives (maladie d'Alzheimer) pour le second ; et les anomalies de formation de la gaine de myéline et des mécanismes de remyélinisation dans la sclérose en plaques et certaines pathologies psychiatriques pour le dernier. Merci de m'accorder une partie de votre temps précieux et de me faire profiter de votre expérience et de vos connaissances sur les pathologies de la substance blanche. Je suis sûre que mon projet de recherche s'enrichira de tous les commentaires et critiques que vous réaliserez sur ce manuscrit, et espère que mon travail sera à la hauteur du temps que vous m'avez accordé.

A Laurence un immense merci d'avoir accepté d'être la responsable tutélaire de ce mémoire d'HDR mais surtout pour m'avoir fait confiance lors de mon recrutement comme maître de conférences dans ton équipe. Travailler à tes côtés est toujours un plaisir ; les repas de midi que l'on arrive à prendre ensemble lorsque nos emplois du temps ne sont pas complètement incompatibles ou les petits SMS envoyés pendant les réunions permettent de prendre du recul sur des situations professionnelles pas toujours simples.

A mes encadrantes de thèse et de post-doctorat le Dr Marie-Françoise Suaud-Chagny et le Pr Odile Boespflug-Tanguy dont la présence à cette soutenance d'HDR me paraissait une évidence tant c'est sous leur influence et grâce à leurs conseils que je suis devenue la chercheuse que je suis aujourd'hui. Merci infiniment d'avoir accepté mon invitation.

Maifa, devenue à mon tour encadrante de thèse je retrouve souvent dans les conseils que je donne aux étudiants des mots que j'ai entendu de ta bouche il y a maintenant plusieurs années (ne les comptons pas). Je pense également très souvent à toi (en fait chaque fois que je fais une démonstration à un étudiant d'une manipulation sur des petits objets) m'expliquant comment faire des électrodes d'électrochimie en ôtant puis remettant tes lunettes et pestant que la vue ne s'arrange pas avec l'âge. J'ai dorénavant les mêmes soucis et je compatis bien plus que ne le faisait alors la jeune étudiante en thèse à la vue parfaite.

Odile, nos longues discussions sur les pathologies neurologiques mais aussi le sens de la vie sont toujours un immense plaisir. J'espère que nous aurons l'occasion de les poursuivre dans les années à venir, même lorsque vous vous serez définitivement installée dans le sud.

Mes sincères remerciements également à mes trois étudiantes en thèse Bérengère Petit, Amélie Démosthènes et Maha Mabrouk qui ont réalisé une grande partie des travaux présentés dans ce manuscrit. Ce fût un plaisir de vous encadrer, de vous épauler pendant ce long chemin semé d'embûches qu'est le doctorat. J'espère que vous garderez de moi un aussi bon souvenir que celui que je garderai de vous et je vous souhaite une belle vie professionnelle et une heureuse vie familiale.

Une pensée également à toutes les personnes avec qui j'ai pu travailler dans les différentes équipes de recherche. Faire de vous ici une liste exhaustive s'avère être une mission perdue d'avance. Ce sera donc collectivement que je vous remercierai pour le soutien aux expérimentations et les bons moments passés aux pauses déjeuner ou lors des congrès. Certains d'entre vous sont devenus des amis très chers (et je ne peux ne pas citer ici mon B ou ma Cath) que je remercie également pour tous les excellents moments (et ils sont nombreux !) passés hors du cadre professionnel.

Enfin, je tiens à adresser un immense merci à ma famille, soutien indéfectible à tous mes projets professionnels.

A Denis, promis normalement c'était le dernier mémoire à rédiger !

A mes Gremlins d'amour, Calixte et Rubens. Vous êtes ma plus grande fierté et je tiens à m'excuser de vous avoir un peu délaissés ces dernières semaines, j'avais l'esprit un peu trop accaparé par ce manuscrit. Je vous promets de me rattraper en partageant avec vous tous ces moments que nous chérissons : lectures d'histoires dans le lit le soir, spectacles de musique ou de théâtre, apéros avec les copains et bien sûr découvertes de nouvelles villes et de nouveaux paysages. Je vous aime.

A ma très chère maman.

## Table des matières

1. Curriculum vitae .....	
1.1. Etat civil.....	1
1.2. Parcours scientifique .....	1
1.3. Diplômes universitaires .....	1
1.4. Honneurs et récompenses.....	2
1.5. Titres et travaux pendant le doctorat.....	2
1.6. Titres et travaux pendant le post-doctorat .....	2
1.6.1. Publications dans des revues avec comités de lecture.....	2
1.6.2. Publications dans des actes de congrès avec comité de lecture .....	3
1.7. Titres et travaux depuis le recrutement .....	4
1.7.1. Publications dans des revues avec comités de lecture.....	4
1.7.2. Publications dans des actes de congrès avec comité de lecture .....	4
1.8. Financement et contrat de recherche .....	5
1.8.1. Coordinateur .....	5
1.8.2. Participante .....	5
1.9. Participations à des congrès scientifiques, séminaires .....	5
1.9.1. Présentations orales .....	5
1.9.2. Présentations affichées.....	6
2. Enseignement, encadrement et diffusion de la culture scientifique .....	
2.1. Enseignement .....	7
2.1.1. Présentation chronologique de mon activité d'enseignement .....	7
2.1.2. Thématiques enseignées .....	9
2.1.3. Responsabilités pédagogiques.....	9
2.1.4. Pratiques pédagogiques.....	10
2.2. Encadrement d'étudiants et de personnels techniques.....	12
2.2.1. Etudiants .....	12
2.2.2. Personnels techniques .....	13
2.3. Diffusion de la culture scientifique .....	14
3. Responsabilités collectives et administratives .....	

3.1. Responsabilités collectives .....	15
3.1.1. Informations des lycéens aux filières universitaires .....	15
3.1.2. Expertises .....	15
3.1.3. Activités éditoriales.....	15
3.1.4. Sociétés savantes et associations .....	15
3.1.5. Responsabilités au sein des structures scientifiques de l'UCA.....	15
4. Activités de recherche pendant la thèse.....	
4.1. Contexte scientifique.....	17
4.1.1. Hypothèses étiologiques de la schizophrénie.....	17
4.1.2. Prise en charge thérapeutique de la schizophrénie .....	20
4.2. Principaux résultats .....	22
4.2.1. La lésion néonatale de l'hippocampe ventral chez le rat ou rat Lipska.....	22
4.2.2. La souris déficiente pour la protéine STOP (STOP-/-). .....	23
4.3. Conclusion.....	28
5. Activités de recherche pendant le post-doctorat .....	
5.1. Contexte scientifique.....	31
5.1.1. La myéline du système nerveux central.....	31
5.1.2. Les PLPpathies, un continuum clinique d'atteintes de la substance blanche associées à des anomalies du gène PLP1.....	37
5.1.3. Les modèles animaux de PLPpathies .....	40
5.2. Principaux résultats .....	40
5.2.1. Développement de stratégies thérapeutiques pour les PLPpathies .....	41
5.2.2. Améliorer la compréhension de la physiopathologie des PLPpathies.....	48
5.3. Conclusion.....	55
6. Activités de recherche depuis le recrutement comme maître de conférences.....	
6.1. Contexte scientifique.....	57
6.1.1. Brève introduction sur la sclérose en plaques.....	57
6.1.2. Prise en charge thérapeutique de la sclérose en plaques .....	65
6.1.3. Le stress oxydant comme facteur aggravant de la sclérose en plaques.....	66
6.1.4. Les modèles animaux de scléroses en plaques.....	71
6.2. Principaux résultats .....	75
6.2.1. Développement des modèles animaux et évaluation des troubles sensitifs .....	75

6.2.2. Evaluation de l'effet d'un cocktail antioxydants chez les souris présentant une invalidation du gène codant les protéolipoprotéines.....	76
6.2.3. Evaluation de l'effet antalgique du fingolimod dans le modèle d'encéphalomyélite auto-immune expérimentale récurrente-rémittente .....	77
6.2.4. Evaluation de l'effet de la lériglitazone chez les souris présentant une invalidation du gène codant les protéolipoprotéines.....	80
6.2.5. Evaluation de l'effet de l'extrait de pépin de raisin dans un modèle d'encéphalomyélite auto-immune expérimentale .....	82
7. Projets de recherche .....	
7.1. Développement de l'extrait de pépin de raisin en tant que stratégie thérapeutique pour les patients atteints de sclérose en plaques .....	87
7.1.1. Poursuite de la caractérisation de l'effet de l'extrait de pépin de raisin.....	87
7.1.2. Développement de nouvelles formulations .....	91
7.2. Rôle des protéolipoprotéines dans le développement des troubles sensitifs.....	96
8. Conclusion générale .....	
8.1. De la difficulté à mener à bien toutes les tâches incombant au statut d'enseignant-chercheur .....	99
8.2. Réflexions sur l'utilisation du modèle animal dans la recherche biomédicale .....	100
8.2.1. Analyse générale.....	100
8.2.2. Analyse spécifique aux modèles animaux de sclérose en plaques.....	101
8.3. Le changement multiple de thématiques de recherche : un mal pour un bien .....	103
9. Références bibliographiques .....	
9.1. Activités de recherche pendant la thèse .....	105
9.2. Activités de recherche pendant le post-doctorat.....	107
9.3. Activités de recherche depuis le recrutement comme maitre de conférences .....	112
9.4. Projets de recherche.....	116
9.5. Conclusion générale .....	119



## Liste des abréviations

**Ag** : Antigène

**ANR PRCI** : Appel à projet générique l'agence nationale pour la recherche, demande de projet de recherche collaboratif – International

**ADN** : Acide désoxyribonucléique

**ADNc** : Acide désoxyribonucléique complémentaire

**AEPFP** : Association des Enseignants de Pharmacologie des Facultés de Pharmacie

**ARNm** : Acide ribonucléique messenger

**APC** : Approche par compétence

**ASPRA** : Association pour le soutien de la pharmacologie en Région Auvergne

**ATER** : Attaché temporaire d'enseignement et de recherche

**ATP** : Adénosine triphosphate

**BHE** : Barrière hématoencéphalique

**CC** : Contrôle continu

**COMT** : Catéchol-O-méthyltransférase

**CFA** : Adjuvant complet de Freund

**CICS** : Centre d'imagerie cellulaire de l'Université Clermont Auvergne

**CIDPharmEF** : Conférence Internationale des Doyens des facultés de PHARMacie d'Expression Française

**5-HT** : sérotonine

**CGRP** : peptide relié au gène calcitonine

**CM** : cours magistraux

**CNPase** : 2',3'-cyclic nucléotide 3'-phosphodiesterase

**CPA** : Cellule présentatrice d'antigène

**DISC1** : Disrupted in schizophrenia 1

**DA** : dopamine

**DU** : Diplôme universitaire

**EAE** : Encéphalomyélite auto-immune expérimentale

**EAE-CP** : EAE chronique avec une poussée

**EAE-RR** : EAE récurrente-rémittente

**EBV** : Virus Epstein-Barr

**EFSA** : Autorité européenne de sécurité des aliments pour European Food Safety Authority en anglais

**EGFP** : protéine fluorescente verte ou enhance green fluorescent protein en anglais

**FDA** : Food and Drug Administration

**Fondation ARSEP** : Fondation pour l'aide à la recherche sur la sclérose en plaques

**FTH1/Fer1HCN** : sous-unité lourde de la protéine de liaison au fer ferritine de type 1

**GFAP** : Protéine acide fibrillaire gliale

**GM-CSF** : Facteur stimulant les colonies de granulocytes et de macrophages

**GPx** : Glutathion peroxydase

**GSE** : Extrait de pépins de raisins pour grape seed extract en anglais

**ELA** : Association européenne contre les leucodystrophies

**HLA** : Antigène des leucocytes humain

**IASP** : Association internationale pour l'étude de la douleur ou international association for the study of pain en anglais

**IBA1** : Protéine adaptatrice 1 de liaison au calcium ionisé

**IL** : Interleukine

**INF- $\gamma$**  : Interféron- $\gamma$

**INSERM** : Institut national de la santé et de la recherche médicale **i.p.** : intrapéritonéale

**IRM** : Imagerie par résonance magnétique

**L<sub>T</sub>** : Lymphocyte T

**MAG** : glycoprotéine associée à la myéline ou myelin-associated glycoprotein en anglais

**MAP** : protéines associées aux microtubules

**MAP6** : protéine associée aux microtubules de type 6 également appelée protéine STOP pour stable tubulin only polypeptide en anglais.

**MCF** : Maître de conférences

**MBP** : Protéine basique de la myéline

**MCT** : transporteurs de monocarboxylate

**MIP** : Polymères à empreintes moléculaires pour molecularly imprinted polymers en anglais

**MOBP** : protéine basique des oligodendrocytes associée à la myéline ou myelin-associated oligodendrocytic basic protein en anglais

**MOG** : Glycoprotéine oligodendrocytaire de la myéline

**MOG 35-55** : Peptide constitué des acides aminés 35-55 de la glycoprotéine oligodendrocytaire de la myéline

**MPZ** : protéine zéro de la myéline ou myelin protein zero en anglais

**NAD** : Nicotinamide adénine dinucléotide

**NADPH** : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

**NMDA** : N-méthyl-D-aspartate

**NOX** : NADPH oxydase transmembranaire

**Nrf2** : Facteur nucléaire 2 similaire au dérivé d'érythroïde 2 pour nuclear factor erythroid-2-related factor 2 en anglais

**OPCs** : Progéniteurs oligodendrocytaires

**PARP 1** : Poly (ADN-ribose) polymérase 1

**PGC-1 $\alpha$**  : PPAR $\gamma$  coactivateur 1 alpha

**PLP** : Protéolipoprotéines de myéline, PLP et son isoforme DM20

**PLP1** : Gène codant les protéolipoprotéines de myéline

**PLPpathies** : *continuum* clinique de pathologies hypomyélinisantes ayant pour origine une anomalie génétique touchant le gène codant les protéolipoprotéines de myéline *PLP1*

**PMD** : Maladie de Pelizaeus-Merzbacher

**PPAR $\gamma$**  : Récepteur gamma activé par les proliférateurs de peroxydases

**PTX** : Toxine pertussique

**RNCP** : répertoire national des certifications professionnelles

**RNS** : Espèces réactives de l'azote pour reactive nitrogen species en anglais

**ROS** : Espèces réactives de l'oxygène pour reactive oxygen species en anglais

**SAÉ** : situations d'apprentissage et d'évaluation

**SEP** : Sclérose en plaques

**SEP-PP** : Sclérose en plaques progressive primaire

**SEP-RR** : Sclérose en plaques récurrente-rémittente

**SEP-SP** : Sclérose en plaques secondaire progressive

**SFETD** : Société française d'étude et de traitement de la douleur

**SFPT** : Société française de pharmacologie et de thérapeutique

**SNC** : Système nerveux central

**SNP** : Système nerveux périphérique

**SOD** : Superoxyde dismutase

**Souris PLP $^{-/-}$  ou Plp null** : souris présentant une invalidation du gène codant les protéolipoprotéines de myéline *PLP1*

**Souris +PlpTg** : souris surexprimant le gène codant les protéolipoprotéines de myéline, dans notre cas la lignée <sup>#56/56</sup> exprimant 14 copies supplémentaire du gène à l'état homozygote.

**Souris STOP $^{-/-}$**  : souris présentant une invalidation du gène codant la protéine MAP6 également appelée protéine STOP

**SPG2** : Paraplégie spastique de type 2

**STOP** : autre nom de la protéine associée aux microtubules 6 (MAP6), pour stable tubulin only polypeptide en anglais

**S1PR1** : Récepteurs à la sphingosine 1-phosphate de type 1

**TD** : Travaux dirigés

**TGF- $\beta$**  : Facteur de croissance transformant  $\beta$

**Th1** : Lymphocyte T helper 1

**Th17** : Lymphocyte T helper 17

**TP** : Travaux pratiques

**TNF $\alpha$**  : Facteur de nécrose tumoral  $\alpha$

**Treg** : Lymphocyte T régulateur

**TSPO** : protéine translocatrice de 18 kDa

**UMR** : Unité de recherche mixte

**UPR** : réponse aux protéines non repliées ou Unfolded Protein Response en anglais

**VDAC** : canal anionique voltage-dépendant

**WT** : Fond sauvage ou wild type en anglais

## Liste des figures

Figure 1 : Schéma récapitulatif de l'hypothèse neurodéveloppementale de la schizophrénie prenant en compte les facteurs de risques et les processus physiologiques altérés ainsi que l'évolution de la symptomatologie .....	19
Figure 2 : Représentation schématique des cibles pharmacologiques des neuroleptiques .....	22
Figure 3 : Suppression de la protéine associée aux microtubules (MAP6 ou STOP) chez la souris (souris STOP-/-) .....	23
Figure 4 : Relation entre l'efflux de dopamine (DA) et les stimulations électriques dans le noyau accumbens (NAcc) et le striatum de souris invalidées pour la protéine associée aux microtubules 6 (STOP -/-) et contrôles (WT).....	25
Figure 5 : Apparition post-pubertaire de troubles comportementaux chez les souris STOP -/-.....	26
Figure 6 : Test de reconnaissance sociale chez des souris STOP -/- et leurs contrôles (WT) avec ou sans traitement long-terme par des neuroleptiques (NL) .....	27
Figure 7 : La vitesse de conduction nerveuse dépend du type d'engainement et du diamètre de l'axone .....	31
Figure 8 : Représentation schématique de la myélinisation dans le système nerveux central .....	32
Figure 9 : Représentation des fonctions de la gaine de myéline autres que la conduction saltatoire de l'influx nerveux .....	33
Figure 10 : Illustration schématique de la structure de la gaine de myéline. ....	35
Figure 11 : Etapes de production de la protéolipoprotéine PLP de l'ARNm à la protéine transmembranaire fonctionnelle .....	36
Figure 12 : Classification clinique des PLPopathies .....	38
Figure 13 : Répartition des mutations ponctuelles sur le gène PLP1 et représentation schématique de la sévérité du phénotype clinique provoqué .....	39
Figure 14 : Cartes et quantifications d'ADC//, ADC <sub>1</sub> et T2 obtenues en imagerie de diffusion au niveau de la moelle épinière cervicale (C4) des souris WT et +Plp1Tg.....	42
Figure 15. Etude histologique de la substance grise de la moelle épinière cervicale des souris sauvages (WT) et surexprimant Plp1 (+Plp1Tg) .....	43
Figure 16 : Mécanisme d'action potentiel de l'olésoxime sur l'homéostasie calcique.....	45
Figure 17 : L'olésoxime n'a pas d'effet sur la survie ni les déficits moteurs des souris surexprimant PLP. ....	45
Figure 18 : L'Olésoxime favorise la myélinisation durant le développement précoce (souris âgées de 2 semaines) mais perd cet effet promyélinisant chez les souris surexprimant PLP (+Plp1Tg) âgées de 4 semaines.....	47

Figure 19. Evaluation de la sensibilité thermique des souris sauvages (WT) et présentant une invalidation du gène <i>Plp1</i> ( <i>Plp null</i> ).....	48
Figure 20 : Latence d'apparition des ondes N1 et N2 lors de l'enregistrement des potentiels évoqués somatosensoriels spinaux chez les souris sauvages (WT) et présentant une invalidation du gène <i>Plp1</i> ( <i>Plp null</i> ) âgées de 3 et 15 mois.....	49
Figure 21 : Analyse neuropathologique de la substance blanche de la moelle épinière cervicale de souris sauvages (WT) et surexprimant le gène <i>Plp1</i> (+ <i>PlpTg</i> ) âgées de 6 semaines .....	51
Figure 22 : Analyse neuroathologique de la substance blanche de la moelle épinière cervicale de souris sauvages (WT) et surexprimant le gène <i>Plp1</i> (+ <i>PlpTg</i> ) âgées de 6 semaines.....	52
Figure 23 : Analyse par le test de l'open-field du comportement des souris contrôles et modèles de mères transmettrices de PLPpathies.....	54
Figure 24 : Analyse par le test du labyrinthe en Y de la mémoire de travail des souris contrôles et modèles de mères transmettrices de PLPpathies .....	54
Figure 25 : Représentation schématique des grandes étapes physiopathologiques mises en jeu dans le développement de la sclérose en plaques .....	59
Figure 26 : Représentation schématique du niveau de myélinisation et des cellules associées dans les différents types de plaques retrouvées dans la sclérose en plaques .....	60
Figure 27 : Les mécanismes clés des processus à l'origine de la dégénérescence axonale.....	61
Figure 28 : Représentation schématique de l'évolution au cours du temps de la sclérose en plaques. ....	63
Figure 29 : Représentation schématique des cibles des traitements actuels de la sclérose en plaques. ....	65
Figure 30 : Gamme de concentration estimée du H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> en fonction de sa réponse cellulaire physiologique (oxidative eustress) ou pathologique (oxidative distress).....	67
Figure 31 : Conséquences des variations de concentrations d'H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> sur la physiologie axonale.....	68
Figure 32 : Réactions catalysées par les principales enzymes antioxydantes.....	69
Figure 33 : Représentation schématique des différentes sources potentielles d'espères réactives de l'oxygène et de l'azote au cours du développement de la sclérose en plaques .....	71
Figure 34 : Interactions moléculaires entre le système nerveux central, l'inflammation et la réponse immune participant aux processus lésionnels mais également de réparation lors du développement de la sclérose en plaques .....	72
Figure 35 : Représentation schématique du décours temporel des symptômes dans les différentes variantes d'encéphalomyélite auto-immunes expérimentales (EAE) induites chez la souris et utilisées pour étudier les troubles sensitifs.....	73
Figure 36 : Caractérisation comportementale du modèle d'encéphalomyélite auto-immune expérimentale récurrente-rémittente (EAE-RR) .....	75
Figure 37 : Caractérisation comportementale de l'effet du cocktail antioxydant sur les souris sauvages (WT) et présentant une invalidation du gène <i>Plp1</i> ( <i>Plp null</i> ) .....	77

Figure 38 : Effets de traitements curatifs chroniques au fingolimod chez les souris sauvages (WT) et présentant une invalidation du gène Plp1 (Plp null) ainsi que chez les souris présentant une encéphalomyélite auto-immune expérimentale récurrente-rémittente (EAE-RR) et leurs contrôles .	78
Figure 39 : Effets de l'administration aiguë de fingolimod sur la sensibilité mécanique des souris présentant une encéphalomyélite auto-immune expérimentale récurrente-rémittente (EAE-RR) et leurs contrôles.....	79
Figure 40 : Mécanismes d'action de la lériglitazone dans un modèle d'adrénoleucodystrophie liée à l'X (X-ALD).....	81
Figure 41 : Composition de la phase phénolique de l'extrait de pépin de raisin donné pour 200µL (dose quotidienne injectée à une souris).....	83
Figure 42 : Effets de l'extrait de pépin de raisin sur le score EAE et la sensibilité thermique au froid des souris présentant une encéphalomyélite auto-immune expérimentale chronique à une poussée (EAE-CP) et leurs contrôles (CTL) .....	83
Figure 43 : Effets de l'extrait de pépin de raisin sur les marqueurs du stress oxydant et l'activité de la superoxyde dismutase dans la moelle épinière des souris présentant une encéphalomyélite auto-immune expérimentale chronique à une poussée (EAE-CP) et leurs contrôles (CTL) après 10j de traitement .....	84
Figure 44 : Analyse quantitative de l'étude protéomique évaluant les effets de l'extrait de pépin de raisin dans le cerveau des souris présentant une encéphalomyélite auto-immune expérimentale chronique à une poussée (EAE-CP) et leurs contrôles (CTL) .....	89
Figure 45 : Résultats des analyses d'enrichissement selon les termes d'ontologie de gènes (processus biologiques, fonctions moléculaires, composants cellulaires et voies métaboliques et/ou signalisation) .....	91
Figure 46 : Représentation schématique du processus d'empreinte moléculaire par l'approche non covalente.....	94
Figure 47 : La neuro-inflammation induit des changements de la microglie qui sont impliqués dans la pathogénicité de la schizophrénie .....	103



## Liste des tableaux

Tableau 1 : Service d'enseignement pour l'année 2022-2023 .....	8
Tableau 2 : Evolution du volume d'enseignement sur les 6 dernières années en fonction du type de cours et des filières.....	9
Tableau 3 : Mécanismes d'action et indication des neuroleptiques ayant récemment obtenus une autorisation de mise sur le marché délivrée par la Food and Drug Administration (FDA) .....	29
Tableau 4 : Evolution du poids des souris contrôles et modèles de mères transmettrices de PLPpathies .....	53
Tableau 5 : Concentrations en composés bioactifs obtenues à partir de pépins, de peau ou de marc de raisin de variétés différentes en fonction des techniques d'extraction utilisées .....	92



# **1. Curriculum vitae**



### **1.1. Etat civil**

**Mélina BEGOU, née le 27 février 1981**

**Maitre de Conférences, Section CNU 86**

Institut national de la santé et de la recherche médicale (INSERM) 1107 - NEURO-DOL

Université Clermont Auvergne, Faculté de Pharmacie

28 Place Henri Dunant - 63001 CLERMONT-FERRAND

☎ 04 73 17 81 02

Email : [melina.begou@uca.fr](mailto:melina.begou@uca.fr)

### **1.2. Parcours scientifique**

**Depuis 2014- Maître de conférences (MCF) en Pharmacologie, INSERM 1107, Neuro-Dol "Pharmacologie Fondamentale et Clinique de la Douleur", Faculté de Pharmacie, Université Clermont Auvergne (Pr L. Terrail)**

**2013-2014 Attaché temporaire d'enseignement et de recherche (ATER), INSERM 1107, Neuro-Dol "Pharmacologie Fondamentale et Clinique de la Douleur", Faculté de Pharmacie, Université d'Auvergne (UdA), Clermont 1 (Pr L. Terrail)**

Physiopathologie des douleurs chroniques dans les pathologies de la myéline et amélioration de la pharmacologie des douleurs neuropathiques.

**2012-2013 Chercheur post-doctorant, INSERM 676, Faculté de Médecine, Université Paris Diderot - Paris 7 (Pr O. Boespflug-Tanguy)**

**2006-2012 Chercheur post-doctorant, GReD unité de recherche mixte (UMR) CNRS 6247-INSERM 931, Faculté de Médecine, Université d'Auvergne, Clermont-Ferrand, (Pr O. Boespflug-Tanguy)**

Analyse physiopathologique de souris transgéniques modélisant des leucodystrophies dysmyélinisantes et développement de stratégies thérapeutiques.

**2003-2006 Doctorat d'Université, Laboratoire de Neuropharmacologie et Neurochimie, Faculté de Pharmacie, Université Claude Bernard Lyon 1 (Pr. B. Renaud et Dr M.F. Suaud-Chagny)**

La souris KO STOP : validation d'un modèle pour étudier la physiopathologie de la schizophrénie et développer de nouvelles stratégies thérapeutiques.

### **1.3. Diplômes universitaires**

2013 Diplôme universitaire (DU) "Enseigner dans le supérieur", Université Blaise Pascal, Clermont 2

2007 Initiation à la chirurgie expérimentale, Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon - INSERM

**2003-2006 Doctorat d'Université, spécialité Neurosciences (mention très honorable), Université Claude Bernard Lyon 1**

2005 DU Modèles animaux pour la recherche biologique et médicale et technologie d'animalerie, Ecole Nationale Supérieure de Lyon (Formation à l'expérimentation animale niveau I), Université Claude Bernard Lyon 1

**2005 Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie (mention très honorable), Faculté de Pharmacie de Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1**

2003 DEA de Neurosciences (mention bien), Université Claude Bernard Lyon 1

#### **1.4. Honneurs et récompenses**

2003 Allocation de recherche du Ministère de l'Éducation Nationale, de la Recherche et de la Technologie (Bourse MENRT)

#### **1.5. Titres et travaux pendant le doctorat**

##### **Publications dans des revues avec comités de lecture**

Brun P, **Bégou M**, Andrieux A, Mouly-Badina L, Clerget M, Schweitzer A, Scarna H, Renaud B, Job D, Suaud-Chagny MF. Dopaminergic transmission in STOP null mice. *J Neurochem*. 2005; 94(1): 63-73.

Andrieux A, Salin P, Schweitzer A, **Bégou M**, Pachoud B, Brun P, Gory-Fauré S, Kujala P, Suaud-Chagny MF, Höfle G, Job D. Microtubule stabilizer ameliorates synaptic function and behavior in a mouse model for schizophrenia. *Biol Psychiatry*. 2006; 60(11):1224-30.

**Bégou M**, Brun P, Bertrand JB, Job D, Schweitzer A, D'Amato T, Saoud M, Andrieux A, Suaud-Chagny MF. Post-pubertal emergence of alterations in locomotor activity in stop null mice. *Synapse*. 2007; 61(9):689-97.

**Bégou M**, Volle J, Bertrand JB, Brun P, Job D, Schweitzer A, Saoud M, D'Amato T, Andrieux A, Suaud-Chagny MF. The stop null mice model for schizophrenia displays cognitive and social deficits partly alleviated by neuroleptics. *Neuroscience*. 2008; 157(1):29-39

Bertrand JB, Langlois JB, **Bégou M**, Volle J, Brun P, d'Amato T, Saoud M, Suaud-Chagny MF: Longitudinal MRI monitoring of brain damage in the neonatal ventral hippocampal lesion rat model of schizophrenia. *Hippocampus*. 2010 Feb;20(2):264-78.

#### **1.6. Titres et travaux pendant le post-doctorat**

##### **1.6.1. Publications dans des revues avec comités de lecture**

Ben Hassen W, **Bégou M**, Traore A, Moussa AB, Boehm N, Ghandour MS, Renou JP, Boespflug-Tanguy O, Bonny JM. Characterisation of spinal cord in a mouse model of spastic paraplegia related to abnormal axono-myelin interactions by in vivo quantitative MRI. *Neuroimage*. 2009; 46(1):1-9.

Boespflug-Tanguy O, Aubourg P, Dorboz I, **Bégou M**, Giraud G, Sarret C, Vours-Barrière C. Neurodegenerative disorder related to AIMP1/p43 mutation is not a PMLD. *Am J Hum Genet*. 2011; 88(3):392-3; author reply 393-5.

Petit B<sup>1</sup>, Giraudet F, Béchon C, Bardin L, Avan O, Boespflug-Tanguy O, **Bégou M**. Mice with a deletion of the major central myelin protein exhibit hypersensitivity to noxious thermal stimuli: involvement of central sensitization. *Neurobiology of Disease, Neurobiol Dis*. 2014 May;65:55-68..

Ruiz M, **Bégou M**, Launay N, Ranea-Robles P, Bianchi P, López-Erauskin J, Morató. L, Guilera C, Petit B, Vours-Barrière C, Guéret-Gonthier C, Bonnet-Dupeyron MN, Fourcade S, Auwerx J, Boespflug-Tanguy O, Pujol A. Oxidative stress and mitochondrial dynamics malfunction are linked in Pelizaeus-Merzbacher disease. *Brain Pathol*. 2018 Sep;28(5):611-630.

---

<sup>1</sup> Les auteurs dont les noms sont soulignés sont les étudiants dont j'ai co-encadré la thèse de sciences.

Khalaf G, Mattern C, **Bégou M**, Boespflug-Tanguy O, Massaad C, Massaad-Massade L. Mutation of Proteolipid Protein 1 Gene: From Severe Hypomyelinating Leukodystrophy to Inherited Spastic Paraplegia. *Biomedicines*. 2022;10(7):1709. doi:10.3390/biomedicines 10071709

### **1.6.2. Publications dans des actes de congrès avec comité de lecture**

Depiets B; Giraudet F; Boespflug-Tanguy O; **Bégou M**. Cognitive and sensitive impairments in the proteolipoprotein dysmyelinating mice. 9th European meeting on glial cells in health and disease, Paris, September 2009. In *Glia* 2009, 57(S13) pS44.

Giraudet F, **Bégou M**, Avan P, Boespflug-Tanguy O. Electrophysiological and auditory evaluation in transgenic mouse models of X-linked disorders of myelination due to proteolipid proteins mutation (PMD and SPG2). 9th European meeting on glial cells in health and disease, Paris, September 2009. In *Glia* 2009, 57(S13) pS95.

**Bégou M**, Gonthier C, Giraudet F, Depiets B, Vaurs-Barrière C, Boespflug-Tanguy O. Morpholino antisens oligonucleotide delivery to oligodendrocytes. 9th European meeting on glial cells in health and disease, Paris, September 2009. In *Glia* 2009, 57(S13) pS120.

Ruiz M, **Bégou M**, Guilera C, Eckhardt M, Galino J, Gieselmann V, Boespflug-Tanguy O, Pujol A. Oxidative damage and redox proteomics in metachromatic leukodystrophy and Pelizaeus Merzbacher disease. 9th European meeting on glial cells in health and disease, Paris, September 2009. In *Glia* 2009, 57(S13) pS98.

Sarret C, Werner HB, **Bégou M**, Boespflug-Tanguy O, Nave KA, Vaurs-Barrière B. A “humanized” mouse model for the PLP1 gene. 9th European meeting on glial cells in health and disease, Paris, September 2009. In *Glia* 2009, 57(S13) pS37.

**Bégou M**, Depiets B, Diot C, Giraudet F, Vaurs-Barrière, Boespflug-Tanguy O. The mice overexpressing the major central nervous system myelin protein: new data from an old model. 10th European meeting on glial cells in health and disease, Prague, Czech Republic, September 2011. In *Glia* 2011, 59(S1) pS58.

Depiets B, Diot C, Giraudet F, Vaurs-Barrière, Boespflug-Tanguy O, **Bégou M**. Deletion of the major protein of central nervous system myelin lead to mild impairment associated with cognitive and sensitive dysfunctions. 10th European meeting on glial cells in health and disease, Prague, Czech Republic, September 2011. In *Glia* 2011, 59(S1) pS59-S60.

**Bégou M**, Depiets B, Giraudet F, Barbier J, Béchon C, Michaud M, Pruss R, Bordet T, Boespflug-Tanguy O. Olesoxime for the treatment of hereditary dysmyelinating diseases: The importance of the therapeutic window. 11th European meeting on glial cells in health and disease, Berlin, Germany, July 2013. In *Glia* 2013, 61(S1) pS64-S64.

Bark AER, R. Abdel Rassoul R, Huyghe A, Bonheur J, **Bégou M**, Boespflug-Tanguy O. Conditional inactivation of the eif2b5 gene in radial glial cell or oligodendrocyte cell lineages in mice: models for studying the CACH/VWM syndrome. 13th European meeting on glial cells in health and disease, Edinburgh, United Kingdom, July 2017. In *Glia* 2017, 65(S1) pE294-E295.

## **1.7. Titres et travaux depuis le recrutement**

### **1.7.1. Publications dans des revues avec comités de lecture**

Bouchenaki H, **Bégou M**, Magy L, Hajj R, Demiot C. Les traitements pharmacologiques des douleurs neuropathiques [Pharmacological management of neuropathic pain]. *Thérapie*. 2019 Dec;74(6):633-643.

Sion B, **Bégou M**. Can chronopharmacology improve the therapeutic management of neurological diseases? *Fundam Clin Pharmacol*. 2021 Jun;35(3):564-581.

Démsthènes A, Sion B, Giraudet F, Moisset X, Daulhac L, Eschalièr A, **Bégou M**. In-Depth Characterization of Somatic and Orofacial Sensitive Dysfunctions and Interfering-Symptoms in a Relapsing-Remitting Experimental Autoimmune Encephalomyelitis Mouse Model. *Front Neurol*. 2022 Jan 17;12:789432. doi: 10.3389/fneur.2021.789432.

Mabrouk M, Démsthènes A, Elayed M, Aissouni Y, Aouani E, Daulhac-Terrail L, Mokni M, **Bégou M**. The antioxidant effect of grape seed extract (GSE) corrects experimental autoimmune encephalomyelitis behavioural dysfunctions, demyelination and glial activation. *Frontiers in Immunology*. 2022; 13:960355. doi: 10.3389/fimmu.2022.960355

### **1.7.2. Publications dans des actes de congrès avec comité de lecture**

Picard E, Carvalho FA, **Bégou M**, Mallet C, Daulhac-Terrail L. T-Type calcium channel involvement in abdominal pain associated to the irritable bowel syndrome. 20th Annual Meeting of French Society of Pharmacology and Therapeutics, Nancy, France, 19–21 April 2016. In *Fundamental and Clinical Pharmacology*, 2016, 30 (Suppl. S1), p32.

Démsthènes A, Daulhac-Terrail L, Eschalièr A, **Bégou M**. Antinociceptive effects of a chronic fingolimod treatment in an optimized recurrent-remittent experimental autoimmune encephalomyelitis mouse model of multiple. 7th Joint European and American committee for treatment and research in multiple sclerosis (ECTRIMS – ACTRIMS) Meeting, Paris, France, October 2017. In *Multiple Sclerosis Journal* 2017; 23: (S3) 769–770.

Démsthènes A, Daulhac-Terrail L, Eschalièr A, **Bégou M**. Different antinociceptive effect of fingolimod in two mouse models of multiple sclerosis with neuropathic pain. 22th Annual Meeting of French Society of Pharmacology and Therapeutics, Toulouse, France, 12–14 June 2018. In *Fundamental and Clinical Pharmacology*, 2018, 32 (Suppl. S1), p7.

Mabrouk M, Démsthènes A, Elayed M, Elkahoui S, Aouani E, Daulhac-Terrail L, Mokni M, **Bégou M**. Effect of *Vitis vinifera* grape seed extract on motor and sensitive behaviours in an experimental autoimmune encephalomyelitis mouse model. SFPT virtual congress 2021. In *Fundamental and Clinical Pharmacology*, 2021, 35, pp.193-194

Mabrouk M, Aouani E, El Ayed M, Mokni M, Aissouni Y, Terrail L, **Bégou M**. Effect of *Vitis Vinifera* Grape Seed Extract on brain and spinal cord demyelination and oxidative stress parameters in an experimental autoimmune encephalomyelitis mouse model. 15th European meeting on glial cells in health and disease, Marseille (e-congress). In *Glia*, 2021, 69, pp.E213-E214

## **1.8. Financement et contrat de recherche**

### **1.8.1. Coordinateur**

2014-2017	Fondation ARSEP	PI Alain ESCHALIER, CoPI Mélina BEGOU	Montant : 48 900€
	Titre du projet : Douleur neuropathique dans deux modèles murins de sclérose en plaques – Implication du stress oxydant dans la dégénérescence axonale et effet d'un traitement à long terme par les antioxydants ;		
2016-2018	Contrat de collaboration société Minoryx	PI Mélina BEGOU	Montant : 41 000€
	Titre du projet : Evaluation de la molécule MIN-102 dans un modèle murin de paraplégie spastique – Evaluation comportementale ;		
2018-2020	Contrat de collaboration société Minoryx	PI Mélina BEGOU	Montant : 13 000€
	Titre du projet : Evaluation de la molécule MIN-102 dans un modèle murin de paraplégie spastique – Evaluation moléculaire ;		
2020-2022	PHC UTIQUE Code CMCU : 20G080	PI Mélina BEGOU	Montant : 20 850€
	Titre du projet : Evaluation de l'effet correcteur d'un extrait polyphénolique de pépins de raisin dans un modèle murin de sclérose en plaques, l'encéphalomyélite auto-immune expérimentale ;		
2020-2022	Wide Open to the World CAP20-25 UCA	PI Mélina BEGOU	Montant : 5 000€
	« Soutien à la mobilité au sein des Thèses en Cotutelle Internationale »		
2020-2022	Contrat de collaboration société Minoryx	PI Mélina BEGOU	Montant : 20 000€
	Titre du projet : Evaluation de la molécule MIN-102 dans un modèle murin de paraplégie spastique – Evaluation immunohistologique ;		
2021-2024	Pack Ambition International Région AURA	PI Mélina BEGOU	Montant : 60 000€
	dont 6 mois de CDD technicien Titre du projet : Evaluation dans un modèle de sclérose en plaques de nouvelles formulations d'extrait de pépin de raisin, preuve de concept avant application clinique		

### **1.8.2. Participante**

2008-2010	Neurodis Foundation	PI Odile BOESPFLUG-TANGUY	Montant : 84 000€
	Titre du projet : THERAPEUTIC CHALLENGE IN LEUKODYSTROPHIES - Translational and ethical research Implication personnelle : chercheur post-doctorant		
2010-2013	EUROPEAN COMMISSION - FP7	PI Odile BOESPFLUG-TANGUY	Montant : 708 000€
	Titre du projet : LEUKOTREAT- Therapeutic challenge in leukodystrophies: translational and ethical research towards clinical trials Implication personnelle : chercheur post-doctorant		

## **1.9. Participations à des congrès scientifiques, séminaires**

### **1.9.1. Présentations orales**

**Bégou M**, Giraudet F, Vours-Barrière C, Boespflug-Tanguy O: PLP null and overexpressing mice, the case of impaired males and their “mothers” – Relation with human pathology. Third annual

Minisymposium of German groups working on Cell Biology and Pathology of Myelinating Glia. Lab of Pr Klaus NAVE, Max Planck Institute of Experimental Medicine, Department of Neurogenetics, Goettingen, Germany. February 2009.

**Bégou M**, Giraudet F, Gonthier C, Vours-Barrière C, Boespflug-Tanguy O: Silencing PLP with morpholino. Third annual Minisymposium of German groups working on Cell Biology and Pathology of Myelinating Glia. Lab of Pr Klaus NAVE, Max Planck Institute of Experimental Medicine, Department of Neurogenetics, Goettingen, Germany. February 2009.

**Bégou M**, Giraudet F, Vours-Barrière C, Boespflug-Tanguy O: Cognitive impairment in Pelizaeus-Merzbacher disease. 2nd ELA Research Foundation Congress, Luxembourg, June 2009.

**Bégou M**, Depiets B, Diot C, Giraudet F, Vours-Barrière C, Boespflug-Tanguy O. Physiopathological study of transgenic mice modeling human leulodystrophies and identification of novel therapeutical strategies. Labmeeting of Pr Klaus NAVE team, Max Planck Institute of Experimental Medicine, Department of Neurogenetics, Goettingen, Germany, January 2011.

Petit B, Giraudet F, Béchon C, Bardin L, Avan O, Boespflug-Tanguy O, **Bégou M**. Mice with a deletion of the major central myelin protein exhibit hypersensitivity to noxious thermal stimuli: involvement of central sensitization. Xème Symposium National du Réseau Inserm de Recherche sur la Douleur, Montpellier, France. March 2014.

**Bégou M**, Démosthènes A, Pereira B, Eschalier A, Daulhac-Terrail L. What are the strengths and limits of mouse models of fibromyalgia, a meta-analysis of the literature? XIème Symposium National du Réseau Inserm de Recherche sur la Douleur, Marseille, France. March 2017.

**Bégou M**. Can chronopharmacology improve the therapeutic management of neurological diseases? Autumn School of Translational Neuroscience, Julius-Maximilians-University of Würzburg, Germany, November 4th and 5th 2022.

### **1.9.2. Présentations affichées**

Six participations et 10 posters présentés dans des congrès nationaux et 16 participations et 30 posters présentés dans des congrès internationaux.

---

## **2. Enseignement, encadrement et diffusion de la culture scientifique**



## **2.1. Enseignement**

### **2.1.1. Présentation chronologique de mon activité d'enseignement**

J'ai commencé mon activité d'enseignement lors de mon post-doctorat au sein de l'équipe GReD UMR CNRS 6247-INSERM 931 en réalisant des vacances. J'ai tout d'abord repris en 2010 l'enseignement de Neurodéveloppement (15h de CM et 2h d'ED) dans l'UE neurodéveloppement-Neurodégénérescence en M1 Santé à l'UFR de Médecine de l'Université d'Auvergne (depuis intégré au M1 Biologie Santé, parcours Biologie Intégrative et Physiopathologies à l'UFR de Biologie). J'ai ensuite assuré, pendant 2 ans, 2h de CM de neurobiologie générale en M2 « Technologie pour la Médecine » pour le même UFR.

Lors de ma prise de poste en septembre 2013 en tant qu'ATER au laboratoire de Pharmacologie à la Faculté de Pharmacie à l'Université d'Auvergne (UdA), se sont ajoutés aux enseignements de Neurodéveloppement, les enseignements suivants :

- Enseignement de la pharmacologie des transmissions et pharmacologie thérapeutique en pharmacie : 8h de CM en DFGSP2 (2ème année), 2h de CM et 2h d'ED en DFGSP3 (3ème année), 6h d'ED en DFASP1 filière Industrie (4ème année) et 4h de TP et 3h d'ED en DFASP2 filière Industrie (5ème année) ;
- Enseignement de la pharmacologie moléculaire en M1 Sciences du Médicaments : 25h de CM et 6h d'ED ;
- Enseignement de la pharmacologie générale en N2 Sciences de la Vie Parcours Nutrition-Pharmacologie : 6h de CM et 6h d'ED ;
- Encadrement de projets tuteurés sur le thème de la prise en charge pharmacologique de différentes pathologies (choisies par les étudiants) en N3 Sciences de la Vie - Pharmacologie : 8h d'ED.

NB : les heures d'ED et de TP sont à multiplier par le nombre de groupes encadrés qui est relativement stable en pharmacie, mais qui ne cesse d'augmenter particulièrement en licence Sciences de la vie. Une description détaillée pour l'année 2022-2023 sera présentée dans le Tableau 1.

Depuis l'obtention de mon poste de MCF en 2014, je poursuis l'ensemble de ces enseignements auxquels se sont ajoutés :

- en septembre 2017 6h de CM et 4h d'ED de chronopharmacologie en N3 Sciences de la Vie - Pharmacologie
- en septembre 2018 2h de CM de pharmacologie générale en PACES (dorénavant en PASS - Parcours Accès Santé Spécifique et LAS - Licence Accès Santé depuis 2020)
- en septembre 2019 1,5h d'ED de physiopathologie en N3 Sciences de la Vie - Biologie Cellulaire et Physiologie
- en septembre 2021 16h d'ED d'UE Libre « médicaments et société » en N2 ou N3 de toutes les formations de l'UCA

Tableau 1 : Service d'enseignement pour l'année 2022-2023

NB : l'effectif en N2 Sciences de la Vie parcours Pharmaco Nutrition peut paraître élevé mais cette UE est mutualisée avec les étudiants en LAS2 Sciences de la Vie et les N2 Chimie-Biologie. De même l'effectif important dans l'UE Z457AU01 « Conception nouveaux principes actifs » en M1 Sciences du Médicament et des Produits de Santé s'explique par la mutualisation de l'UE avec les filières Santé en tant qu'UE optionnelle participant à la validation d'un niveau M1. A l'inverse, le faible effectif en DFGSP2 (2ème année des études de pharmacie) est lié à l'incapacité à remplir la promotion suite à la réforme PASS/LAS.

Année	Niveau	Diplôme	Intitulé	Type de formation	Nature	Effectifs	Volume horaire annuel
2022-2023	PASS	1 <sup>ère</sup> année des filières Médecine Maïeutique Odontologie Pharmacie	UE7 « Le médicament - De la conception à la dispensation »	Formation initiale, présentielle	Cours magistraux	600	2h
	LAS		UE7 « Le médicament - De la conception à la dispensation »		Cours magistraux	400	2h
	DFGSP2	Pharmacie	UE9-EC8 « Pharmacologie des transmissions »		Cours magistraux	76	8h
	DFGSP3		UE7 Initiation recherche et bibliographie		Travaux dirigés	20	4h
	DFASP1		UE1 EC1 « Stratégies anti-infectieuses »		Cours magistraux	100	2h
			UE4 EC2 : Dossiers thérapeutiques		Travaux dirigés	100	3
			UE Ind. spé.1 « Base recherche et développement médicaments »		Travaux dirigés	30-40	6
	DFASP2		UE Ind. LC.3 « Découverte et optimisation substance active »		Travaux dirigés	30-40	3
			Travaux pratiques		30-40	8	
	N2	Sciences de la Vie parcours Pharmaco Nutrition	UE Z227CU12 « Pharmacologie générale »		Cours magistraux	170	7
					Travaux dirigés	170	14
	N3	Sciences de la Vie parcours Pharmaco	UE 2327EU08 « Chronobiologie et chronopharmacologie animales » UE 2327EU06 « Pharmacologie de la communication intra inter-cellulaire » UE 2327FM08 « Projet tutoré »		Cours magistraux	70	6
					Travaux dirigés	70	16
					Cours magistraux	70	2
		Travaux dirigés	70		19		
		Sciences de la vie parcours Biologie Cellulaire/ Physiologie	UE Z326FU25 « Physiopathologie »		Travaux dirigés	60	3
	Licence	Transversales	UE Libre ZLGMZU14 « Médicaments et société »		Travaux dirigés	33	18
	M1	Sciences du Médicament et des Produits de Santé	UE Z457AU04 « Mise à niveau Biologie/Pharmacologie »		Cours magistraux	10-20	9
			UE Z457AU02 « Pharmacologie moléculaire »		Cours magistraux	70	16
			Travaux dirigés		12		
UE Z457AU01 « Conception nouveaux principes actifs »		Cours magistraux	150	2			
M1 Biologie-santé parcours Biologie Intégrative et Physiopathologies		UE Z452BU09 « Neurodéveloppement - neurodégénérescence »	Cours magistraux	30	15		
Travaux dirigés	1,5						

### 2.1.2. Thématiques enseignées

Les enseignements que j'assure, en grande partie sous forme de cours magistraux (CM), sont progressifs dans le domaine de la pharmacologie, depuis les aspects très moléculaires (pharmacologie générale et moléculaire) ou concernant les transmissions des différents médiateurs (pharmacologie des transmissions), jusqu'à un niveau plus intégré permettant de comprendre la pharmacologie à l'échelle des pathologies (pharmacologie thérapeutique). Pour tous ces enseignements, je réalise l'intégralité des documents pédagogiques/polycopiés de cours à destination des étudiants.

Une partie de ces enseignements s'adressent aux étudiants inscrits en 1<sup>er</sup>, 2<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> cycle des études pharmaceutiques dans le cadre de la formation commune de base ou de la filière industrie. Une seconde partie importante de mes enseignements s'adresse aux étudiants du cursus LMD, notamment les étudiants en N2 Sciences de la Vie Parcours Nutrition-Pharmacologie, en N3 Sciences de la Vie - Pharmacologie, en M1 Sciences du Médicament et M1 Biologie Santé, parcours Biologie Intégrative et Physiopathologies. Pour cette dernière formation, la thématique abordée n'est pas en rapport avec la pharmacologie mais le neurodéveloppement comme décrit précédemment.

Tableau 2 : Evolution du volume d'enseignement sur les 6 dernières années en fonction du type de cours et des filières

Année	Cours magistraux	Travaux dirigés	Travaux pratiques	Total (h ETD)
	Pharmacie Licence Master	Pharmacie Licence Master	Pharmacie Licence Master	
2017-2018	11	31	12	198
	18	31		
	43	16		
2018-2019	6	15	8	174 (Congé maternité)
	18	44		
	42	8		
2019-2020	18	15	8	202
	17	50		
	42	13.5		
2020-2021	14	15	8	218.5
	16	80		
	42	7.5		
2021-2022	14	11	8	223.5
	17	81.5		
	42	7.5		
2022-2023	14	15	8	202.5
	16	56		
	42	13,5		

### 2.1.3. Responsabilités pédagogiques

#### 2.1.3.1. Responsabilité d'UE

- Depuis 2017 : Responsable UE optionnelle « Neurodéveloppement et Neurodégénérescence » en M1 Biologie Santé (3 ECTS)
- Depuis 2017 : Responsable UE « Chronobiologie et chronopharmacologie » en N3 Sciences de la Vie - Pharmacologie (6 ECTS)
- Depuis 2018 : Responsable UE obligatoire « Pharmacologie Moléculaire » en M1 Sciences du Médicaments (4 ECTS)
- Depuis 2018 : Responsable UE Libre N3 Sciences de la Vie - Pharmacologie (3 ECTS) (il s'agit principalement d'un travail d'information et de suivi des inscriptions des étudiants + coordination avec les enseignants des autres UFR proposant des UE Libres)

- Depuis 2020 : Responsable UE9-EC8 « Pharmacologie des transmissions » en DFGSP2 (1,5 ECTS)  
Depuis 2021 : Responsable UE Libre transversale « Médicaments et Société » en N2 ou N3 de toutes les formations de l'UCA (3 ECTS)

#### 2.1.3.2. Participation à des comités de suivi de thèse et des jurys de thèse

- Comités de suivi de thèse de sciences

J'ai été membre du Comité de Suivi Individuel de thèse de Benoit BELIARD pour l'Ecole Doctorale Cerveau-Cognition-Comportement (ED3C) de Sorbonne Université le 16/06/20.

J'ai été présidente du Comité de Suivi Individuel d'Angélique BEVIA pour l'Ecole Doctorale Biologie Santé (BS) de Bretagne Loire le 07/12/2021.

J'ai également participé au comité de suivi de thèse de 2 étudiants de l'UCA (Cyril DJARI le 6 décembre 2018 et Nicolas SAROUL le 12 décembre 2019).

- Jurys de thèse de pharmacie

2019 Hélène CHABROLLES L'hépatite B : Stratégies antivirales actuelles et à venir

2015 Laura DROCTOVE Utilisation thérapeutique des toxines de serpent : Focus sur le récepteur de type 2 à la vasopressine

#### **2.1.4. Pratiques pédagogiques**

##### 2.1.4.1. Utilisation de nouveaux outils pédagogiques

- **Depuis 2018, utilisation de WOOLAP**, système de vote interactif avec le smartphone que j'utilise régulièrement afin de dynamiser certains ED et ou d'évaluer en temps réel les connaissances ou la compréhension des étudiants. Utilisation principalement pour les étudiants de Master 1 ou les dossiers thérapeutiques en DFASP1. Pour cela, j'ai suivi une formation (3h) donnée par le Pôle IPPA (Ingénierie Pédagogie et Production Audiovisuelle) de notre université.
- **Depuis mars 2020**, réalisation de nouveaux supports et de nouvelles pratiques pédagogiques, pour assurer la continuité pédagogique. La réalisation de **PowerPoint sonorisés et de capsules de cours enregistrées** a été rendue possible grâce à deux demi-journées de formation assurées par le pôle IPPA. Au cours de cette période, il a également été nécessaire de se familiariser avec l'**outil de conférence en ligne Teams** utilisé depuis septembre 2020 pour un grand nombre de nos cours.
- **A partir de septembre 2021, mise en place de l'approche par compétence (APC)**. L'UE de Chronobiologie et Chronopharmacologie a été choisie comme UE pilote pour la mise en place de l'approche par compétence pour les étudiants de N3 Sciences de la Vie - Pharmacologie. Dans le cadre de cette UE, c'est la compétence « exploitation de données à des fins d'analyse » qui est évaluée (cf page suivante). Afin de mettre en place ce programme, j'ai suivi en juin deux demi-journées de formation sur la thématique assurée par le pôle IPPA.

La pédagogie, m'a toujours paru un point primordial de l'enseignement et de la transmission des connaissances, c'est la raison pour laquelle j'ai suivi avant mon recrutement **en 2013 le DU "Enseigner dans le supérieur"** alors proposé par l'Université Blaise Pascal, Clermont 2. Depuis mon recrutement, j'ai continué à me former régulièrement et essaye d'appliquer le plus souvent possible les différents outils disponibles.

##### 2.1.4.2. Création et modification d'enseignements

**Création de l'UE de Chronobiologie et Chronopharmacologie à la rentrée 2017**, montée en collaboration pour la partie chronobiologie avec le Dr Benoît SION, MCF de Physiologie à l'UFR de

Pharmacie. Elle a pour objectif d'introduire auprès des étudiants des disciplines relativement récentes prenant en compte l'influence des rythmes biologiques et notamment du rythme circadien dans la physiologie, les pathologies et leurs prises en charge. Pour cette raison, nous avons pris le parti d'orienter l'enseignement vers de l'initiation à la recherche, plutôt que vers des cours théoriques classiques. Ainsi, cette UE comporte 14h de CM servant d'introduction à 9h de travaux dirigés (TD) et 4h de travaux pratiques (TP). Concernant la chronopharmacologie que j'enseigne, 6h de CM permettent d'introduire la démarche de prise en charge chronothérapeutique qui est ensuite mise en application lors des 2 séances d'ED de 2h. Les étudiants sont guidés dans la conception de prise en charge chronothérapeutique : lors du 1<sup>er</sup> ED, l'exemple de pathologies respiratoires est travaillé avec l'enseignant tandis que lors du 2<sup>nd</sup> ED, les étudiants travaillent par groupe de 3 ou 4 sur des documents issus d'articles traitant de pathologies qu'ils n'ont pas vues en cours de chronopharmacologie, mais qu'ils ont déjà étudiées lors de leur formation. Ce dernier travail est rédigé et noté dans le cadre du contrôle continu (CC) de l'UE. Cette structuration de l'UE a conduit à **son choix comme « UE Pilote » de mise en place de l'approche par compétence à la rentrée 2021**. Il a été convenu que la compétence évaluée serait « Exploitation de données à des fins d'analyse » du bloc de compétence n°2 décrit dans la fiche 24530 du répertoire national des certifications professionnelles (RNCP) de Licence - Sciences de la vie (<https://www.francecompetences.fr/recherche/rncp/24530/>). Dans ce nouvel objectif, **le 2<sup>ème</sup> TD de chronopharmacologie et les TP de chronobiologie ont été modifiés pour constituer des situations d'apprentissage et d'évaluation (SAÉ)** ce qui a permis (en plus de la note de CC) d'évaluer les compétences des étudiants. Après deux années de mise en place (cours au 1<sup>er</sup> semestre), il est possible de remarquer : 1) qu'il est extrêmement difficile voire impossible d'évaluer individuellement les étudiants lors d'un travail de groupe surtout lorsque l'évaluation se fait pour des groupes de TD de 40 étudiants issus d'une promotion de 150 étudiants ; 2) qu'il y a une corrélation très importante entre la note de CC et l'évaluation de la compétence puis la note ce contrôle terminal, suggérant une redondance de ces deux processus d'évaluation ce qui questionne l'intérêt de ce nouveau mode d'évaluation.

**Création d'une UE Libre « Médicaments et Société » mutualisée pour toutes les licences à la rentrée 2021** ayant pour objectif de permettre aux étudiants de discuter et de réfléchir sur la place du médicament dans notre société afin de comprendre les positions extrêmes retrouvées dans notre pays avec à la fois une immense défiance mais également une consommation très importante en comparaison à d'autres pays voisins. **Dans une 1<sup>ère</sup> partie, des conférences thématiques permettent une présentation générale du sujet d'un point de vue historique, scientifique, sociologique, économique et philosophique.** Il ne s'agit pas de faire un cours de pharmacologie mais d'échanger avec les étudiants sur la place du médicament d'en notre société en défendant successivement la position « pour » ou « contre » vis-à-vis d'une situation polémique (vaccination, mésusage, pilule contraceptive, thérapie génique). Ces conférences sont animées pour trois d'entre-elles par moi-même, et trois autres conférences sont proposées par des enseignants spécialistes des thématiques évoquées. **Elles visent à préparer les ateliers d'argumentation (2<sup>ème</sup> partie de l'UE) au cours desquels deux groupes d'étudiants présentent puis échangent sur des sujets fixés en début d'UE en concertation avec les étudiants (position « pour » ou « contre »).** Il est bien entendu qu'il n'y a pas forcément de bonnes positions, que les étudiants ne choisissent pas leurs positions en fonction de leurs croyances personnelles, que le but de l'exercice n'est pas de convaincre ses camarades mais d'être capable en groupe de se renseigner sur une thématique, de préparer un argumentaire solide et de se confronter à un avis opposé. Une grande partie de l'évaluation de l'UE est basée sur ces ateliers

d'argumentation avec **une part d'évaluation par les paires en utilisant une grille de notation préparée sur Wooclap.**

## **2.2. Encadrement d'étudiants et de personnels techniques**

### **2.2.1. Etudiants**

#### **2.2.1.1. • Encadrement IUT**

- 2012 Manon SAUVAGNAT (IUT Génie Biologique Option analyses biologiques et biochimiques, UdA). Analyse de l'effet de l'Olesoxime sur la neuropathologie d'une souris transgénique hypomyélinisée modèle de la maladie de Pelizaeus-Merzbacher
- 2017 Yan BONIN (IUT Génie Biologique Option analyses biologiques et biochimiques, UCA). Caractérisation au niveau de la moelle épinière des modifications histologiques induites par un traitement immunosuppresseur dans un modèle murin de sclérose en plaques.
- 2022 Juliette TERNAT (IUT Génie Biologique Option analyses biologiques et biochimiques, UCA). Évaluation neuropathologique de l'effet de la lériglitazone dans un modèle murin de dysmyélinisation d'origine génétique.

#### **2.2.1.2. • Encadrement N3**

- 2017 Clémence BARBEROT (Licence Sciences, Technologies, Santé, UCA). Evaluation des douleurs somatiques et des comorbidités associées dans un modèle de privation maternelle chez la souris.
- 2021 Nathan METHIVET (Licence Sciences, Technologies, Santé, UCA). Evaluation cellulaire et moléculaire du fingolimod dans deux modèles murins de dysmyélinisation.

#### **2.2.1.3. • Encadrement Master 1**

- 2007 Soline ODOUARD (Master Physiologie et Neurosciences, UCB Lyon1). Etude des phénotypes moteur et douloureux des souris KPLP et PLOA \_ Co-encadrement avec Jérôme BUSSEROLLES.
- 2007 Marie NERON (Master Santé, UdA). Phénotypage comportemental de souris transgéniques modèles de patients porteurs de PLPpathies et de leurs mères transmettrices.
- 2008 Nathanaëlle MONTANIER (Master Santé, UdA). Phénotypage comportemental de modèles murins de leucodystrophies dysmyélinisantes : au-delà des troubles moteurs.
- 2011 Pauline PARIS (Master Santé, UdA). Évaluation de l'impact d'un traitement chronique aux neuroleptiques sur des souris porteuses d'une délétion du gène des protéolipoprotéines (PLP) de myéline.
- 2014 Marie MAREMBERT (Master Sciences, Technologies, Santé Mention : Génétique et physiologie, UdA). Analyse neuropathologique de l'effet d'un traitement à l'olesoxime chez des souris présentant un trouble de la myélinisation.
- 2016 Mélissa CUMENAL (Master Sciences du Médicament, UdA). Analyse neuropathologique de l'effet d'un traitement à l'Olésoxime chez des souris présentant un trouble de la myélinisation
- 2017 Mathilde IZOULET (Parcours Personnalisé Recherche Pharmacie, UCA). Caractérisation histopathologique des ganglions rachidiens dans un modèle murin de sclérose en plaques dédié à l'évaluation des symptômes douloureux.
- 2022 Lauralie DEBARD (Master Sciences du Médicament, UCA). Évaluation des effets de l'extrait de pépin de raisin dans un modèle murin de sclérose en plaques - Analyse comportementale et protéique.

2.2.1.4. • Encadrement Master 2 Recherche

- 2014 Elodie PICARD (Master Sciences du Médicament, Uda). Canaux Cav 3.2 : une opportunité thérapeutique pour le soulagement des douleurs viscérales associées à une inflammation intestinale à bas-bruit - Co-encadrement avec Christophe MALLET.
- 2015 Amélie DEMOSTHENES (Master Sciences du Médicament, Uda). Etude de la douleur dans deux modèles murins de sclérose en plaques.
- 2019 Lucie BIHEL (Master Handicap Neurologique, Université PARIS-SACLAY). Mise en place d'un protocole d'enregistrement de potentiels évoqués corticaux chez la souris et validation dans un modèle murin de dysmyélinisation et de dégénérescence axonale. Interne Médecine Physique et Réadaptation, Financement Année Recherche CHU Clermont-Ferrand.
- 2021 Nazarine MOKHTAR (Master Sciences du Médicament, UCA). Evaluation cellulaire et moléculaire de molécules neuroprotectrices potentielles dans deux modèles murins de dysmyélinisation.
- 2023 Lauralie DEBARD (Master Sciences du Médicament, UCA). Évaluation des effets de l'extrait de pépin de raisin dans un modèle murin de sclérose en plaques au niveau de la réponse immune et inflammatoire précoce.

2.2.1.5. • Encadrement thèse

- 2008-2012 Bérengère DEPIETS (Doctorat d'Université Spécialité Génétique et Physiologie, Uda). Etude physiopathologique de modèles murins de leucodystrophies dysmyélinisantes et approches thérapeutiques – Co-encadrant avec le Pr Odile BOESPFLUG-TANGUY (40%).
- 2015-2018 Amélie DEMOSTHENES (Doctorat d'Université Spécialité Sciences du Médicament, UCA). Exploration physiopathologique du rôle du stress oxydant dans le développement des douleurs neuropathiques dans deux modèles murins de sclérose en plaques – Co-encadrant avec le Pr Alain ESCHALIER (40%).
- 2019- 2022 Maha MABROUK (Doctorat d'Université Spécialité Sciences du Médicament, UCA). Evaluation de l'effet correcteur d'un extrait polyphénolique de pépins de raisin dans un modèle murin de sclérose en plaques. l'encéphalomyélite auto-immune expérimentale – Thèse en co-tutelle avec la Tunisie, Co-encadrant français avec le Pr Laurence TERRAIL (20%).

**2.2.2. Personnels techniques**

- 2010-2011 Céline GUERET, Ingénieur de recherche  
Etude *in vitro* de l'effet des stratégies thérapeutiques développées dans le cadre du projet européen FP7 LEUKOTREAT
- 2011-2013 Céline BECHON, Technicienne  
Etude *in vivo* de l'effet des stratégies thérapeutiques développées dans le cadre du projet européen FP7 LEUKOTREAT
- 2013-2014 Julie BARBIER, Technicienne  
Analyse comportementale de l'effet d'un traitement à l'olesoxime chez des souris présentant une dysmyélinisation.

**2.3. Diffusion de la culture scientifique**

J'ai participé à de nombreuses reprises à la Fête de la Science :

- de 2008 à 2013, comme post-doctorante au sein de l'équipe GReD UMR CNRS 6247-INSERM 931 ;
- en 2014 et 2015, en tant qu'ATER puis MCF.

En 2014 et 2015, j'ai fait partie du Comité Local de Clermont du Mouvement Sciences en Marche (12 membres actifs et plus de 150 soutiens) - <http://sciencesenmarche.org/fr/clermont/>. Sciences en Marche est une association créée en juin 2014 qui avait pour but de sensibiliser l'opinion publique et notre représentation nationale aux enjeux de l'enseignement supérieur et de la recherche pour notre société, notre économie et nos valeurs culturelles. Les principales actions menées par le Comité Local Clermont ont été :

- une montée au sommet du Puy-de-Dôme par le chemin des Muletiers regroupant plus de 200 enseignants chercheurs et chercheurs clermontois suivi d'ateliers de sensibilisation à la Science réalisés au sommet du Puy-de-Dôme le samedi 11 octobre 2014 ;
- la participation à l'arrivée nationale du mouvement Sciences en Marche à Paris le 11 décembre 2014 ;
- la participation active au « Village de la Lumière », organisée par Astuscience les 9 et 10 octobre 2015, Place de la Victoire à Clermont-Ferrand dans le cadre de la Fête de la Science ;
- la communication locale sur les enjeux de l'enseignement supérieur et de la recherche ([https://www.lamontagne.fr/clermont-ferrand-63000/actualites/defendre-lenseignement-superieur-et-la-recherche\\_11164048/](https://www.lamontagne.fr/clermont-ferrand-63000/actualites/defendre-lenseignement-superieur-et-la-recherche_11164048/)).

Dans le cadre de mes activités de recherche décrite ci-dessus, j'ai reçu à plusieurs reprises des financements donnés par des associations de patients, ce qui m'a permis de présenter mes travaux de recherche lors de journées de rencontre avec les patients et leurs familles :

- en 2009 et 2011 : Intervention au colloque ELA Familles/Chercheurs, Sèvres, France ;
- en 2016 et 2017 : Portes ouvertes des laboratoires financés par la fondation pour l'aide à la recherche sur la sclérose en plaques (Fondation ARSEP) (<https://www.arsep.org/library/media/other/Publications/La%20Fondation/Revue-Arsep-2018.pdf>, couverture et p12).

---

### **3. Responsabilités collectives et administratives**



### **3.1. Responsabilités collectives**

#### **3.1.1. Informations des lycéens aux filières universitaires**

Depuis 2018 participation annuelle aux salon Infosup puis Auversup pour les formations Pharmacie et Sciences de la Vie ainsi qu'aux journées portes ouvertes de l'UCA pour l'UFR de Pharmacie.

#### **3.1.2. Expertises**

Expertise du projet "PHARMIFIELD" de l'appel à projets ASTRID ANR 2022.

#### **3.1.3. Activités éditoriales**

##### *3.1.3.1. Evaluation des articles soumis dans des revues internationales*

Je réalise régulièrement (1 à 2 fois par trimestre) l'évaluation d'articles pour différentes revues internationales dans le domaine de la douleur, de la pharmacologie ou plus généralistes dans le domaine des neurosciences, de la biochimie ou de l'immunologie : The Open Pain Journal, Fundamental and Clinical Pharmacology, Neuroscience, Behavioral and Brain Functions, Biological chemistry, Science Bulletin, Acta Biochimica et Biophysica Sinica, Journal of Neuroimmunology, Cell Biology International.

##### *3.1.3.2. Membre du comité éditorial de la Minute Recherche de l'UCA*

Depuis avril 2022, je suis membre du comité éditorial de la minute recherche de l'UCA qui propose, pour être en prise directe avec la recherche de l'Université, la mise en ligne (<https://www.uca.fr/recherche/sciences-et-societe/la-minute-recherche>) tous les 15 jours d'un résumé vulgarisé d'une publication de moins de 6 mois réalisée par des membres de l'université.

#### **3.1.4. Sociétés savantes et associations**

- Membre de l'« International Association for the Study of Pain » (IASP) depuis 2014 ;
- Membre de la Société Française de Pharmacologie et de Thérapeutique (SFPT) depuis 2014 ; participation aux groupes de travail « Neuropsychopharmacologie » et « Recherche Translationnelle en Pharmacologie », pour lesquels j'ai déjà participé à la rédaction d'articles de revue (Sion and Bégou, 2021 ; Bouchenaki et al., Thérapie 2019) ;
- Membre de la Société Française d'Etude et de Traitement de la Douleur (SFETD) depuis 2014 ;
- Membre de la l'Association des Enseignants de Pharmacologie des Facultés de Pharmacie (AEPFP) depuis 2014 et **depuis la dernière AG du 26 novembre 2021 j'ai été élue au CA de l'association en tant que secrétaire adjointe** en vue de me former pour devenir secrétaire de l'association lors du prochain mandat ;
- Membre de l'Association pour le Soutien de la Pharmacologie en Région Auvergne (ASPRA).

#### **3.1.5. Responsabilités au sein des structures scientifiques de l'UCA**

- Depuis 2010 : membre du Comité de Pilotage de l'Unité de Stabulation Animale de l'UdA puis UCA ;
- Depuis 2012 : membre du Comité Scientifique du Centre d'Imagerie Cellulaire de l'UdA puis UCA ;

### *Responsabilités collectives et administratives*

- Depuis 2016 Coordination de la rédaction et de la mise à jour de la déclaration d'utilisation d'O.G.M. en milieu confiné à des fins de recherche pour l'équipe de recherche Pharmacologie Fondamentale et Clinique de la Douleur (Inserm 1107, Neuro-Dol).
- Pour 2022 et 2023, membre du groupe de travail « Licences et Master » dans le cadre de l'évaluation de l'UFR de Pharmacie par la commission de la Conférence Internationale des Doyens des facultés de PHARMacie d'Expression Française (CIDPharmEF).

## **4. Activités de recherche pendant la thèse**



Dans le domaine de la schizophrénie, les recherches précliniques visant à étudier la physiopathologie de la maladie et à développer de nouvelles approches thérapeutiques ont longtemps été élaborées à partir d'animaux normaux soumis à des modifications neurochimiques induites par des traitements pharmacologiques, ce qui a limité les extrapolations à la pathologie humaine. De plus, les atteintes neurochimiques étudiées se sont longtemps limitées aux atteintes dopaminergiques, hypothèse physiopathologique dominante de la maladie depuis les années 1960 (Carlson and Lindqvist, 1963 ; Creese et al., 1976). Dans ce contexte, **l'équipe du Pr Marie-Françoise SUAUD-CHAGNY dans laquelle j'ai réalisé mon travail de thèse, au sein de l'unité INSERM 766 Laboratoire de Neuropharmacologie et Neurochimie, a entrepris le développement et la validation de deux modèles animaux de schizophrénie dans la perspective d'investigations parallèles et comparées.** Ce projet était précurseur au niveau européen dans le développement de tels outils.

Au cours de mon DEA en 2003 puis de ma thèse de septembre 2003 à novembre 2006, j'ai tout particulièrement participé à la validation d'un modèle génétique de schizophrénie induit chez la souris. Les principaux résultats obtenus au cours de cette période seront détaillés après une présentation du contexte scientifique.

## **4.1. Contexte scientifique**

### **4.1.1. Hypothèses étiologiques de la schizophrénie**

La schizophrénie est la deuxième cause de maladies psychiatriques après la dépression, sa prévalence (nombre de « cas » par habitant sur une période donnée) est d'environ 1% de la population avec une légère surreprésentation chez les hommes comparés aux femmes puisque le risque ratio est de 1,4/1 (Khan et al., 2015). Le terme schizophrénie du grec « schizin » qui signifie fendu, et « phrênè » intelligence ou pensée est introduit par Eugène Bleuler en 1911. **L'étiologie de la maladie semble plurifactorielle puisque de nombreux facteurs de risque ont été identifiés sans qu'aucun d'entre eux ne soit responsable seul du développement de la maladie. Elle semble trouver son origine dans l'interconnexion complexe et pluriel (potentiellement différente d'un patient à un autre) entre des facteurs de risque génétique et environnementaux avec pour ces derniers l'hypothèse de deux périodes à risque : la période périnatale et l'adolescence.** Ces données suggèrent ainsi que la schizophrénie pourrait être une pathologie neurodéveloppementale (Khan et al., 2015 ; Millan et al., 2016). En tant que facteurs de risque génétiques, ont été mis en évidence de très rares polymorphismes de gènes semblant avoir un impact clinique important ; tout comme un très grand nombre de polymorphismes semblant avoir un impact clinique mineur d'un point de vue individuel mais un impact collectif important. Parmi les premiers, des variants impliquant les gènes codant pour les protéines neuréxine 1, neuréguline 1 ou DISC1 pour Disrupted in schizophrenia 1 ont été tout particulièrement documentés tandis que parmi les seconds certains polymorphismes du gène codant la catéchol-O-méthyltransférase (COMT), le récepteur à la dopamine (DA) de type D<sub>3</sub>, ou encore la microdélétion 22q11.2 et le locus C4A du complexe majeur d'histocompatibilité ont été décrits (Owen et al., 2004 ; Khan et al., 2015). Concernant les risques environnementaux précoces, il a été mis en évidence une augmentation du risque de développer une schizophrénie pour les individus : 1) ayant été exposés à un agent infectieux (dont le virus de la grippe ou de la rubéole) ou à des carences nutritionnelles pendant le second trimestre de gestation, 2) ayant été exposés à des complications obstétricales au cours de la grossesse (diabète gestationnel ou incompatibilité rhésus foeto-maternelle) ou au moment du travail (rupture prématurée des membranes, césariennes ou difficultés

respiratoires nécessitant une réanimation). Enfin, concernant les risques environnementaux tardifs, il a été rapporté une augmentation du risque de développer la maladie pour les individus exposés au cours de l'enfance et/ou de l'adolescence à : 1) des stress psycho-sociaux (migration, vie urbaine, maltraitance ou abus sexuel), 2) des traumatismes crâniens, 3) des substances psychoactives (Fusar-Poli et al., 2017).

La schizophrénie semble donc trouver son origine dans la répétition d'atteintes développementales avec (Figure 1) :

- une première vague d'atteintes qui aurait lieu *in utero* et/ou dans l'enfance précoce (facteurs génétiques et environnementaux précoces) qui provoquerait des anomalies du développement du cerveau et ainsi fragiliserait l'individu ;

- une deuxième vague d'atteintes qui interviendrait au cours de l'adolescence (facteurs environnementaux tardifs) qui viendrait déstabiliser les fonctions neurologiques du patient et engendrerait la phase prodromique de la maladie puis la décompensation vers la phase clinique.

Il est actuellement impossible de dire s'il existe un nombre d'atteintes minimal et suffisant pour conduire au développement de la schizophrénie (Warner R, 1985 ; Millan et al., 2016).

Il est dorénavant reconnu que **l'entrée de la maladie se fait par une phase prodromique ou prodrome** (signe ou symptôme précoce ou annonciateur d'une pathologie) débutant généralement au début de l'adolescence et se caractérisant par un déclin du fonctionnement cognitif et social. **Cependant, c'est très généralement lors du premier épisode psychotique\* que le diagnostic de schizophrénie est posé en général chez le jeune adulte entre 15 et 24 ans chez l'homme et 25 et 34 ans chez la femme** (Jablenski, 2000). **La schizophrénie se caractérise par une combinaison complexe de symptômes pouvant varier entre les patients**, comme le formulait déjà Eugène Bleuler dans sa description initiale de la maladie : « j'appelle démence précoce schizophrénie parce que, comme j'espère le montrer, la scission des fonctions psychiques les plus diverses est l'un des caractères les plus importants. Pour des raisons de commodité, j'emploie ce mot au singulier bien que ce groupe comprenne vraisemblablement plusieurs maladies » (Bleuler, 1911). **Il est néanmoins couramment considéré que trois grandes catégories de symptômes sont caractéristiques (mais pas exclusifs) de la maladie.** Tout d'abord **les symptômes positifs** qui sont des comportements et pensées anormaux parfois regroupés sous le terme troubles psychotiques incluant les idées délirantes, les hallucinations (perception sensorielle qui procure la même sensation immédiate de réalité qu'une perception réelle en l'absence de stimulation externe) et le discours désorganisé. **Ceux-ci sont souvent associés à, puis au cours de l'évolution de la maladie remplacés par, des symptômes négatifs** incluant le retrait social, l'émoussement affectif (appauvrissement de la gamme et de l'intensité de l'expression des émotions), l'anhédonie (incapacité de ressentir du plaisir) ou l'apathie (insensibilité, indifférence, absence de réaction vis à vie de l'environnement). **Enfin, bien que longtemps sous-considérés, les troubles cognitifs sont présents dès la phase prodromique et tout au long de la maladie** incluant notamment des troubles du cours de la pensée et du langage ainsi que des troubles de l'attention et du traitement de l'information (Kahn et al., 2013 ; DSM-5-TR, 2022). **L'évolution de la maladie peut se faire vers une récupération complète à une persistance des symptômes, entraînant dans le dernier cas une diminution de l'espérance de vie de près de 20 ans en comparaison à la population générale** (McGrath et al., 2008). Les patients présentent alors de sérieuses difficultés dans la vie de tous les jours (même lorsque les symptômes psychotiques ont disparu) limitant leur capacité à travailler ou à vivre seul de façon indépendante (Khan et al., 2015).

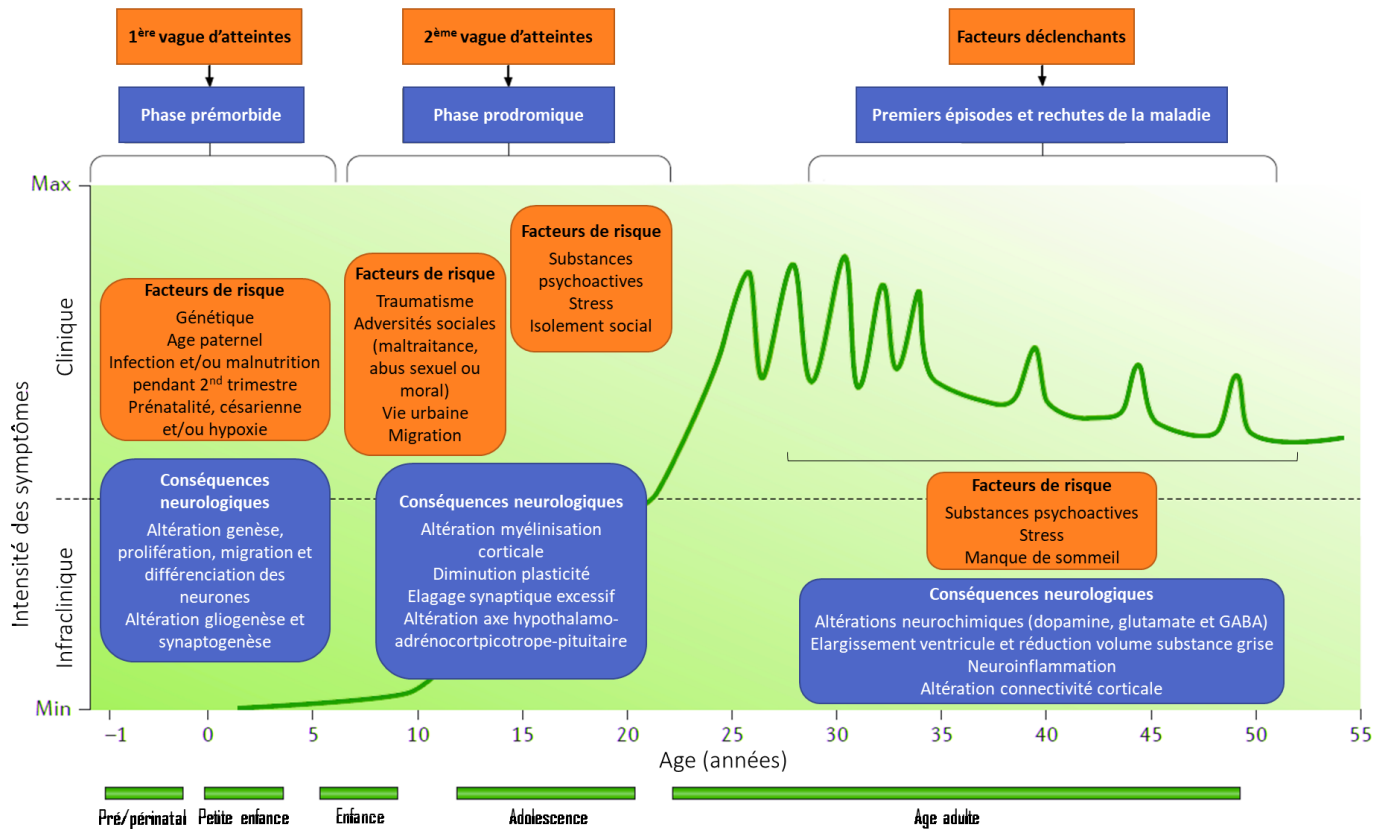


Figure 1: Schéma récapitulatif de l'hypothèse neurodéveloppementale de la schizophrénie prenant en compte les facteurs de risques et les processus physiologiques altérés ainsi que l'évolution de la symptomatologie

Adapté de Warner R, 1985 ; Fusar-Poli et al., 2017

Le diagnostic de la schizophrénie se fait généralement au début de l'âge adulte le plus souvent lors de l'apparition des premiers épisodes psychotiques. Il intervient chez des individus ayant la plupart du temps développé dès la fin de l'enfance ou le début de l'adolescence des altérations du comportement appelée phase prodromique de la maladie. La schizophrénie suit alors un cours fluctuant avec des épisodes d'exacerbation des symptômes psychotiques se superposant à d'autres symptômes plus continus tels que le retrait social ou les troubles cognitifs.

La phase prodromique de la maladie se développerait chez des individus ayant subi des atteintes développementales précoces dues à une susceptibilité génétique, des agressions (malnutrition, infection) pendant le développement embryonnaire ou des complications au moment de la naissance (césarienne, hypoxie). Ces atteintes viendraient perturber le développement du cerveau est ainsi provoquer une fragilité chez ces individus ; fragilité qui resterait sans conséquence clinique (phase pré morbide) si une deuxième vague d'atteintes ne venait pas perturber le développement tardif. L'exposition au cours de l'enfance à différents stress tels que la migration, la maltraitance, les abus sexuel ou même la vie en milieu urbain sont autant de facteurs de risque de développer la maladie tout comme le sont au moment de l'adolescence la consommation de substances psychoactives (tabac, cannabis) ou l'isolement social. Ces facteurs de risque tardifs perturbent la maturation du cerveau et notamment des aires corticales entraînant des troubles de la myélinisation, un élagage synaptique excessif ou encore une diminution de la plasticité. Ces perturbations sur un cerveau ayant déjà subi des altérations précoces génèrent des anomalies de plusieurs systèmes de neurotransmission (dopamine, glutamate et acide  $\gamma$ -aminobutyrique (GABA)), une neuroinflammation, un élargissement des ventricules et une réduction du volume de la substance grise corticale ; anomalies responsables de l'apparition des symptômes cliniques. Contrairement aux autres symptômes, les symptômes psychotiques seraient exacerbés par des facteurs de risque tels que la consommation de substances psychoactives ou le stress.

#### **4.1.2. Prise en charge thérapeutique de la schizophrénie**

**Pendant de nombreuses années les maladies psychiatriques, et notamment la schizophrénie, ont souffert de l'absence total de traitement. La prise en charge des patients se limitait alors à l'internement au long cours.** Cette situation est bien illustrée par cette phrase d'Étienne Esquirol (un des plus célèbres « aliénistes » français, médecin en chef de la maison royale des aliénés de Charenton), écrite en 1822 en préambules à la deuxième partie « Mémoires statistiques et hygiéniques sur la folie » de son Tome II Des maladies mentales considérées sous les rapports médical, hygiénique et médico-légal : « une maison d'aliénés est un instrument de guérison, entre les mains d'un médecin habile, c'est l'agent thérapeutique le plus puissant » (Esquirol, 1838). **Mais dans la seconde moitié du XX<sup>ème</sup> siècle, une véritable révolution pharmacologique a lieu avec l'émergence des grandes catégories de psychotropes proposant alors une alternative à l'internement des patients.** Celle-ci a tout d'abord eu lieu par sérendipité (capacité, aptitude à faire par hasard une découverte inattendue et à en saisir l'utilité), notamment pour la découverte des neuroleptiques qui restent depuis les traitements de référence de la schizophrénie. A la suite de la découverte qu'une famille de molécules anti-histaminiques, les phénothiazines, possèdent des propriétés sédatives, plusieurs molécules développées notamment par le laboratoire Rhône-Poulenc sont testées en anesthésiologie. La chlorpromazine est alors testée (en association avec d'autres phénothiazines) par Henri Laborit et Pierre Huguenard dès 1951 et provoque chez les patients une « tendance au sommeil » et un « désintéressement du malade pour tout ce qui se passe autour de lui » ; ce dernier effet sera par la suite nommé ataraxie (Laborit, 1951). Ces premiers résultats conduisent les Pr Jean Delay et Pierre Deniker à tester cette molécule chez les patients de la clinique des maladies mentales et de l'encéphale à l'hôpital Sainte-Anne et de montrer son efficacité en monothérapie (Delay et al., 1952). **En janvier 1955, la terminologie « neuroleptique » est proposée par J. Delay à l'académie nationale de médecine et en 1957. Delay et Deniker présentent alors la définition de ce terme qui peut se résumer en 5 critères :**

- action psycholeptique sans action hypnotique
- action inhibitrice à l'égard de l'excitation, de l'agitation, de l'agressivité, réduction des états maniaques
- action réductrice vis à vis de certaines psychoses aiguës et chroniques et vis à vis des psychoses expérimentales
- importance des manifestations psychomotrices, neurologiques et neurovégétatives
- prédominance d'action sur les centres sous-corticaux

A partir de ces travaux, de nombreux produits dérivés de la chlorpromazine ont été découverts et mis sur le marché avec une cinquantaine de références de neuroleptiques dits typiques (i.e. répondant à la définition de Delay et Deniker) appartenant à plus de dix familles chimiques différentes (une quinzaine est encore commercialisée en France). **Ces neuroleptiques typiques sont des antagonistes des récepteurs de la DA principalement de type D<sub>2</sub>.** Dont l'efficacité antipsychotique est corrélée au taux d'occupation des récepteurs D<sub>2</sub> ; un neuroleptique serait actif à partir d'un taux d'occupation de 65 à 70 % (Creese et al., 1976) (Figure 2). **Ces médicaments ont permis de diminuer la durée des hospitalisations et, lors de leur utilisation au long cours, de diminuer le risque de rechute et de ré-hospitalisation. Cependant, ces médicaments présentent certains défauts.** Premièrement, une partie significative de patients (environ 30%) n'est pas améliorée par ces traitements. De plus, ces traitements produisent des effets indésirables intolérables chez environ 5 à 10 % des patients ou très gênants chez la plupart des patients. Enfin, si ces traitements améliorent la symptomatologie positive de la schizophrénie, ils n'ont pas ou peu d'effet sur la symptomatologie négative.

Par la suite, dans les années 80, de nouvelles molécules ont été développées, en s'éloignant un peu du concept devenu trop rigide du neuroleptique décrit par Delay et Deniker impliquant dans la définition de ces médicaments ses effets indésirables (importance des manifestations psychomotrices, neurologiques et neurovégétatives) et en prenant en compte les nouvelles hypothèses physiopathologiques impliquant d'autres neuromédiateurs que la dopamine (Carlsson et al., 2001). **C'est ainsi que de nouvelles molécules ont vu le jour, appartenant à la famille des neuroleptiques atypiques ou neuroleptiques de 2<sup>ème</sup> génération. Meltzer en 1991 a proposé de définir ces neuroleptiques atypiques sur trois points :**

- efficacité chez des patients résistants et sur les symptômes négatifs
- induction de peu ou pas d'effets extrapyramidaux (effets indésirables neurologiques pouvant inclure une akatisie ou difficulté à rester immobile, une dystonie avec possible développement de torticolis ou spasmes et le syndrome pseudo-parkinsonien) et de dyskinésies (mouvements involontaires linguo-bucco-faciaux) tardives aux doses thérapeutiques
- faible élévation de la prolactine.

A l'heure actuelle, en France sept neuroleptiques atypiques sont commercialisés : la clozapine - LEPONEX®, la rispéridone - RISPERDAL®, l'olanzapine - ZYPREXA®, l'aripiprazole - ABILIFY®, la quétiapine - XEROQUEL, la palipéridone - TREVICTA® et l'amisulpride - SOLIAN® (ce dernier ayant un profil pharmacologique un peu particulier qui ne sera pas discuté ici). **Le mécanisme d'action exact des NL atypiques diffère d'un médicament à un autre.** Tous les neuroleptiques atypiques ont cependant une composante d'antagoniste D<sub>2</sub> associée à une ou plusieurs des caractéristiques pharmacologiques suivantes : une relative spécificité des récepteurs D<sub>1</sub> et/ou D<sub>4</sub> ; une activité antagoniste pour les récepteurs à la sérotonine (5-HT) de type 5-HT<sub>2A</sub> et/ou une activité agoniste partielle pour les récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> ; une activité antagoniste des récepteurs  $\alpha_1$ - et/ou  $\alpha_2$ -adrénergiques (Figure 2) (Horacek et al., 2006 ; Grinchii and Dremencov, 2020). Il semblerait que le blocage des récepteurs 5-HT<sub>2A</sub> des neurones présynaptiques du striatum s'opposerait, par augmentation de la libération de DA, au blocage post-synaptique dopaminergique au niveau de la voie nigrostriée ce qui expliquerait la plus faible incidence des symptômes extrapyramidaux. Il a également été suggéré que le blocage des récepteurs 5-HT<sub>2A</sub> pourrait être responsable de l'effet bénéfique des NL atypiques sur les symptômes négatifs par augmentation de la libération de DA dans le cortex préfrontal (Miyamoto et al., 2005). **Si depuis leur mise sur le marché, ces médicaments jouissent d'une très bonne réputation basée sur leur meilleure efficacité thérapeutique ainsi que sur leur plus faible incidence d'effets indésirables notamment neurologiques ; des études récentes montrent que les NL atypiques ne sont pas tous égaux devant leur efficacité clinique (notamment en ce qui concerne les schizophrénies résistantes), et certains d'entre eux produisent des effets indésirables au long cours au moins aussi invalidants que les effets neurologiques des neuroleptiques typiques** (Newcomer JW, 2005 ; Gardner et al., 2005). Ainsi, la prise de poids importante induite par ces nouveaux neuroleptiques semble induire chez les patients le développement d'un diabète ou syndrome métabolique (association d'au moins trois problèmes de santé ayant en commun un mauvais métabolisme corporel pouvant inclure un taux d'insuline anormalement élevé, une hypercholestérolémie, une hypertension, une hyperglycémie ou une insulino-résistance) et ainsi augmenter le nombre de décès suite à des complications cardiovasculaires ou respiratoires. La clozapine qui semble être le neuroleptique atypique le plus efficace a pour inconvénient d'induire chez 1 à 3 % des patients une agranulocytose (disparition quasi-totale des granulocytes neutrophiles ; nombre de neutrophiles polynucléaires < à 500/mm<sup>3</sup>) et chez 15 à 20 % une neutropénie (diminution

du nombre de neutrophiles circulants - 500 à 1000 neutrophile/mm<sup>3</sup>), restreignant très fortement son utilisation (Miyamoto et al., 2005).

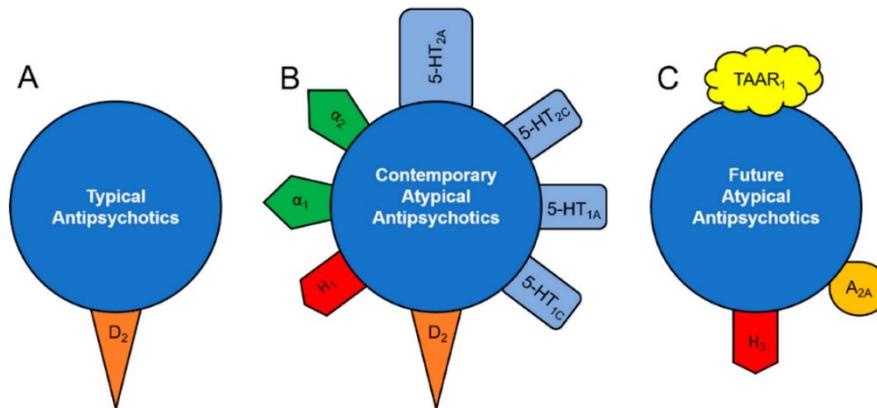


Figure 2 : Représentation schématique des cibles pharmacologiques des neuroleptiques  
Extrait de Grinchii and Dremencov, 2020

(A) Les neuroleptiques atypiques sont presque exclusivement des antagonistes des récepteurs D2 dopaminergiques.

(B) Tous les neuroleptiques atypiques actuellement commercialisés sont caractérisés par une propriété d'antagoniste des récepteurs 5-HT<sub>2A</sub> de la sérotonine, équivalente voir supérieure à leur activité antagoniste des récepteurs D2 (à noter que l'ariprazole n'est pas antagoniste mais agoniste partiel sur le récepteur D2). Certains sont également des agonistes partiels des récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> (ariprazole, clozapine, quetiapine) et des antagonistes aux récepteurs 5-HT<sub>2C</sub> et 5-HT<sub>1C</sub> à la sérotonine (clozapine, olanzapine, risperidone) ; ou peuvent également être des antagonistes des récepteurs H<sub>1</sub> à l'histamine (olanzapine, quetiapine) ou encore des récepteurs adrénergiques de type  $\alpha_1$  (ariprazole, clozapine, olanzapine, paliperidone, quetiapine) ou  $\alpha_2$  (clozapine, olanzapine, paliperidone, quetiapine, risperidone).

(C) De nouvelles molécules sont en cours d'évaluation dont certaines avec un potentiel thérapeutique double neuroleptique/antidépresseurs, tels que les agonistes des récepteurs 1 associé aux traces d'amines (TAAR1), les agonistes des récepteurs A<sub>2A</sub> à l'adénosine ou les antagonistes des récepteurs H<sub>3</sub> à l'histamine.

**Ainsi, même si les progrès thérapeutiques sont indéniables, il reste encore de nombreux progrès à faire pour soigner l'intégralité des patients dans l'intégralité de leur symptomatologie.** C'est la raison pour laquelle de nombreuses équipes de recherche travaillent sur une meilleure compréhension de la physiopathologie de la schizophrénie et le développement de modèles animaux les plus proches possible de la maladie afin de tester de nouvelles stratégies thérapeutiques. **C'est sur ce postulat de départ qu'a reposé mon travail de thèse que je vais vous présenter dans les chapitres suivants.**

## **4.2. Principaux résultats**

### **4.2.1. La lésion néonatale de l'hippocampe ventral chez le rat ou rat Lipska.**

Au cours de mon stage de DEA j'ai participé à l'implantation dans notre équipe du modèle de lésion néonatale de l'hippocampe ventral et à l'adaptation du protocole opératoire. Cette adaptation portait notamment sur le protocole d'anesthésie afin d'améliorer le taux de survie des rats opérés ainsi que sur le protocole d'injection de l'acide iboténique. La caractérisation comportementale et neurochimique de ce modèle a ensuite été le travail de DEA puis de thèse de Jean-Baptiste BERTRAND. Nos travaux réalisés en parallèle sur deux modèles animaux différents de la schizophrénie ont permis

de mettre en évidence des anomalies neurochimiques différentes aboutissant à des troubles moteurs similaires. Ces données complémentaires étayent l'hypothèse selon laquelle la schizophrénie ne serait pas forcément une maladie strictement identique entre les patients mais la conséquence de voies physiopathologiques différentes aboutissant à des troubles cliniques similaires.

Mon implication dans la mise en place du modèle m'a permis d'être co-auteure dans l'article de thèse de Jean-Baptiste BERTRAND.

Bertrand JB, Langlois JB, **Bégou M**, Volle J, Brun P, d'Amato T, Saoud M, Suaud-Chagny MF. Longitudinal MRI monitoring of brain damage in the neonatal ventral hippocampal lesion rat model of schizophrenia. *Hippocampus* 20:264-278, 2010.

#### 4.2.2. La souris déficiente pour la protéine STOP (STOP<sup>-/-</sup>).

Peu de temps avant le début de ma thèse, une idée commençait à émerger selon laquelle la schizophrénie pourrait être la conséquence de défauts de connectivité neuronale en lien avec des altérations synaptiques structurales et fonctionnelles (Mirnics et al., 2001 ; Owen et al., 2005) trouvant leur origine très tôt au cours du neurodéveloppement. Le gène DISC1 muté dans une forme familiale de schizophrénie a été identifié comme codant une protéine interagissant avec les microtubules et les protéines associées aux microtubules (MAP) suggérant qu'il pourrait exister dans la schizophrénie des altérations au niveau du cytosquelette (Calicott et al., 2005).

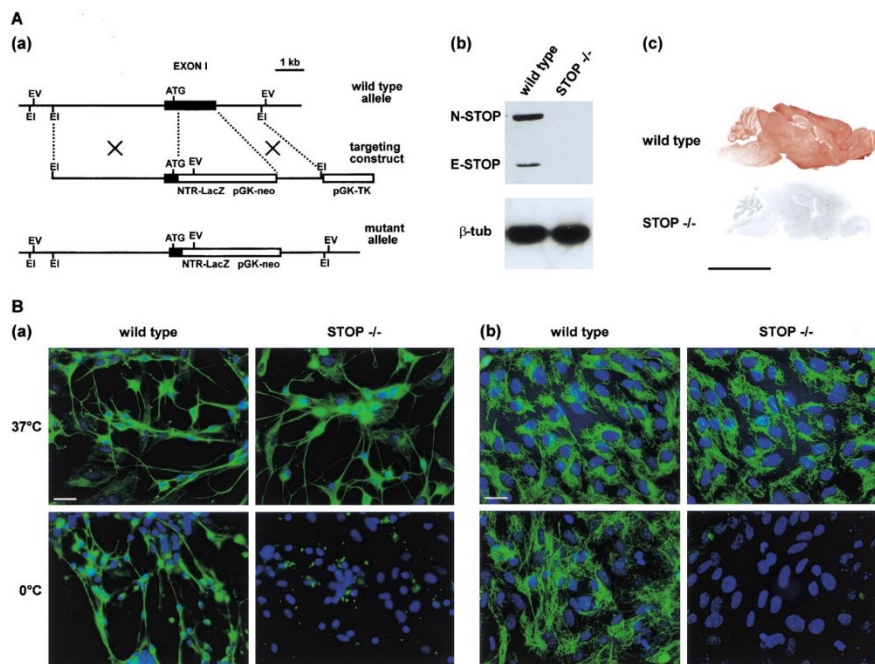


Figure 3 : Suppression de la protéine associée aux microtubules (MAP6 ou STOP) chez la souris (souris STOP<sup>-/-</sup>)

*Extrait de Andrieux et al., 2002*

(A) Fabrication des souris STOP<sup>-/-</sup>

- (a) Organisation génomique du gène STOP montrant la délétion de l'exon 1.
- (b) Analyse western blot de l'expression de STOP chez les souris sauvages et STOP<sup>-/-</sup> (anticorps polyclonaux dirigés contre STOP 23C). Contrôle avec anticorps dirigés contre la tubuline.
- (c) Immunomarquage de STOP sur une coupe sagittale de cerveau de souris sauvage et STOP<sup>-/-</sup> adultes (Barre, 5 mm).

(B) Analyse de la stabilité des microtubules au froid dans des cultures primaires de cellules neuronales (a) et de cellules gliales (b) issues d'embryons sauvage et STOP<sup>-/-</sup>. Marquage des microtubules par un anticorps dirigé contre la tubuline (vert) et contre les noyaux (Hoescht 33258, bleu) (Barres, 20 μm).

En accord avec cette hypothèse, Shimizu et al., ont montré en 2006 une association entre la schizophrénie et des polymorphismes du gène *MAP6* qui code une MAP également appelée protéine STOP (Stable Tubulin Only Polypeptide). L'invalidation de *Map6* chez la souris (souris STOP<sup>-/-</sup>) avait été réalisée quelques années plus tôt par une équipe grenobloise travaillant sur le cytosquelette afin de déterminer le rôle de cette protéine (Figure 3). Lors de ce premier papier, l'équipe de Didier JOB a montré que ces souris pouvaient représenter un modèle très intéressant pour étudier la schizophrénie (Andrieux et al., 2002).

Au cours de ma thèse j'ai tout d'abord réalisé l'analyse comportementale des souris STOP<sup>-/-</sup> en mesurant leur activité locomotrice dans différentes conditions ce qui a permis de montrer que ces souris présentent une activité locomotrice spontanée augmentée pendant la phase nocturne du cycle circadien. Cette hyperactivité est à rapprocher de l'activité générale caractérisée par des crises de prostration ou d'hyperactivité et par une désorganisation des séquences normales de comportement décrite dans le premier papier (Andrieux et al., 2002). Les souris STOP<sup>-/-</sup> présentent également une sensibilité locomotrice accrue à des situations de stress aigu (nouveau et injection de NaCl) et aux effets stimulants de l'amphétamine. Ces anomalies locomotrices sont identiques à celles observées dans un grand nombre de modèles animaux de schizophrénie ; elles sont généralement associées aux symptômes positifs de la maladie et à une augmentation de la transmission dopaminergique dans les systèmes mésencéphaliques (Lipska et al., 2000 ; Gainetdinov et al., 2001). C'est la raison pour laquelle une étude de la transmission dopaminergique a été réalisée en utilisant une technique d'électrochimie *in vivo* chez l'animal anesthésié. Cette technique permet de mesurer dans une structure particulière (ici le striatum ou le noyau accumbens) l'efflux de DA évoqué par des stimulations électriques du faisceau médian du télencéphale mimant l'activité électrique physiologique. Il a ainsi pu être montré que les souris STOP<sup>-/-</sup> présentent une hyper-réactivité des efflux évoqués de DA sans modification de l'efflux basal (Figure 4). Ces altérations affectent le système DA mésolimbique, impliqué dans les processus de récompense et de motivation, sans toucher le système DA nigro-strié, impliqué dans le contrôle moteur.

L'étude mécanistique montre que l'hyper-réactivité de l'efflux de DA chez les souris STOP<sup>-/-</sup> est due à une augmentation des capacités de libération tandis que les mécanismes de recapture et d'autorégulation sont normaux ou renforcés. Ces altérations neurochimiques sont en accord avec les modèles théoriques de la schizophrénie et les données indirectes d'imagerie cérébrales chez l'Homme qui suggèrent que la schizophrénie implique une réponse DA exacerbée aux stimulations sans augmentation de l'imprégnation DA basale (Breier et al., 1997 ; Abi-Dargham et al., 1998 ; Martinez et al., 2003). Enfin, nous avons montré que la plupart des troubles moteurs des souris STOP<sup>-/-</sup> sont sensibles à un traitement chronique aux NL ce qui renforce l'hypothèse selon laquelle ces souris miment des altérations comportementales associées à la schizophrénie.

L'ensemble de ces travaux a été publié dans *The Journal of Neurochemistry*.

Brun P, **Bégou M**, Andrieux A, Mouly-Badina L, Clerget M, Schweitzer A, Scarna H, Renaud B, Job D, Saud-Chagny MF. Dopaminergic transmission in STOP null mice. *J Neurochem*. 2005 Jul;94(1):63-73.

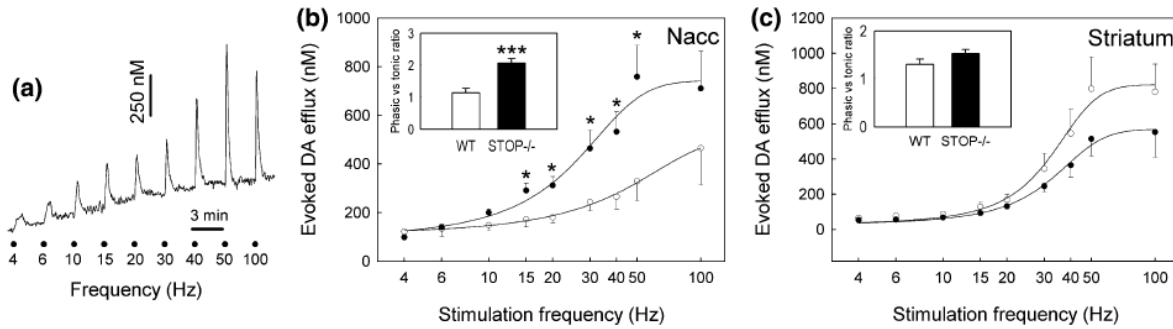


Figure 4 : Relation entre l'efflux de dopamine (DA) et les stimulations électriques dans le noyau accumbens (NAcc) et le striatum de souris invalidées pour la protéine associée aux microtubules 6 (STOP -/-) et contrôles (WT)

Extrait de Brun et al., 2005

(a) Représentation des efflux de DA enregistrés chaque seconde à l'aide d'une électrode à fibre de carbone mesurant des variations de courant d'oxydation (nA) dans le NAcc lors de stimulations électriques de fréquences croissantes du faisceau médian du télencéphale. Grâce au calibrage préalable des électrodes, les variations de potentiel sont exprimées en variation de concentration de DA (nM).

(b) Au niveau du NAcc, les efflux de DA évoqués par des stimulations de fréquences croissantes sont beaucoup plus importants chez les souris STOP -/- que chez les souris WT (moyenne +/- SEM ; n=5-8 ; ANOVA 2 voies et test post-hoc). Cette hyperactivité dopaminergique est confirmée en insert lors de la comparaison du ratio de l'efflux de DA évoqué par une stimulation tonique (20 trains de 6 pulsations à 15Hz, durée totale 20s) vs une stimulation phasique (4 Hz pendant 20s) ; la stimulation tonique évoquant un efflux de DA 2 fois plus important que la stimulation phasique chez les souris STOP -/- (moyenne +/- SEM ; n=5-8. ; test-t de Student).

(c) Au niveau du striatum, les efflux de DA évoqués par des stimulations de fréquences croissantes sont identiques entre les souris STOP -/- et les souris WT (moyenne +/- SEM ; n=5-8 ; ANOVA 2 voies et test post-hoc). De même, la comparaison du ratio de l'efflux de DA évoqué par une stimulation tonique vs une stimulation phasique ne montre pas de différence entre les génotypes.

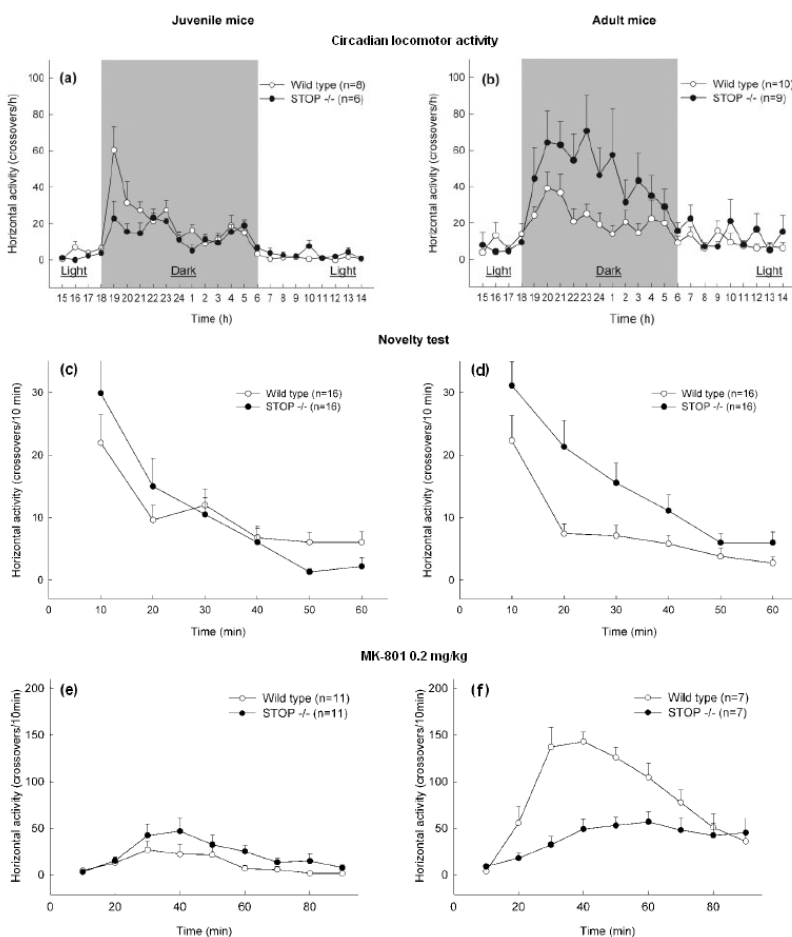
Notre équipe a également participé en collaboration avec l'équipe de Grenoble à un essai thérapeutique visant à tester, chez les souris STOP-/-, l'effet de l'épothilone D (un stabilisateur des microtubules associé au taxol). J'ai réalisé pour ce projet les études électrochimiques ainsi que l'analyse de l'activité locomotrice spontanée ou induite. Cette étude a montré que le traitement à l'épothilone D augmente le pool de vésicules glutamatergiques hippocampiques (dramatiquement diminué chez les souris STOP-/-), améliore la plasticité synaptique hippocampique et améliore les troubles de maternage ainsi que l'activité désorganisée présents chez les souris STOP-/- non traitées. Cette étude suggère que des stabilisateurs des microtubules pourraient constituer une nouvelle piste thérapeutique pour la schizophrénie.

Ce travail a donné lieu à une publication dans Biological psychiatry.

Andrieux A, Salin P, Schweitzer A, **Bégou M**, Pachoud B, Brun P, Gory-Fauré S, Kujala P, Suaud-Chagny MF, Höfle G, Job D. Microtubule stabilizer ameliorates synaptic function and behavior in a mouse model for schizophrenia. *Biol Psychiatry*. 2006 Dec 1;60(11):1224-30.

Comme chez l'humain, certains troubles comportementaux apparaissent après la puberté chez les souris STOP-/. En effet, contrairement aux souris adultes, les souris stop-/- prépubères ne présentent pas d'hyperactivité locomotrice au cours de la phase nocturne du cycle circadien ni d'hypersensibilité locomotrice induite par un stress modéré (exposition à un nouvel environnement ou à l'injection de

NaCl) (Figure 5). Ces résultats suggèrent que l'activité désorganisée et la sensibilité au stress apparaissent après la puberté chez les souris STOP<sup>-/-</sup>. Nous avons également étudié la réactivité à l'amphétamine de ces souris et montré que tout comme chez l'adulte, l'administration intrapéritonéale (i.p.) d'amphétamine 3 et 5 mg/kg induit une hyper-réactivité locomotrice chez les souris STOP<sup>-/-</sup>. Ces résultats suggèrent que, contrairement aux souris adultes, les souris KO STOP prépubères présentent des changements subtils dans la transmission dopaminergique qui ne sont révélés que lorsque le système dopaminergique est sévèrement stimulé. Enfin nous avons montré que tandis que les souris adultes présentent une hyporéactivité locomotrice au MK-801 (un antagoniste des récepteurs glutamatergiques de type N-méthyl-D-aspartate (NMDA)), les souris prépubères présentent une réponse similaire à celle des souris WT quelle que soit la dose utilisée. Ce résultat suggère que la délétion du gène *Map6* pourrait ne pas induire de perturbations majeures de la neurotransmission glutamatergique avant la puberté ou que ces perturbations ne seraient pas exprimées physiologiquement. En conclusion nous avons montré que de nombreuses altérations comportementales n'apparaissent chez la souris STOP<sup>-/-</sup> qu'après la puberté. Cette caractéristique, commune avec la pathologie humaine, n'est que rarement reproduite dans les modèles animaux disponibles jusque-là ; tout comme l'identification d'une hypo-activité glutamatergique, confirmée par une autre étude (Brenner et al., 2007), faisant des souris STOP<sup>-/-</sup> un modèle particulièrement intéressant.



*Figure 5 : Apparition post-pubertaire de troubles comportementaux chez les souris STOP<sup>-/-</sup>*  
*Extrait de Bégou et al., 2007*

(a) et (b) Activité locomotrice sur 24h des souris STOP<sup>-/-</sup> et de leurs contrôles (WT) en période juvénile (4-5 semaines) ou adulte (11-16 semaines) mesurée à l'aide d'un appareil d'actimétrie à faisceau infrarouge (Imetronic, France). A l'âge adulte, les souris STOP<sup>-/-</sup> développent une hyperactivité locomotrice durant la période nocturne ( $p < 0,05$ , ANOVA mesures répétées).

(c) et (d) Activité locomotrice des souris STOP<sup>-/-</sup> et WT suite à leur placement dans un nouvel environnement. A l'âge adulte, les souris STOP<sup>-/-</sup> développent une hyperactivité locomotrice ( $p < 0,01$ , ANOVA mesures répétées).

(e) et (f) Activité locomotrice des souris STOP<sup>-/-</sup> et WT suite à l'injection de MK-801 (antagoniste des récepteurs NMDA) à la dose de 0,2mg/kg. A l'âge adulte, les souris STOP<sup>-/-</sup> développent une hyperactivité locomotrice ( $p < 0,01$ , ANOVA mesures répétées).

Ce travail a donné lieu à une publication dans Synapse.

**Bégou M, Brun P, Bertrand JB, Job D, Schweitzer A, D'Amato T, Saoud M, Andrieux A, Suaud-Chagny MF.** Post-pubertal emergence of alterations in locomotor activity in stop null mice. *Synapse*. 2007 Sep;61(9):689-97.

La schizophrénie étant une pathologie complexe associant des symptômes positifs, négatifs et des troubles cognitifs, nous avons étudié les fonctions cognitives et sociales des souris STOP<sup>-/-</sup>. Nous avons montré que ces souris présentent un déficit d'interactions sociales, des troubles de la mémoire de travail et de la mémoire sociale associés à des altérations de l'apprentissage spatial. Nous avons également montré que si les neuroleptiques semblent légèrement améliorer les déficits d'interactions sociales, ils n'améliorent pas voire aggravent les troubles mnésiques (Figure 6).

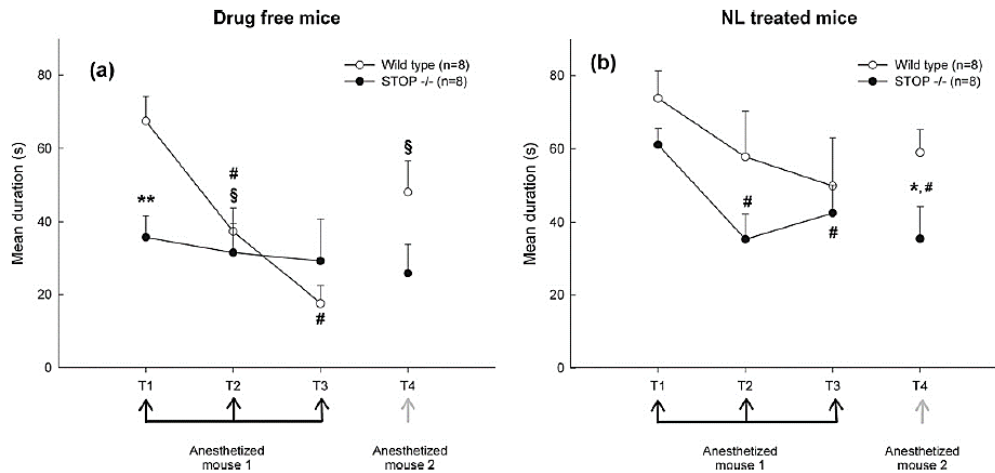


Figure 6 : Test de reconnaissance sociale chez des souris STOP<sup>-/-</sup> et leurs contrôles (WT) avec ou sans traitement long-terme par des neuroleptiques (NL)

Extrait de Bégou et al., 2008

(a) Chez des animaux contrôles non traités aux NL, la 1<sup>ère</sup> présentation d'un congénère anesthésié (T1, durée 3min) induit un fort comportement exploratoire (reniflement, contact avec les pattes) chez les souris WT qui diminue au fur et à mesure des présentations du même individu (T2 et T3, durée 3min, intervalle de 12min). Ce comportement exploratoire important est retrouvé lors de la mise en contact avec un nouveau congénère anesthésié (T4). Chez les souris STOP<sup>-/-</sup>, le niveau d'exploration est faible dès T1 et n'évolue pas lors des présentations T2 et T3 ni lors de la présentation du nouveau congénère. Les souris STOP<sup>-/-</sup> semblent indifférentes à l'interaction sociale.

(b) Chez les animaux traités aux NL (mélange dans l'eau de boisson d'halopéridol 0,5 mg/kg/j et de chlorpromazine 5 mg/kg/j du jour de sevrage au jour de l'expérimentation), les souris STOP<sup>-/-</sup> présentent un temps d'exploration à T1 identique aux souris WT et une diminution de ce temps au cours des présentations T2 et T3. Le traitement aux neuroleptiques semble donc restaurer l'interaction sociale chez les souris STOP<sup>-/-</sup>. Par contre, que cela soit pour les souris WT et STOP<sup>-/-</sup>, la présentation d'un nouveau congénère anesthésié ne génère pas de rebond dans l'exploration sociale suggérant un effet négatif des neuroleptiques sur la reconnaissance sociale y compris chez les animaux contrôles.

# p<0,05, test de Newman-Keuls en comparaison à T1) ; \$ p<0,05, test de Newman-Keuls en comparaison à T3) ; \* p<0,05 and \*\* P<0,01, test t de Student non apparié en comparaison des souris WT pour un même essai.

Ces résultats sont en accord avec des études réalisées dans d'autres laboratoires montrant que les souris STOP<sup>-/-</sup> présentent des perturbations de comportements complexes incluant une réduction importante des capacités de maternage et de confrontation sociale dans des conditions agressives, des déficits sensori-moteurs et des performances amoindries dans des tâches de reconnaissance d'objet et de conditionnement (Andrieux et al., 2002 ; Fradley et al., 2005 ; Powell et al., 2007, Bouvrais-Veret et al., 2007). Le dysfonctionnement social et cognitif étant considéré comme une caractéristique centrale de la schizophrénie, nous proposons que les souris STOP<sup>-/-</sup> représentent un modèle très intéressant pour comprendre la neurobiologie de ces symptômes et pour développer des stratégies thérapeutiques spécifiques.

Ce travail a donné lieu à une publication dans Neuroscience.

**Bégou M, Bertrand JB, Brun P, Volle J, Job D, Schweitzer A, Saoud M, d'Amato T, Andrieux A, Françoise Suaud-Chagny MF.** *The STOP null mice model for schizophrenia display cognitive and social deficits partly alleviated by neuroleptics. Neuroscience 2008;157(1):29-39.*

Le dimorphisme sexuel a été évalué et ce travail a montré que les résultats comportementaux retrouvés chez les femelles STOP-/- sont légèrement différents de ceux observés chez les mâles. En effet, chez les femelles on ne retrouve pas l'hypersensibilité locomotrice aux stress modérés (exposition à un nouvel environnement ou injection de NaCl). Par contre, comme les souris mâles, les souris STOP -/- femelles présentent une hyper-réactivité locomotrice en réponse à l'administration d'amphétamine mais pour des doses plus faibles (1 et 3 mg/kg vs 3 et 5 mg/kg). Ces résultats suggèrent que les souris STOP-/- femelles présentent des changements dans la transmission dopaminergique qui ne sont révélés que lorsque le système est sévèrement stimulé. Il est important de noter que des différences similaires entre mâles et femelles ont également été rapportées chez le rat ayant subi une lésion néonatale bilatérale de l'hippocampe ventral, (Black et al., 1998 ; Silva-Gomez et al., 2003) et chez les patients schizophrènes (Canuso et al., 1998 ; Seeman and Lang, 1990). Malheureusement, l'article présentant ces données n'a jamais été finalisé.

Enfin nous nous sommes intéressés à l'existence de possibles anomalies anatomiques au niveau de l'hippocampe des souris STOP-/. Nous avons ainsi réalisé un marquage immunohistochimique 1) de différentes protéines de fixation au calcium i.e. la parvalbumine, la calrétinine et la calbindine ; 2) de la nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) diaphorase qui est un marqueur des neurones exprimant l'oxyde nitrique synthase neuronale. Ces études préliminaires n'ont pas permis de mettre en évidence de modifications du nombre de neurones marqués pour les protéines de fixation au calcium au niveau de l'hippocampe. Par contre, j'ai pu montrer qu'en l'absence de changement de volume de l'hippocampe il semblerait y avoir une diminution du nombre de neurones exprimant la NADPH-diaphorase active dans l'hippocampe des souris STOP-/. Cette étude anatomique très préliminaires à la fin de mon doctorat n'a pas été poursuivie par la suite.

### **4.3. Conclusion**

La souris STOP-/- est un modèle animal ayant permis de démontrer que des anomalies du cytosquelette peuvent entraîner des perturbations qui récapitulent des aspects de la schizophrénie. L'ensemble de mes travaux de thèse et les résultats obtenus par d'autres équipes ont permis de proposer la souris STOP-/- comme un nouveau modèle animal de la schizophrénie, potentiellement utile pour accroître les connaissances physiopathologiques sur la maladie et évaluer de nouveaux agents thérapeutiques. Bien que ces travaux de thèses remontent à bientôt deux décennies, les nouveautés concernant la prise en charge thérapeutiques de la schizophrénie tardent à être converti en médicament modifiant les conditions de vie des patients. Les recherches actuellement reposent principalement sur le développement de nouvelles molécules capables de modifier le cours de la maladie, les fameux « disease modifiers » en anglais qui ne se limitent pas à corriger les symptômes mais empêchent le développement de la maladie. En théorie ces molécules devraient être utilisées au cours de la phase prodromique afin d'empêcher la bascule vers la phase symptomatique (Millan et al., 2016). Les souris STOP -/- ont depuis été utilisées pour l'évaluation de ces nouvelles molécules (Kajitani et al., 2010 ; Merenlender-Wagner et al., 2014 ; Gory-Fauré et al., 2021). Malheureusement, jusqu'à présent aucune d'entre elle n'a été mise sur le marché et le tableau ci-dessous représentant les caractéristiques des derniers antipsychotiques ayant reçu une autorisation de mise sur le

marché acceptée par la Food and Drug Administration (FDA) illustrent bien l'absence de disease modifiers, voir de réelle innovation thérapeutique, dans les molécules récemment commercialisées. A tel point, que sur les 7 molécules mises sur le marché américain, seule l'aripiprazole est actuellement commercialisée en France malgré l'obtention d'une AMM pour l'asénapine (2011), la lurasidone (2014) ou la cariprazine (2019) (Tableau 3).

Tableau 3 : Mécanismes d'action et indication des neuroleptiques ayant récemment obtenus une autorisation de mise sur le marché délivrée par la Food and Drug Administration (FDA)  
*Extrait de Orzelska-Górka et al., 2022*

Name of Drug	Aripiprazole	Brexipiprazole	Cariprazine	Lurasidone	Asenapine	Lumateperone	Pimavanserin
Mechanism of action	D <sub>2</sub> partial agonist 5-HT <sub>1A</sub> partial agonist 5-HT <sub>2A</sub> antagonist	D <sub>2</sub> /D <sub>3</sub> partial agonist 5-HT <sub>1A</sub> partial agonist 5-HT <sub>2A</sub> antagonist α <sub>1B/2C</sub> antagonist low affinity for H <sub>1</sub> and M <sub>1</sub> receptors	D <sub>2</sub> /D <sub>3</sub> partial agonist 5-HT <sub>1A</sub> partial agonist low affinity for H <sub>1</sub> and 5-HT <sub>2A</sub> receptors lack of affinity for M receptors	D <sub>2</sub> , 5-HT <sub>2A</sub> and 5-HT <sub>7</sub> antagonist 5-HT <sub>1A</sub> partial agonist an affinity for adrenergic receptors—higher for α <sub>2C</sub> and slightly lower for α <sub>1</sub> and α <sub>2A</sub> very low affinity for D <sub>1</sub> , 5-HT <sub>2C</sub> , H <sub>1</sub> and M <sub>1</sub> receptors	D <sub>2</sub> , 5-HT <sub>2A</sub> , 5-HT <sub>2C</sub> and 5-HT <sub>7</sub> antagonist an affinity for adrenergic receptors—α <sub>1</sub> and α <sub>2</sub> lack of affinity for M receptors	full postsynaptic D <sub>2</sub> antagonist D <sub>2</sub> partial presynaptic agonist 5-HT <sub>2A</sub> antagonist D <sub>1</sub> agonist SERT inhibitor	5-HT <sub>2A</sub> and 5-HT <sub>2C</sub> inverse agonist lack of affinity for DA receptors
Indications	schizophrenia acute mania unipolar depression (adjunct)	schizophrenia unipolar depression (adjunct)	schizophrenia acute mania	schizophrenia depressive symptoms in BD (monotherapy and adjunct)	schizophrenia BD (acute mixed and manic episodes)	schizophrenia	Parkinson's disease psychosis



---

## **5. Activités de recherche pendant le post-doctorat**



Lors de mon arrivée dans son équipe, le Pr Odile Boespflug-Tanguy, s'intéressait depuis de nombreuses années déjà aux maladies génétiques touchant la substance blanche du SNC ou leucodystrophies. Son activité de recherche dans l'unité INSERM 384 Laboratoire de Biochimie Médicale (futur GRD UMR CNRS 6247-INSERM 931) adossée à son activité clinique en neuropédiatrie génétique au sein du CHU de Clermont-Ferrand l'avait conduit à mettre en évidence un *continuum* clinique, appelé PLPpathies, au sein des maladies génétiques impliquant le gène codant les protéolipoprotéines de myéline, *PLP1* (Saugier-Verber et al., 1994). Pendant de nombreuses années, le travail de l'équipe fût principalement tourné vers l'identification de nouvelles mutations responsables de leucodystrophies hypomyélinisantes\* (Vours-Barrière et al., 2003), démyélinisantes\* (Fogli et al., 2002) ou de différentes formes de paraplégies spastiques\* (Eymard-Pierre et al., 2006). Puis l'équipe se mit à développer une nouvelle thématique orientée vers la thérapeutique des leucodystrophies ; c'est sur cette thématique que j'ai été recrutée en 2006 en tant que chercheur post-doctorant, notamment pour assurer l'analyse physiopathologique de souris transgéniques modèles de PLPpathies et pour évaluer de nouvelles stratégies thérapeutiques. Ce travail de recherche a été poursuivi jusqu'en septembre 2014 et mon recrutement en tant que maître de conférences ; et ainsi terminé après le changement d'équipe du Pr Boespflug-Tanguy vers l'équipe INSERM 676 Neuroprotect à l'Université Paris Diderot. Les principaux résultats obtenus au cours de cette période seront détaillés après une présentation du contexte scientifique.

## 5.1. Contexte scientifique

### 5.1.1. La myéline du système nerveux central

#### 5.1.1.1. Fonctions

Dans le système nerveux central (SNC) la gaine de myéline est produite par les oligodendrocytes ; son enroulement compact autour de segment d'axones appelés internœuds est responsable de la conduction saltatoire de l'influx nerveux (Hartline and Colman, 2007). La présence de la gaine de myéline permet d'isoler électriquement l'axone ; ainsi le transfert de l'information nerveuse est très fortement accéléré (20 à 100 fois plus rapide), se propageant de nœud de Ranvier en nœud de Ranvier, tout en économisant l'énergie nécessaire à ce transfert (Cohen et al., 2020, Nave and Werner, 2021) (Figure 7).

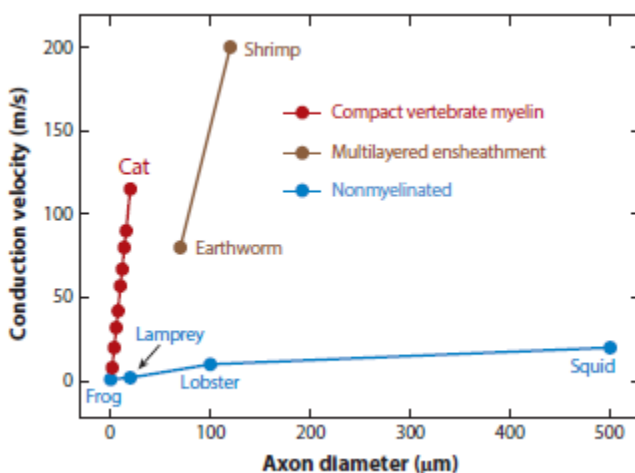


Figure 7 : La vitesse de conduction nerveuse dépend du type d'engainement et du diamètre de l'axone  
Extrait de Nave and Werner, 2021

Représentation des vitesses de conduction les plus rapides en fonction du diamètre de l'axone le plus large retrouvé dans le nerf étudié. Les valeurs des axones présentant une myéline compacte (rouge) sont données pour différents nerfs étudiés chez le chat. Les vitesses de conduction dans les axones non myélinisés ou seulement engainés (bleu) ont été mesurées chez la grenouille, la lamproie et le calamar. Les axones géants avec plusieurs couches d'engainement glial (marron) ont été mesurés chez le ver de terre et la crevette. Il est à noter que pour les axones myélinisés la vitesse de conduction est également influencée par l'épaisseur de la gaine et la longueur des internœuds.

En effet, contrairement à la propagation de proche en proche, lors de la conduction saltatoire de l'influx nerveux, les échanges ioniques permettant la propagation du signal sont concentrés au niveau

du nœud de Ranvier et le besoin énergétique permettant le retour à l'équilibre ionique (principalement par l'activation des pompes ioniques  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  ATPases) est ainsi réduit car plus localisé (Cohen et al. 2020) (Figure 8). Au niveau des axones non myélinisés, la vitesse de conduction nerveuse est globalement proportionnelle à la taille de l'axone. Ainsi, la gaine de myéline permet une vitesse de conduction rapide tout en conservant des axones de petite taille (Zalc and Colman, 2000).

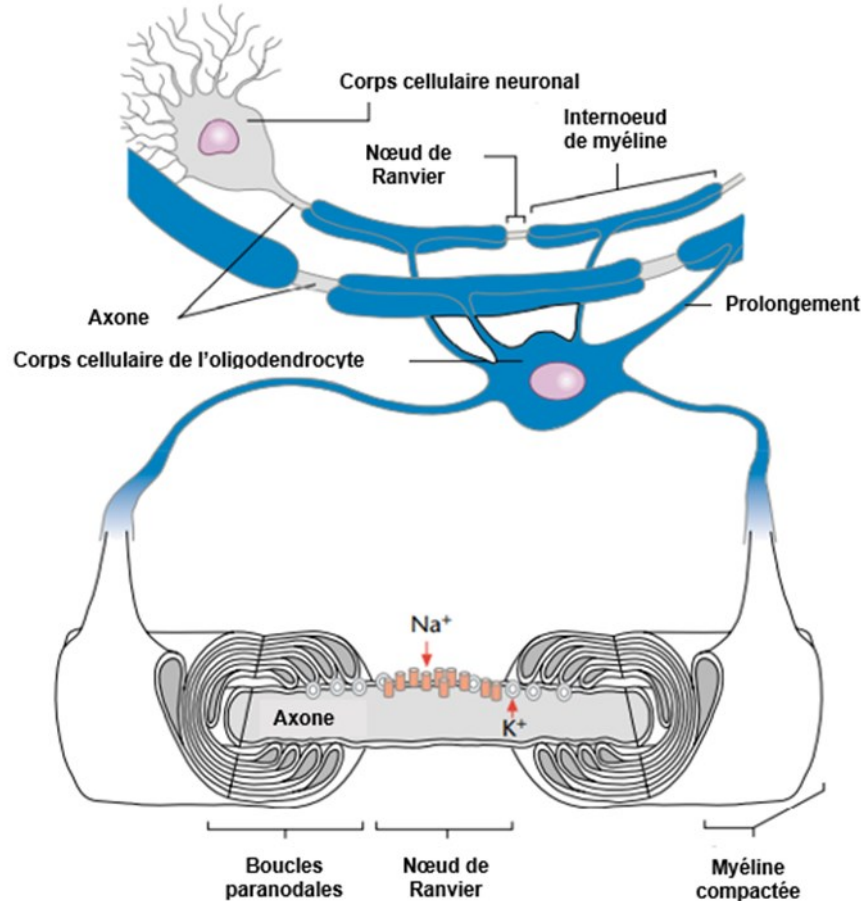


Figure 8 : Représentation schématique de la myélinisation dans le système nerveux central  
*Adapté d'Hudson et al., 2001*

L'oligodendrocyte myélinise plusieurs sections d'axones, appelées internœuds, séparés par des portions dépourvues de gaine nommés nœuds de Ranvier. Au niveau du nœud de Ranvier, il y a une concentration des échanges ioniques permettant la propagation saltatoire de l'influx nerveux.

**La fonction de la gaine de myéline ne se limite pas à ses effets sur la conduction de l'influx nerveux. Elle constitue également une enveloppe protectrice** séparant l'axone du milieu extracellulaire ou isolant les axones les uns des autres. La présence de la gaine de myéline permet alors de restreindre la transmission éphaptique, c'est-à-dire la propagation du potentiel d'action d'un axone activé à un axone adjacent (Anastassiou et al., 2011 ; Kottmeier et al., 2020). **De plus les oligodendrocytes coopèrent métaboliquement avec les axones** ; ils sont notamment impliqués dans le transfert du pyruvate/lactate qui nourrit le cycle de Krebs mitochondrial (Fünfschilling et al., 2012, Lee et al., 2012) ou l'hydrolyse du N-acétylaspartate produit par les neurones (Figure 9) (Moffett et al., 2007 ; Saab and Nave, 2017). En effet, les oligodendrocytes s'associent aux astrocytes pour transférer, via des transporteurs de monocarboxylate (MCT), les produits de dégradation du glucose (lactate/pyruvate) vers les neurones où ils sont utilisés comme substrat pour la production mitochondriale d'adénosine triphosphate (ATP) (Fünfschilling et al., 2012, Lee et al., 2012). L'apport de lactate au niveau des axones dans un contexte de traumatisme de la moelle épinière chez la souris adulte a montré une amélioration

de la régénérescence axonale et de la récupération des capacités motrices, mettant en exergue l'importance de cette fonction métabolique des oligodendrocytes pour le bon fonctionnement de l'axone (Li et al., 2020). Parmi les rôles métaboliques des oligodendrocytes incomplètement élucidés mais potentiellement très intéressants, il est possible de citer le rôle particulier que semble avoir la catalase peroxyssomale issue des oligodendrocytes dans la dégénérescence axonale (Figure 9). En effet, la délétion de l'import de la catalase vers les péroxysomes au niveau de la gaine de myéline provoque une axonopathie importante (Kassmann et al., 2007) alors que des altérations similaires dans les neurones et les astrocytes restent sans conséquence axonale au moins chez la souris (Bottelbergs et al., 2010). Autres découvertes récentes restant à explorer, l'identification de l'ARNm Fth1 comme un des transcrits les plus exprimés dans la myéline du SNC (Thakurela et al., 2016). Il code une des sous-unité lourde de la protéine de liaison au fer ferritine (FTH1/Fer1HCN) qui participerait au stockage du fer dans un état non toxique et limiterait les dommages oxydants, l'axonopathie et la mort des cellules neuronales durant le vieillissement (Mukherjee et al., 2020). Les oligodendrocytes, en association avec les autres cellules gliales, semblent également particulièrement impliqués dans l'élimination des ions produits par les neurones notamment sur les segments d'axone fortement éloignés du corps cellulaire (Marshall-Phelps et al., 2020 ; Neusch et al., 2001).

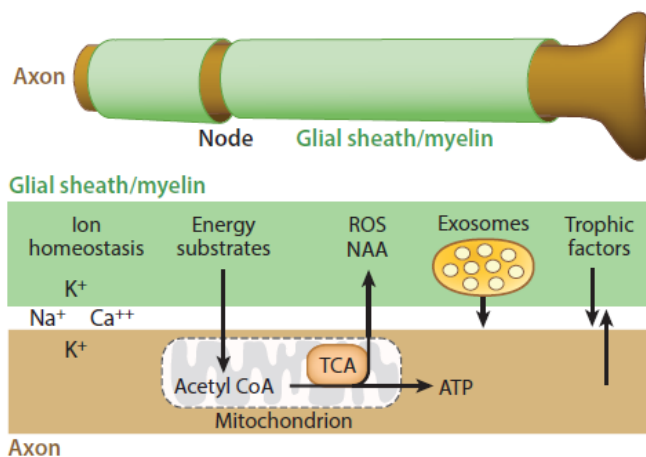


Figure 9 : Représentation des fonctions de la gaine de myéline autres que la conduction saltatoire de l'influx nerveux  
*Extrait de Nave and Werner 2021*

ATP : adénosine triphosphate, NAA : N-acétylaspartate, ROS : espèces réactives de l'oxygène, TCA : cycle de l'acide tricarboxylique ou cycle de Krebs.

**La myélinisation est un phénomène complexe, régulée par de nombreux facteurs internes ou externes aux oligodendrocytes.** Au cours du développement, la myélinisation qui débute au cours du 5<sup>ème</sup> mois de vie fœtale chez l'homme et quelques jours (environ 11) après la naissance chez le rongeur, est un phénomène massif pour lequel le moindre dysfonctionnement (anomalies génétiques, prématurité, hypoxie, ...) peut avoir des conséquences très graves et irréversibles sur le développement neurologiques (Kaindl et al., 2009 ; Gilles and Leviton, 2020). Plus tard, à l'âge adulte ce phénomène de myélinisation est beaucoup plus limité mais néanmoins actif. Il est le fait du renouvellement des gaines préalablement formées (Almeida et Lyons, 2017, Bergles et Richardson, 2016 ; Yeung et al., 2014), mais également de la myélinisation de nouveaux axones très souvent impliquée dans l'acquisition de nouveaux apprentissages (Kaller et al., 2017, Monje, 2018). **L'importance fondamentale de la myélinisation, que cela soit pour un comportement moteur rapide permettant d'échapper au prédateur ou pour l'amélioration des fonctions cognitives, est illustrée par son rôle majeur dans l'évolution des vertébrés** (Nave et al., 2021 ; Zalc et Colman, 2000). Ce phénomène est d'ailleurs un des exemples d'évolution convergente ayant eu lieu indépendamment à plusieurs reprises (au moins 5 fois dans le cas de la myélinisation) durant l'évolution des animaux bilatériens (Nave and Werner, 2021). Enfin, un faisceau d'arguments récents, suggère une implication

de la myélinisation dans les fonctions sensibles et notamment le développement de douleurs chroniques. Cet aspect sera développé dans le chapitre 7. Projets de recherche p87.

#### 5.1.1.2. Structure

La gaine de myéline est une structure cellulaire très particulière, obtenue lors de l'enroulement du cytoplasme des oligodendrocytes formant plusieurs couches compactes de membranes gliales (Masson and Nait-Oumesmar, 2023). **Ceci a pour conséquence une composition très riche en lipides et en certaines protéines plus particulièrement exprimées par les oligodendrocytes** (Stadelmann et al., 2019). Au niveau du SNC, un seul oligodendrocyte est capable de générer des internoeuds sur de nombreux axones (jusqu'à 60) (**Figure 8**).

**Parmi les protéines majeures de la myéline du SNC, une seule est spécifique de cette structure, il s'agit de la protéine basique de la myéline (MBP).** Comme son nom l'indique, cette protéine possède plusieurs résidus basiques lui permettant d'interagir avec les charges négatives des phospholipides membranaires. Ceci a pour conséquence le rapprochement des membranes adjacentes permettant l'enroulement d'une gaine progressivement compactée (Aggarwal et al., 2013 ; Stadelmann et al., 2019). Dans la gaine de myéline mature, MBP est la seconde protéine la plus abondante et le principal constituant de la ligne dense majeure observable en microscopie électronique (Figure 10). Dans les oligodendrocytes son niveau d'expression est limitant pour à la fois la biosynthèse de la gaine de myéline et son maintien (Popko et al., 1987, Meschkat et al., 2022). L'expression de MBP uniquement dans les oligodendrocytes s'explique probablement par la toxicité de ces propriétés physicochimiques pour les autres types cellulaires. Hypothèse supportée par la régulation très précise de son expression dans les oligodendrocytes : son acide ribonucléique messenger (ARNm) est transporté tout au long du prolongement cytoplasmique pour être traduit en protéine uniquement au niveau de la zone d'enroulement et de compaction de la gaine de myéline (Nave and Werner, 2021). A l'instar de MBP, deux autres protéines sont spécifiquement exprimées dans les oligodendrocytes et la gaine de myéline ; la protéine basique des oligodendrocytes associée à la myéline (MOBP) et l'opaline, mais la fonction exacte de ces molécules n'est pas encore bien caractérisée (Yool et al., 2002 ; Yoshikawa et al., 2016).

**D'autres protéines ne sont pas spécifiques de la gaine de myéline mais y sont très fortement exprimées. C'est le cas des protéolipoprotéines comprenant les isoformes PLP et DM20** qui sont des protéines hautement conservées au cours de l'évolution et constituant environ 50% des protéines de la myéline du SNC avec une expression majoritaire de l'isoforme PLP dans le SNC adulte (Werner et al., 2007). Elles appartiennent à la famille des lipophilines, protéines à 4 domaines transmembranaires, basiques et hydrophobes. Elles sont capables d'interagir avec des acides gras et notamment l'acide palmitique ce qui permet l'intégrations de ces protéines dans les feuilletts lipidiques de la gaine de myéline où elles interagissent avec d'autres composants de la myéline tels que cholestérol, les galactocérobrosides et les sulfatides pour composer les radeaux lipidiques (Figure 11).

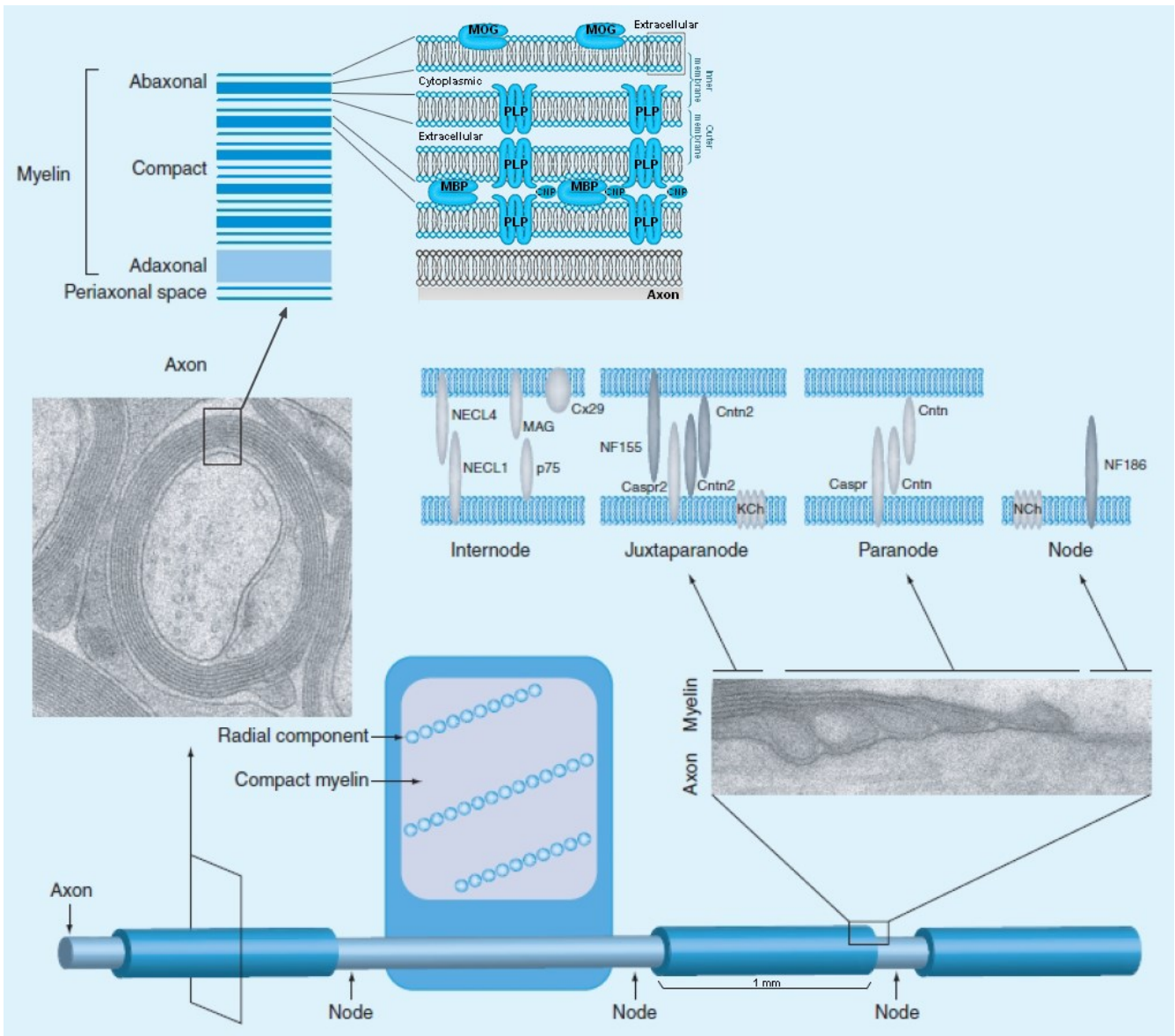


Figure 10 : Illustration schématique de la structure de la gaine de myéline.

Adapté de Werner et Jahn, 2010 et d'Aggarwal et al, 2013

La myéline compacte présente une ultrastructure périodique : elle est formée de l'apposition des faces externes de deux membranes adjacentes par le biais des protéolipoprotéines (PLP), formant la double ligne intrapériodique ; qui facilitent ensuite l'accolement des faces internes et l'extrusion du cytoplasme par le biais de la protéine basique de la myéline (MBP), formant la ligne dense majeure où est également localisée la 2', 3'-cyclic nucléotide 3'-phosphodiesterase (CNP).

Les segments d'axone myélinisés sont accolés aux nœuds de Ranvier, sites de concentration des canaux sodiques et d'initiation des potentiels d'action. A cet endroit, une zone de contact axone glie spécialisée, la jonction paranodale, sépare l'espace péri-axonale internodale du milieu extérieur. L'architecture moléculaire de la zone rappelle les jonctions synaptiques et s'appuie sur de nombreuses protéines d'adhésion qui sont liées aux canaux sodique et potassique (dans la région juxtaparanodale). La composante radiale contient la protéine de jonction serrée, claudin-11/oligodendrocyte specific protein (OSP).

Caspr : protéine associée à la contactine

Cntn : contactine

Cx 29 : connexine 29

MAG : glycoprotéine associée à la myéline

KCh et NaCh : canaux potassique et sodique

NF155/186 : neurofascine 155/186

NECL : nectine-like protein/synCAM

MOBP : protéine basique des oligodendrocytes associée à la myéline

Ainsi, une des fonctions de PLP est d'enrichir la gaine de myéline en cholestérol ce qui donne une plus grande flexibilité aux membranes de myéline adjacente leur permettant de glisser les unes contre les autres lors de l'enroulement. Néanmoins, l'analyse des modèles transgéniques avec invalidation du gène *Plp1* ont montré que la présence de PLP/DM20 n'est pas nécessaire à la formation de la gaine de myéline mais semble jouer un rôle très important pour maintenir une compaction correcte de la structure (Klugmann et al., 1997 ; Garbern et al., 1997). Par leur intégration transmembranaire, PLP/DM20 seraient impliquées dans la compaction de la myéline par interaction protéique des protéines PLP entre-elles au niveau de l'apposition des faces extracellulaires des membranes myéliniques composant les lignes intrapériodiques (Figure 10). Les souris porteuses d'une invalidation du gène *Plp1* présentent également une dégénérescence axonale suggérant un rôle essentiel de PLP dans la survie de l'axone et dans les interactions axones-oligodendrocytes mais il n'est pour le moment pas possible de préciser si ce rôle est primaire via une interaction PLP/axone ou secondaire à la dysmyélinisation (Garbern et al., 1997, 2002 ; Griffiths et al., 1998 ; Wang et al., 2008). Cependant, l'implication de PLP/DM20 dans l'inclusion membranaire de sirtuine 2 (SIRT2), une déacétylase NAD<sup>+</sup> dépendante qui permettrait de maintenir la déacétylation de certaines protéines assurant la stabilité des microtubules, renforce l'idée d'interactions directes entre l'axone et l'oligodendrocyte via PLP (Werner et al., 2007). **Ces interactions pourraient passer par une fonction neuroprotectrice de PLP/DM20 dans le SNC des mammifères, indépendant de sa fonction de compaction de la myéline** (Wang et al., 2008).

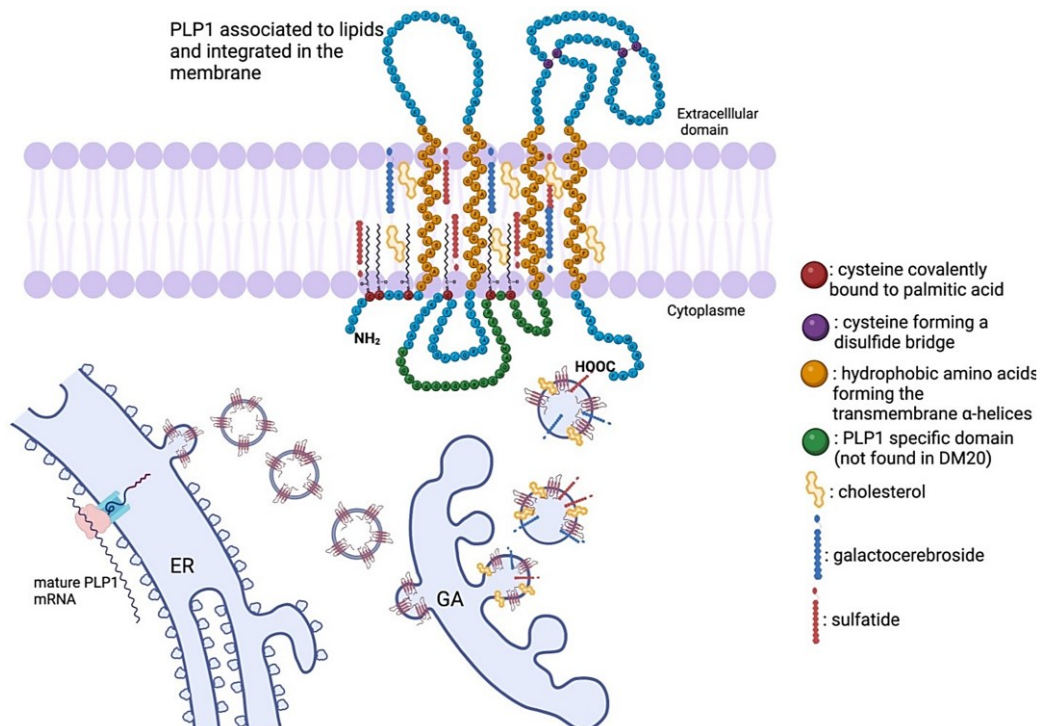


Figure 11 : Etapes de production de la protéolipoprotéine PLP de l'ARNm à la protéine transmembranaire fonctionnelle

*Extrait de Khalaf et al., 2022*

L'ARNm mature codant les protéolipoprotéines est transloquée dans le réticulum endoplasmique (ER). Après cela, la protéine immature formée est transportée dans l'appareil de Golgi (GA), où elle est associée aux composants lipidiques de la myéline tels que le cholestérol, les galactocérobrosides et les sulfatides pour former les radeaux lipidiques. Alors, ces radeaux sont entraînés en direction de la membrane cellulaire pour former la gaine de myéline. PLP est une protéine fortement hydrophobe à quatre domaines transmembranaires. Des acides palmitiques sont liés de façon covalente à la protéine au niveau des 6 résidus cystéine.

**De plus, si les protéolipoprotéines sont majoritairement exprimées dans la myéline du SNC, leur expression a également été mise en évidence dans de nombreux autres tissus** (avec des niveaux d'expression bien plus faible). Au niveau du SNC, elles sont exprimées dans les cellules gliales engainantes de l'épithélium olfactif, certains neurones du tronc cérébral, du cervelet et de l'hippocampe (Bongarzone et al., 1999 ; Khalaf et al., 2022). Au niveau du système nerveux périphérique (SNP), elles sont retrouvées dans les cellules de Schwann et les cellules satellites ; elles sont également retrouvées dans des tissus non nerveux tels que le cœur, la thyroïde, le trophoblaste et le thymus foetal, la peau et les spermatogonies avec alors une expression majoritaire de l'isoforme DM20. Le rôle des protéolipoprotéines dans ces tissus reste néanmoins inconnu (Khalaf et al., 2022). Enfin, d'autres protéines sont exprimées à différents niveaux parmi lesquelles nous pouvons citer : la 2',3'-Cyclic-nucleotide 3'-phosphodiesterase (CNPase), les connexines 29, 32 et 47, les protéines de jonction serrée claudine 11 et 19 ou les protéines d'adhésion cellulaire de type immunoglobuline telles que la glycoprotéine associée à la myéline (MAG) ou la protéine zéro de la myéline (MPZ). Cependant les fonctions et la localisation de ces protéines ne seront pas développées dans ce travail.

### **5.1.2. Les PLPpathies, un continuum clinique d'atteintes de la substance blanche associées à des anomalies du gène *PLP1***

**Le terme leucodystrophie, du grec : « leukos » (blanc) « dys » (trouble) et « trophê » (nourriture), regroupe un ensemble de maladies génétiques rares provoquant une atteinte primitive de la substance blanche du SNC.** Elles se caractérisent toutes par une atteinte de la myéline, et en fonction de la nature de cette atteinte, différentes formes de leucodystrophies sont décrites. Les **leucodystrophies dysmyélinisantes** pour lesquelles, la myéline d'abord formée correctement va être dégradée suite à un mauvais fonctionnement des enzymes du péroxysome (**leucodystrophies peroxysomales** telles que l'adrénoleucodystrophie ou de l'adrénomyéloneuropathie), des enzymes du lysosome (**leucodystrophies lysosomales** telles que la leucodystrophie métachromatique ou la maladie de Krabbe) ou suite à une atteinte diffuse de la substance blanche n'affectant pas que la gaine de myéline (**leucodystrophies dites cavitaires** telles que la maladie d'Alexander ou l'ataxie infantile avec hypomyélinisation centrale). La seconde grande catégorie regroupe **les leucodystrophies hypomyélinisantes** au cours desquelles, la gaine de myéline présente des anomalies dès sa mise en place en fin de gestation et pendant la très petite enfance. Dans certaine maladie, où l'atteinte de la myéline est très précoce mais ne touche pas la quantité mais la qualité de la myéline, il est possible de parler de **leucodystrophie dysmyélinisante** (Boespflug-Tanguy et al., 2008 ; Wolf et al., 2021).

Comme cela a été dit en introduction, l'équipe du Pr Boespflug-Tanguy a été la première à mettre en évidence un *continuum* clinique, appelé PLPpathies, au sein des maladies génétiques impliquant le gène codant les protéolipoprotéines de myéline, *PLP1* localisé en Xq22. **Ce continuum s'étend des formes les plus sévères de la maladie de Pelizaeus-Merzbacher (PMD),** pour lesquels les patients atteints ont un développement psychomoteur extrêmement limité et une espérance de vie très réduite (décès avant 10 ans), **à la paraplégie spastique de type 2 (SPG2)** pour laquelle les patients après une acquisition motrice quasi normale jusqu'à l'âge de 2 ans développent des troubles moteurs tardifs tout en conservant une survie normale (Saugier-Veber et al., 1994 ; Khalaf et al., 2022). Cinq formes de maladie ont donc été définies en fonction du niveau des acquisition motrice du patient : 4 pour les différents niveaux de sévérité de PMD et un 5<sup>ème</sup> pour la SPG2 (forme 4). Les différentes formes de PMD sont les suivantes : forme 0 aucune acquisition motrice, forme 1 tenue de tête, forme 2 tenue assise et forme 3 tenue debout/marche avec aide (Figure 12). La majorité des enfants atteints

de PMD acquièrent la tenue de tête, parfois la tenue assise et rarement la marche avec aide (Cailloux et al., 2000). La maladie de Pelizaeus-Merzbacher (PMD) est la leucodystrophie hypomyélinisante la plus fréquente avec une prévalence estimée à 1 naissance sur 400 000.

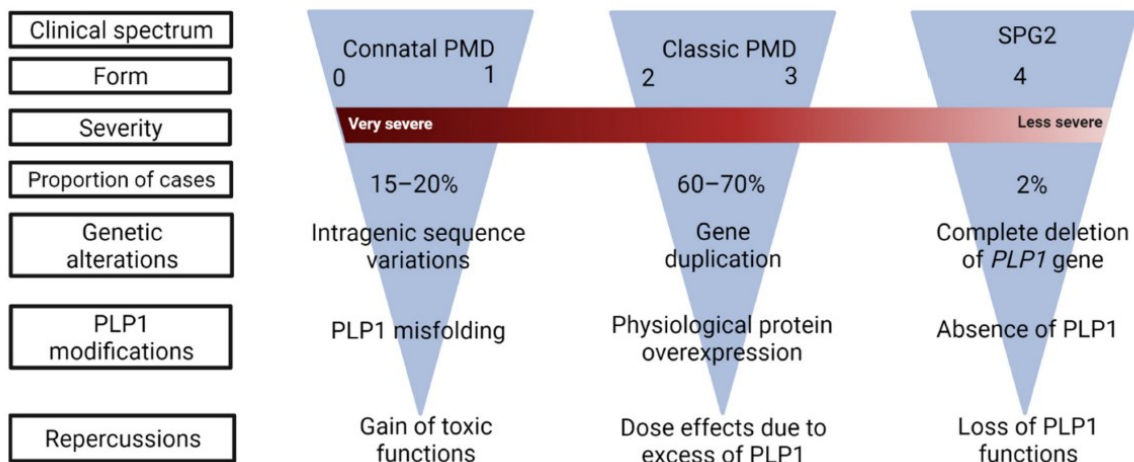


Figure 12 : Classification clinique des PLPpathies  
Extrait de Khalaf et al., 2022

Les PLPpathies sont un *continuum* clinique de maladies allant de la forme la plus sévère de la maladie de Pelizaeus-Merzbacher (PMD) à la paralysie spastique de type 2 (SPG2) forme la plus modérée du *continuum*. Pour chaque forme de PLPpathie, l'anomalie génétique la plus fréquemment retrouvée est citée ainsi que la conséquence neuropathologique associée.

**Les anomalies génétiques touchant le gène *PLP1* sont nombreuses** passant de la délétion à la duplication (des cas de triplication ont même été observés) en passant par un très grand nombre de mutations ponctuelles (la plupart spécifiques à une famille de patient). **Malgré cette grande hétérogénéité génétique, il est possible d'établir une corrélation génotype/phénotype relativement fiable** qui s'explique par les conséquences neuropathologiques provoquées par les différents types d'anomalie génétique (Figure 12). **Les mutations faux-sens dans la séquence codantes du gène *PLP1* modifiant des acides aminés très conservés de la protéine ou provoquant des protéines tronquées avec de fort changements sur l'extrémité C-terminale sont responsables des formes les plus sévères de la maladie appelée formes connatales de PMD (PMD 0 et 1) retrouvées chez environ 15% des patients (Figure 13).** **Les protéines mutantes s'avèrent toxiques pour les oligodendrocytes** ; elles déclenchent un stress du réticulum endoplasmique, l'activation de la réponse aux protéines non repliées (UPR pour Unfolded Protein Response en anglais) et finalement la mort rapide des oligodendrocytes par apoptose provoquant une hypomyélinisation très sévère. A l'inverse **les mutations tronquantes (celles provoquant un décalage du cadre de lecture ou les mutations nonsense) tout comme les délétions du gène** sont responsables d'une absence d'expression de la protéine PLP (protéine non traduite ou rapidement dégradée). Comme cela a été dit précédemment, l'absence de PLP n'est pas tout de suite délétère pour la formation de la gaine de myéline mais conduit avec le temps au développement d'une dégénérescence axonale. **Ces mutations sont donc responsables des formes modérées de la maladie (PMD 4) retrouvées chez 10% à 15% des patients (Figure 13).**

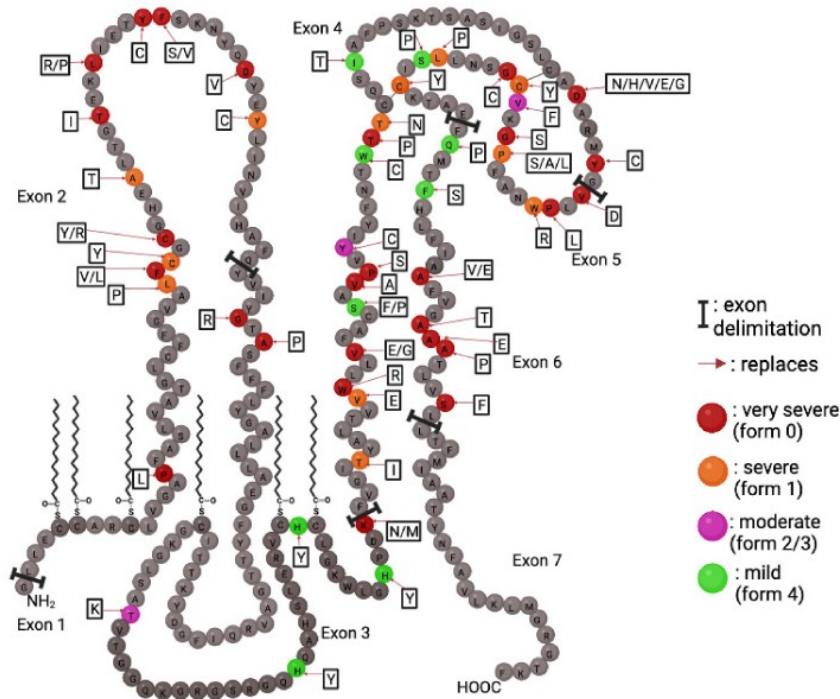


Figure 13 : Répartition des mutations ponctuelles sur le gène *PLP1* et représentation schématique de la sévérité du phénotype clinique provoqué  
*Extrait de Khalaf et al., 2022*

Les mutations ponctuelles sont colorées en fonction de la sévérité du phénotype clinique provoqué ; ces mutations peuvent intervenir sur les 7 exons du gène *PLP1*. Les changements provoqués au niveau de la séquence des acides aminés sont notés dans les cadres noirs adjacents.

**Enfin, les duplications qui sont les anomalies génétiques les plus fréquentes (environ 70% des patients) vont conduire à une surexpression des protéolipoprotéines.** Ces dernières sont déjà synthétisées en très grande quantité au moment de la myélinisation ; elles deviendront alors toxiques par séquestration avec le cholestérol et accumulation dans l'endosome tardif et les lysosomes ce qui empêche le bon fonctionnement de l'oligodendrocyte puis sa mort (et donc une forte hypomyélinisation). **Ces duplications sont ainsi responsables des formes 2 et 3 de la maladie,** tandis que les rares triplications seraient responsables de formes plus sévères (l'accumulation toxique de protéine étant probablement plus rapide) (Inoue et al., 2005 ; Khalaf et al., 2022).

**Les traitements disponibles pour les leucodystrophies sont extrêmement limités et aucun d'entre eux ne permet de soigner définitivement la maladie.** Les patients reçoivent des médicaments permettant de réduire certains de leurs symptômes : antiépileptiques, traitements de la spasticité. Les patients développant des scoliose sévères sont opérés et lorsque la pathologie progresse et que des troubles sévères de la déglutition se développent, une gastrostomie (intervention consistant à réaliser, au niveau de l'abdomen, un orifice faisant communiquer l'estomac avec l'extérieur, ici pour y adjoindre une sonde d'alimentation) est réalisée. Pour certains patients, un régime cétogène (très pauvre en glucide et riche en lipide) est parfois mis en place avec une efficacité clinique difficile à évaluer. Depuis quelques années, la possibilité de thérapies géniques ou de thérapies cellulaires ont été évaluées dans des modèles animaux et parfois chez les patients avec pour certaines leucodystrophies (mais pas les PLPpathies) des résultats très encourageants (Bradbury and Ream, 2021). Les pistes et essais thérapeutiques dans le cadre des PLPpathies seront décrits plus en détail dans la partie résultats et perspectives de ce chapitre.

### **5.1.3. Les modèles animaux de PLPpathies**

Comme pour d'autres maladies génétiques rares et notamment d'autres leucodystrophies, les modèles animaux ont permis de significativement améliorer la compréhension de la physiopathologie des PLPpathies. **Les premiers modèles animaux étaient des mutants spontanés tels que la souris jimpy** décrite pour la première fois en 1954, étudiée pour sa pathologie dysmyélinisante à partir de 1964 et pour laquelle une mutation ponctuelle sur le gène *Plp1* a été identifiée en 1986 (Phillips, 1954 ; Sidman et al., 1964 ; Dautigny et al., 1986). Par la suite, d'autres mutants spontanés ont été identifiés et étudiés chez la souris (jimpy 4j, rumshaker), le rat, le chien et plus récemment le singe (Khalaf et al., 2022). En parallèle, l'identification des anomalies génétiques chez les patients a permis de développer des modèles murins transgéniques possédant les mêmes anomalies génétiques que les patients. **En 1994 le laboratoire de Klaus Armin Nave à Göttingen développe deux lignées de souris surexprimant le gène *Plp1*** : la lignée +PlpTg<sup>66/66</sup> possédant à l'état homozygote 14 copies de *Plp1* supplémentaires et la lignée +PlpTg<sup>72/72</sup> possédant à l'état homozygote 6 copies de *Plp1* supplémentaires (Readhead et al., 1994). La première lignée développe une hypomyélinisation sévère et précoce associée à un décès prématuré avant 3 mois mimant les formes sévères de PMD (0-1) tandis que la seconde développe un phénotype plus modéré mimant les formes modérées des PMD (2-3). Quelques années plus tard, la même équipe développera une souris présentant une invalidation du gène *Plp1*, la souris PLP<sup>-/-</sup> ou Plp null qui présente une myéline en quantité normale, mais de mauvaise qualité car mal compactée, conduisant au développement d'une neurodégénérescence axonale secondaire (Klugmann et al., 1997). Ce nouveau modèle murin mime la forme la plus modérée des PLPpathies à savoir SPG2. Ces modèles animaux seront plus détaillés dans la partie résultats de ce chapitre.

## **5.2. Principaux résultats**

Lors de mon arrivée dans l'équipe en 2006 mon projet post-doctoral avait pour objectif d'évaluer sur des modèles murins l'efficacité de stratégies thérapeutiques ciblées sachant que jusqu'à présent, les PLPpathies en étaient dénuées. Très rapidement, afin d'identifier d'autres stratégies thérapeutiques potentielles, un deuxième objectif s'est ajouté, celui d'améliorer la compréhension de la physiopathologie des PLPpathies via l'étude comportementale et anatomopathologique des modèles des différentes formes cliniques. Afin de mener à bien ces deux objectifs, j'ai dû aménager au sein de l'unité de stabulation animale des facultés de Médecine et de Pharmacie une salle permettant l'évaluation comportementale des 2 modèles de souris transgéniques développées au Max Planck Institut de Göttingen : la souris +PlpTg<sup>66/66</sup> (appelé pour simplifier +PlpTg dans la suite du manuscrit) et la souris Plp null avec inactivation du gène *Plp* qui modélise SPG2 (Griffiths et al., 1998 ; Klugmann et al., 1997). La mise en place de ce projet a également nécessité le développement sur Clermont-Ferrand de l'évaluation de la qualité de la myéline et de l'axone en microscopie électronique. Ce développement a été réalisé en collaboration avec le CICS de la faculté de médecine. Afin d'obtenir le savoir-faire nécessaire pour la réalisation technique et l'analyse des images obtenues j'ai été me former une semaine à Strasbourg en 2007 dans le laboratoire du Dr Said Gandhour puis 3 semaines à Göttingen en 2011 dans le laboratoire du Pr Klaus Armin Nave. Ces deux laboratoires maîtrisant parfaitement ces techniques depuis de nombreuses années.

## **5.2.1. Développement de stratégies thérapeutiques pour les PLPpathies**

### 5.2.1.1. Test de l'effet neuroprotecteur du peptide NX sur un modèle de dégénérescence axonale chronique héréditaire

Le premier développement de stratégie thérapeutique a été financé par une bourse de recherche technologique attribuée par la région Auvergne dans le cadre d'une collaboration entre la société NEURONAX® et l'équipe du Pr Odile BOESPFLUG-TANGUY pour 1 an.

La société NEURONAX® était une entreprise de biotechnologie émergente destinée à valoriser les effets de peptides dérivés d'une protéine exprimée pendant le développement embryonnaire et faisant partie d'une famille de molécules de la matrice extracellulaire ; la SCO-spondine (Brevet INSERM/université d'Auvergne). Le peptide NX s'est avéré particulièrement intéressant du fait de son efficacité *in vitro* sur la croissance axonale et la fasciculation des neurones et *in vivo* sur des modèles de traumatisme de la moelle épinière (Gobron et al., 2000 ; données personnelles Neuronax).

Le projet avait pour but de tester l'effet du peptide NX *in vivo* sur la dégénérescence axonale des voies cortico-spinales observées chez les souris Plp null. Malheureusement, les résultats comportementaux et histologiques n'ont pas permis d'apporter de résultats concluants sur l'efficacité du traitement, et la courte durée du financement n'a pas permis de mettre en place de nouveaux protocoles.

### 5.2.1.2. Identification de marqueurs d'évaluation *in vivo* et *post-mortem* de l'efficacité des stratégies thérapeutiques

En parallèle de la mise en place de cette première étude thérapeutique sur les souris dysmyélinisées j'ai participé à l'identification de marqueurs d'évaluation *in vivo* et *post-mortem* de l'efficacité de ces stratégies. Dans ce but nous avons mis en place des techniques de quantification de l'atteinte myélinique et de la dégénérescence axonale en imagerie de diffusion et en microscopie électronique.

L'analyse en imagerie de diffusion de la moelle épinière, réalisée sur un modèle vertical 9,4 tesla Avance DRX400 de la marque Bruker, a mis en évidence chez les mâles Plp null âgés de 12 mois des modifications des paramètres de diffusion au niveau de la moelle cervicale à la fois au niveau de la substance blanche mais également de la substance grise. Ces anomalies de la diffusion semblent corrélées avec des atteintes anatomiques mises en évidence lors d'étude *post mortem* sur les mêmes animaux à savoir : des troubles de compaction de la myéline associés à des boursoufflements axonaux dans la substance blanche et une dégénérescence des corps cellulaires neuronaux dans la substance grise. Au cours de ce travail, j'ai travaillé en interaction avec la plateforme d'imagerie du petit animal de l'INRA de Theix qui a réalisé les acquisitions imagerie par résonance magnétique (IRM) et service central de microscopie électronique de l'Université de Strasbourg qui a réalisé les études en microscopie électronique.

Ce travail a donné lieu à une publication dans Neuroimage.

*Ben Hassen W, Bégu M, Traore A, Ben Moussa A, Boehm N, Ghandour MS, Renou JP, Boespflug-Tanguy O, Bonny JM. Characterisation of spinal cord in a mouse model of spastic paraplegia related to abnormal axono-myelin interactions by in vivo quantitative MRI. Neuroimage. 2009 May 15 ;46(1) :1-9.*

Une étude similaire a été initiée chez les souris +PlpTg et les premiers résultats ont confirmés la capacité de l'imagerie en diffusion pour quantifier l'hypomyélinisation sévère dans les faisceaux de

substance blanche de ces animaux. Cette étude réalisée également au niveau de la moelle épinière cervicale a notamment permis de mettre en évidence pour la première fois des anomalies de diffusion dans la substance grise des souris +PlpTg (Figure 14). Celles-ci pourraient être provoquées par des anomalies cellulaires importantes telles qu'une diminution du volume tissulaire, une prolifération astrocytaire marquée et une augmentation de la taille des mitochondries comme l'a montré des études neuropathologiques réalisés chez les mêmes animaux (Figure 15). Malheureusement, l'étude d'imagerie n'a pas été terminée avant la fin de la thèse de Wadie Ben Hassen et ces travaux incomplets n'ont pas été publiés.

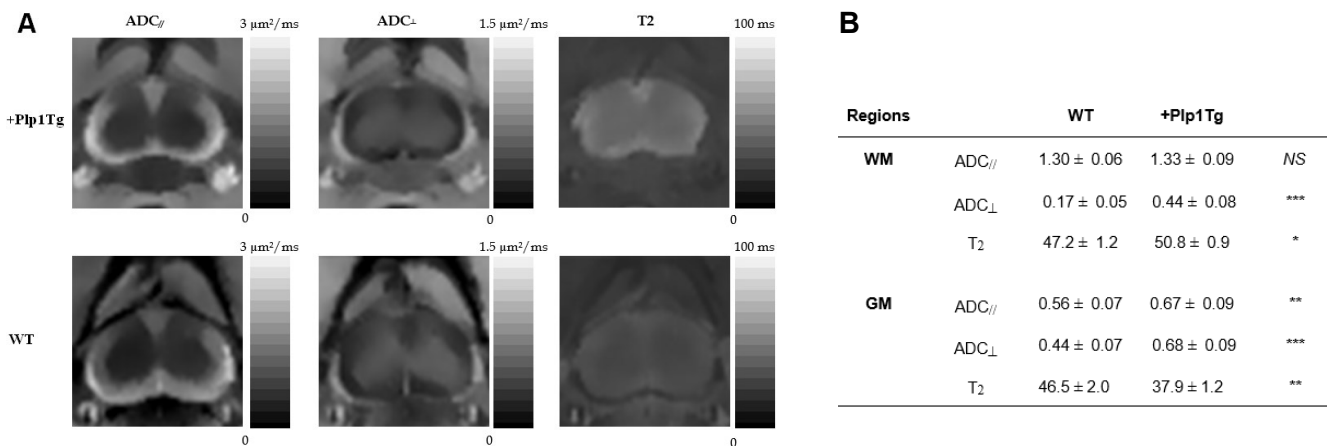


Figure 14 : Cartes et quantifications d'ADC//, ADC⊥ et T2 obtenues en imagerie de diffusion au niveau de la moelle épinière cervicale (C4) des souris WT et +Plp1Tg.  
*Données non publiées*

A - Cartes d'ADC//, ADC⊥ et T2 obtenues *in vivo* au niveau de la moelle épinière cervicale (C4) des souris WT et +Plp1Tg. Chaque carte paramétrique illustre un contraste significatif entre la substance blanche et la substance grise.

B - Comparaison des coefficients de diffusion apparent (ADC) parallèle (//) et perpendiculaire (⊥), ainsi que des temps de relaxation T2 dans la moelle épinière cervicale des souris WT et +Plp1Tg (B). Les résultats sont présentés en moyenne +/- déviation standard. Unités :  $\mu\text{m}^2$  pour les ADC et ms pour les T2. \*  $p < 0,05$  ; \*\*  $p < 0,01$  ; \*\*\*  $p < 0,001$  ; NS : non significatif ; test ANOVA.

### 5.2.1.3. Stratégie de thérapie génique (morpholinos antisens) visant à diminuer l'expression de PLP chez les souris +PlpTg

Ce projet d'abord financé par la fondation Neurodis, a ensuite été financé dans le cadre du projet européen FP7 Health « Leukotreat ».

Le but de ce travail était de diminuer l'expression de PLP dans les oligodendrocytes des souris +PlpTg. Lorsque ce projet a débuté, il n'existait pas de vecteurs viraux capables de cibler efficacement les oligodendrocytes *in vivo*. C'est la raison pour laquelle nous avons fait le choix de tester les morpholinos développés par la société Gene-Tools® comme stratégie de silencing (Summerton and Weller, 1997). Les morpholinos sont des oligonucléotides antisens capables, par leur analogie avec les acides nucléiques, de se fixer au site d'initiation de la traduction d'un gène cible et de bloquer ainsi (par encombrement stérique) l'expression de ce gène. Les propriétés structurales des morpholinos les rendent stables dans les liquides biologiques, très affins pour leur séquence d'acide désoxyribonucléique complémentaire (ADNc), extrêmement soluble en solution aqueuse, inactif vis-à-vis des protéines environnantes, simples et efficaces à délivrer en culture (Summerton JE, 2007). Ces morpholinos ont montré une bonne biodisponibilité et une bonne efficacité *in vivo* dans plusieurs modèles souris de maladies génétiques.

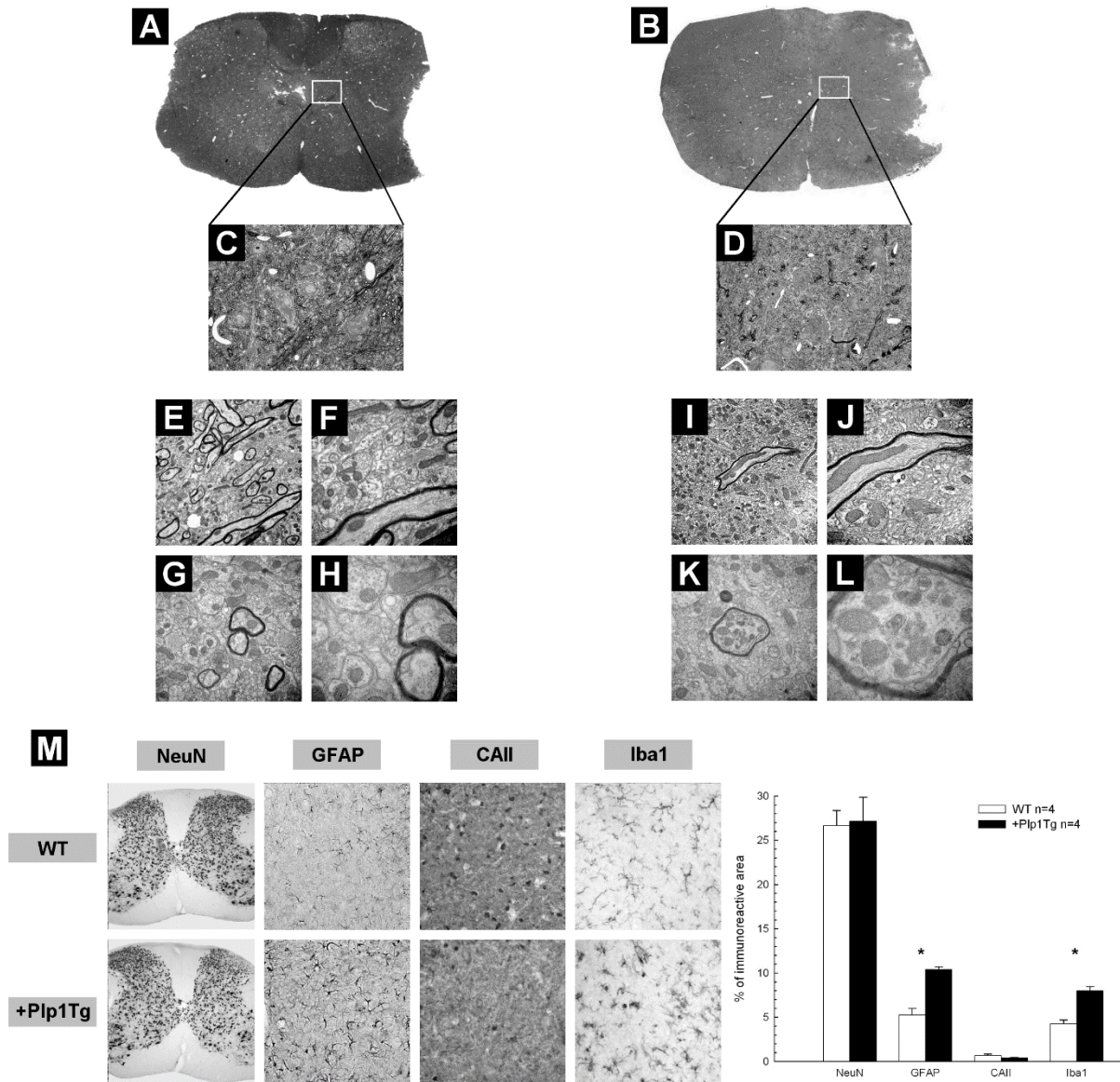


Figure 15. Etude histologique de la substance grise de la moelle épinière cervicale des souris sauvages (WT) et surexprimant *Plp1* (+PIP1Tg)

*Données non publiées*

Sections de moelle épinière cervicale de 700nm d'épaisseur de souris WT (A, C) et +PIP1Tg (B, D) colorées au bleu de toluidine. La substance grise médiane a été photographiée en utilisant un grossissement x4 (A, B) et x100 (C, D). Une hypomyélinisation sévère est observée chez les souris +PIP1Tg tandis que les neurones semblent préservés.

Microscopies électroniques de la substance grise des souris WT (E-H) et +PIP1Tg (I-L). De nombreux faisceaux de petits axons bien orientés dans la direction rostro-caudale et fortement myélinisés sont observés chez les souris WT ; les mêmes faisceaux sont démyélinisés chez les souris +PIP1Tg. Quelques axones en cours de dégénérescence avec des corps multivésiculaires sont observés chez les souris +PIP1Tg. Grossissement x10 000 (E, I), x25 000 (F, G, J, K), x60 000 (H) et x100 000 (L).

Illustrations des immunomarquages des principales cellules constituant la substance grise des souris WT et +PIP1Tg, i.e. les corps cellulaires des neurones (NeuN), les astrocytes (GFAP), les oligodendrocytes (CAII) et les cellules microgliales (Iba1) ; grossissement x4 pour NeuN et x20 pour tous les autres marquages (M). Comparaison des densités cellulaires des principales cellules constituant la substance grise des souris WT et +PIP1Tg (M). \* $p < 0.05$ , test de Mann-Whitney.

Dans un premier temps, nous avons testé l'efficacité du morpholino pour diminuer l'expression d'une protéine rapporteur fluorescente verte (EGFP pour enhance green fluorescent protein en anglais). Les premières expériences *in vitro* dans un modèle de culture primaire d'oligodendrocytes issus de souris proPLP-EGFP exprimant donc ce rapporteur dans les oligodendrocytes (Mallon et al., 2002) ont montré l'efficacité du produit. Puis, l'efficacité du morpholino pour diminuer l'expression de PLP dans des cultures primaires d'oligodendrocytes issus de souris +PlpTg a été démontré. Les premières études *in vivo*, chez les souris proPLP-EGFP, ont montré qu'une injection unique de morpholino dans le parenchyme du nouveau-né était capable en quelques jours de réduire l'expression de l'EGFP au voisinage du site d'injection mais que la diffusion de l'effet était limitée. Nous avons alors testé une formulation particulière du morpholino développée également par la société Gene-Tools® appelée vivo-morpholino. Il s'agit d'un morpholino couplé à un peptide de pénétration cellulaire (groupement guanidium) ce qui favorise sa diffusion *in vivo*. Nous avons testé ce produit en parallèle *in vitro* sur culture primaire d'oligodendrocyte et *in vivo* par injection par voie intrathécale et mis en évidence une forte toxicité de cette formulation pour les deux modes d'administration. Devant les difficultés techniques rencontrés et le développement à ce moment-là de vecteurs viraux capables de cibler efficacement les oligodendrocytes *in vivo*, l'approche de thérapie génique par l'utilisation des morpholino a été arrêtée.

5.2.1.4. Evaluation d'une nouvelle molécule neuroprotectrice le Tro19622 ou Olesoxime dans nos deux modèles de souris transgéniques

Par la suite, mon projet s'est orienté vers l'évaluation de stratégie thérapeutique permettant de ralentir le développement de la maladie sans cibler la cause génétique de celle-ci. Un premier projet a été initié en collaboration avec la société Trophos dans le cadre du projet européen FP7 Health « Leukotreat ». Le Tro19622 ou Olesoxime est une petite molécule découverte par la société Trophos ayant montré une forte activité de neuroprotection et de promotion de la croissance axonale dans des modèles de cultures de motoneurons (Bordet et al., 2007). Cet effet neuroprotecteur a ensuite été confirmé *in vivo* dans des modèles de sclérose latérale amyotrophique ou de douleur neuropathique induite par le diabète (Bordet et al., 2007 ; Bordet et al., 2008). Plus récemment, il a été montré que l'olesoxime accélère la maturation des oligodendrocytes et favorise la myélinisation *in vitro* et *in vivo* (Magalon et al., 2012). Bien que le mécanisme d'action exacte de ce composé ne soit pas totalement identifié, il semble que son efficacité pourrait être provoquée par l'inhibition du pore de transition de perméabilité mitochondriale, un complexe multiprotéique formant un canal au point de contact entre les membranes interne et externe des mitochondries, régulant l'apoptose mitochondriale via la libération de calcium et de cytochrome c. Cette action est permise par l'interaction de l'olesoxime avec le canal anionique voltage-dépendant (VDAC) et la protéine translocatrice de 18 kDa (TSPO) deux composants essentiels du pore (Figure 16). Une autre action potentielle de l'olesoxime serait de réduire la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) ; VDAC et TSPO étant également impliqués dans la modulation du stress oxydant (Bordet et al., 2010 ; Weber et al., 2019). La structure chimique de l'olesoxime proche de celle du cholestérol laisse également suggérer de possibles effets proches de ceux du cholestérol (cholesterol-like) notamment pour les effets sur la gaine de myéline. Cependant, ces effets cholesterol-like n'ont jamais pu être démontrés expérimentalement. Enfin, il a récemment été suggéré que l'olesoxime pourrait moduler les flux calciques au sein de la mitochondrie et ainsi réguler l'homéostasie calcique très souvent dérégulées dans les pathologies neurodégénératives (Weber et al., 2019).

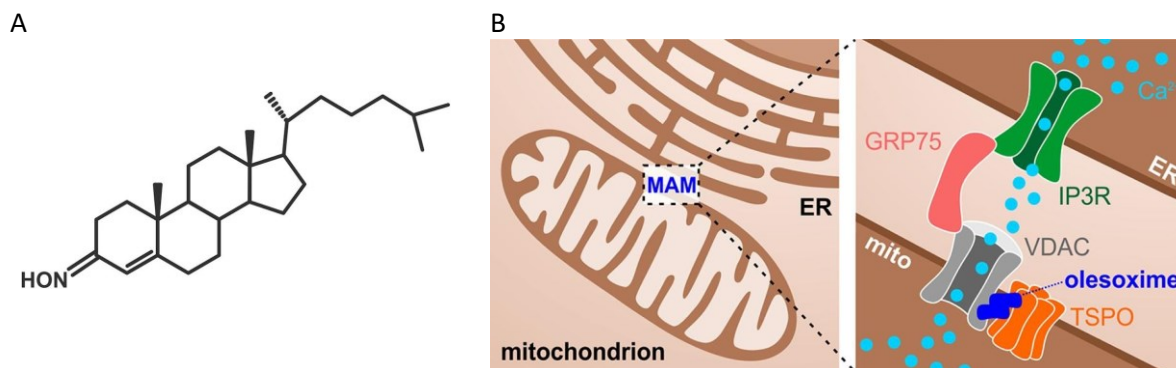


Figure 16 : Mécanisme d'action potentiel de l'olésoxime sur l'homéostasie calcique  
Extrait de Weber et al., 2019

A – Structure chimique de l'olésoxime (TRO19622 ou cholest-4-en-3-one-oxime) est un dérivé du cholestérol présent sous la forme d'un mélange stable d'isomères syn et anti.

B – l'olésoxime pourrait exercer son mécanisme d'action neuroprotecteur en influençant l'homéostasie du calcium intracellulaire. Cette action pourrait intervenir à l'interface entre le réticulum endoplasmique (ER) et la mitochondrie (MITO) appelé membrane associée à la mitochondrie (MAM) où des échanges calciques ont lieu entre le récepteur de l'inositol triphosphate (IP3R) et le canal anionique voltage-dépendant (VDAC) par l'intermédiaire d'une protéine chaperonne (GRP75). En se fixant à VDAC et son régulateur la protéine translocatrice de 18 kDa (TSPO), l'olésoxime limiterait cet échange et ainsi *in fine* l'entrée de calcium dans la matrice mitochondriale.

L'olésoxime a tout d'abord été évalué dans le modèle +PlpTg. Les animaux contrôles et mutés ont été traités dès la naissance par le biais du lait maternel ; leurs mères étant soumises à un traitement *per os* par ingestion de croquettes contenant 600µg d'olésoxime par g de croquette (soit une dose journalière approximative de 100 mg/kg). Au moment du sevrage des animaux, ceux-ci étaient traités directement en utilisant les croquettes contenant de l'olésoxime. L'effet de l'olésoxime a été évalué sur : la survie, le poids et les troubles comportementaux des souris +PlpTg, et n'a pas montré d'effet bénéfique sur l'ensemble de ces paramètres (Figure 17).

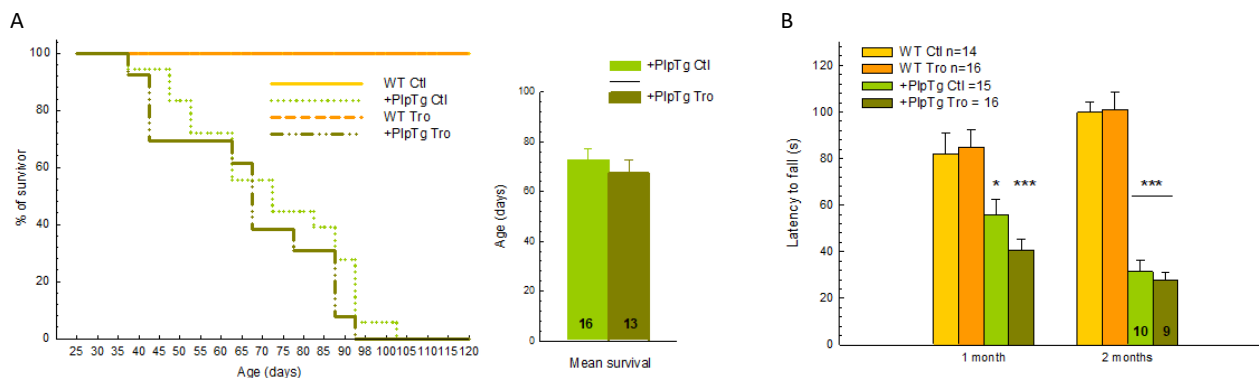


Figure 17 : L'olésoxime n'a pas d'effet sur la survie ni les déficits moteurs des souris surexprimant PLP.  
Données non publiées

A – Courbe de survie des animaux sauvage (WT) et surexprimant PLP (+PLP-Tg). Les souris +PLP-Tg ont en moyenne une espérance de vie de 70j qui n'est pas améliorée par le traitement à l'olésoxime.

B- Les performances motrices des souris WT et +Plp Tg ont été évaluées avec le test du rotarod. Les résultats sont exprimés pour chaque condition en moyenne de latence de chute ± SEM obtenues lors des 5 essais réalisés sur le rotarod pour chaque souris. Analyse ANOVA mesures répétées puis test PLSD Fisher \* p<0,05 and \*\*\* p<0,001.

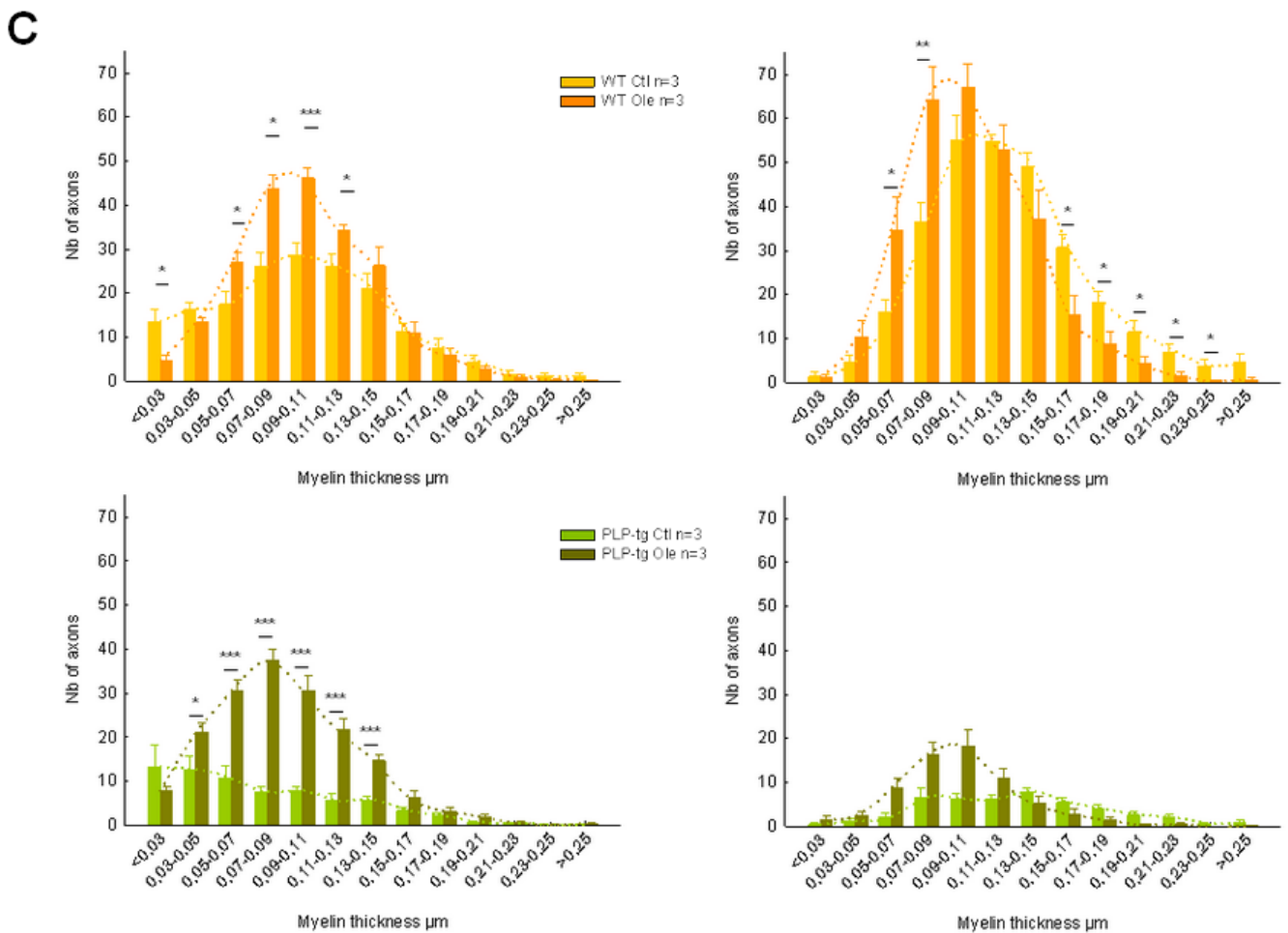
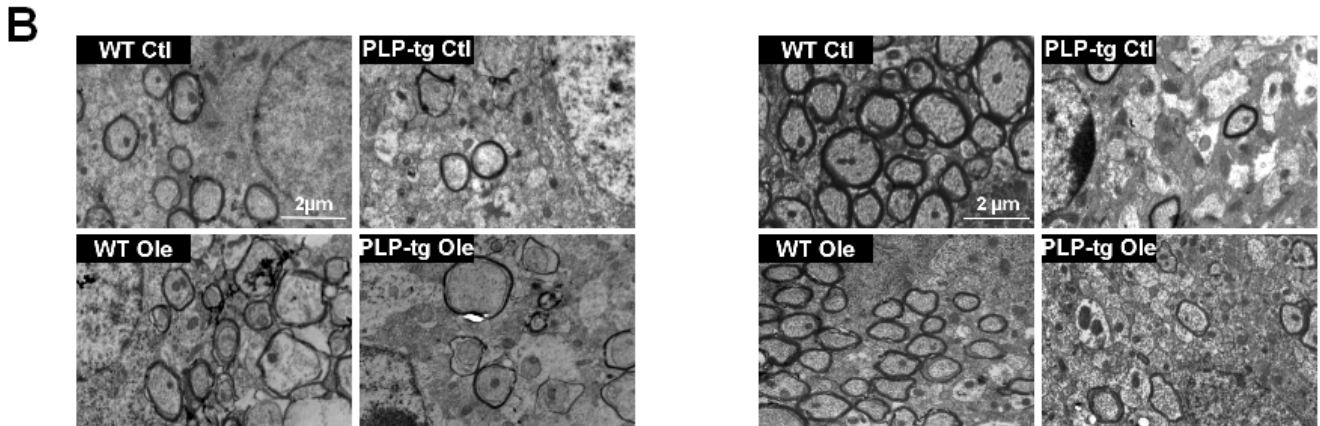
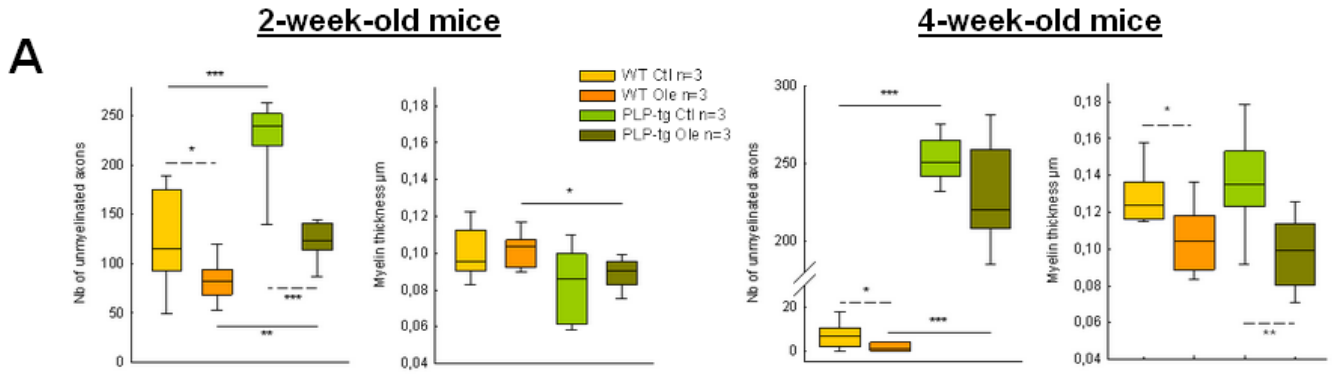


Figure 18 : L'Olésoxime favorise la myélinisation durant le développement précoce (souris âgées de 2 semaines) mais perd cet effet promyélinisant chez les souris surexprimant PLP (+PlpTg) âgées de 4 semaines

*Données non publiées*

Des nouveau-nées sauvages (WT) ou surexprimant PLP (+PLP-Tg) ont été traités à l'olésoxime par le biais du lait maternel (mères traitées par ingestion de croquette contenant 600µg d'olésoxime par g de croquette - dose journalière approximative de 100 mg/kg). L'analyse morphologique a été réalisée sur des coupes de corps calleux en microscopie électronique à grossissement x60 000. Trois souris ont été quantifiées par groupe et pour chacune d'entre-elle, 300 axones ont été étudiés sur 3 zones différentes (900 axones au total par souris). Les résultats sont présentés en moyenne+/-SEM.

A – Le nombre d'axones non myélinisés (sur les 300 étudiés par zone) et l'épaisseur moyenne de la gaine de myéline ont été quantifiées. Chez les animaux âgés de 2 semaines, un grand nombre d'axones est encore non myélinisé mais ce nombre est plus faible chez les souris WT ou +PLP-Tg traitées à l'olésoxime. Chez les souris WT âgées de 4 semaines, une très grande majorité d'axone est myélinisée, un léger effet bénéfique de l'olésoxime subsiste néanmoins. Chez les souris +PLP-Tg, le nombre d'axones non myélinisés est supérieur à celui observé à 2 semaines et il n'y a plus de différence entre les souris traitées ou non à l'olésoxime. En ce qui concerne l'épaisseur de la gaine de myéline, il n'y a pas de différence entre les souris WT et +PLP-Tg quel que soit l'âge étudié. Chez les souris âgées de 4 semaines, l'olesoxime aurait tendance à réduire légèrement l'épaisseur de la gaine de myéline mais cette différence n'est significative que chez les souris WT.

B – Photographies représentatives des différentes quantifications pour toutes les conditions expérimentales (âge, génotype et traitement).

C – Représentation graphique du nombre d'axones myélinisés regroupés pour des catégories d'épaisseur de gaine de myéline fixées. Globalement, le plus grand nombre d'axones myélinisés est observé dans les catégories d'épaisseurs de gaine de myéline entre 0,03-0,07µm et 0,15-0,17µm. Avec l'âge, les épaisseurs de gaine de myéline ont tendance à augmenter chez les souris WT et l'olésoxime chez ces souris semblent augmenter le nombre d'axones myélinisés principalement pour les catégories d'épaisseurs de gaine de myéline médianes. Chez les souris +PLP-Tg, un effet similaire est observé pour l'olésoxime chez les animaux âgés de 2 semaines mais est perdu chez les animaux âgés de 4 semaines. Chez ces animaux, une nouvelle fois une diminution du nombre d'axones myélinisés est observée entre les âges de 2 et 4 semaines.

\*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001, test de Mann-Whitney.

Dans une seconde cohorte, l'effet de l'olesoxime a été évalué sur l'hypomyélinisation à l'aide d'une analyse en microscopie électronique à transmission. Cette étude a montré que l'olésoxime favorise la myélinisation chez des animaux âgés de 2 semaines (chez les contrôles et les souris malades) mais qu'à l'âge de 4 semaines, les souris contrôles étant totalement myélinisées, l'olesoxime n'a presque plus d'effet significatif. Chez les souris +PlpTg âgées de 4 semaines, pour lesquelles le phénomène de myélinisation est quasiment inexistant, l'effet bénéfique de l'olésoxime observé à 2 semaine est perdu, suggérant que l'olésoxime peut favoriser la myélinisation d'un oligodendrocyte en souffrance à 2 semaines mais n'empêche pas l'apoptose oligodendrocytaire déjà marquée observée chez les souris âgées de 4 semaines (Figure 18).

Dans un deuxième temps l'olesoxime a été évalué chez les souris Plp null et sauvages qui ont reçu des croquettes contenant 600µg d'olésoxime par g de croquette (pour les groupes contrôle des croquettes identiques sans olésoxime) du sevrage (2 mois) à l'âge de 7 mois (traitement préventif). Les paramètres étudiés étaient : le poids, les troubles comportementaux et les vitesses de conduction. Les résultats ont montré un délai d'apparition de 3 mois de : 1) certains troubles comportementaux (et notamment ceux reliés à l'anxiété) et 2) du ralentissement des vitesses de conduction chez les souris Plp null traitées. La mise en place du même traitement mais chez des souris âgées de 9 mois, donc d'ores et déjà symptomatiques, n'a permis de montrer aucun effet bénéfique du traitement sur les différents paramètres mesurés.

La fin du projet européen FP7 Leukotrat avant la fin des études neuropathologiques devant compléter ces études comportementales puis la vente du brevet de l'olésoxime de la société Trophos à la société Roche en 2015, ont malheureusement mis à l'arrêt notre projet olésoxime et PLPpathies. Néanmoins, les résultats obtenus étaient intéressants et mériteraient d'être si ce n'est approfondis, au moins publiés. Ceci est d'autant plus vrai que d'autres équipes, au cours du projet FP7 Leukotreat ou par la suite, ont évalué des stratégies thérapeutiques permettant de ralentir le développement de la maladie sans cibler la cause génétique, avec pour certaines d'entre-elles des résultats précliniques intéressants. Il est ici possible de citer les travaux évaluant l'effet du lonaprisan en tant qu'antagoniste du récepteur nucléaire à la progestérone ou de la curcumine (Prukop et al., 2014 ; Epplen et al., 2015). Néanmoins, aucune de ces molécules n'a depuis montré son efficacité en clinique, et la prise en charge thérapeutique des patients atteints des PLPpathies est tout aussi limitée en 2023 qu'elle ne l'était en 2006 au début de mon post-doctorat.

## 5.2.2. Améliorer la compréhension de la physiopathologie des PLPpathies

### 5.2.2.1. Etude des souris Plp null, mécanismes physiopathologiques des symptômes sensitifs et cognitifs observés chez les patients SPG2 mais dont l'étiologie est mal comprise

Le suivi clinique des malades atteints de SPG2 a montré qu'en plus de troubles moteurs, ces patients souffrent de troubles sensitifs. Bien qu'une implication de la dégénérescence axonale soit suspectée, l'étiologie de ces symptômes reste encore inconnue. Afin de mieux comprendre ces symptômes, une étude comportementale longitudinale a été mise en place chez les souris Plp null. Elle a permis de montrer que ces souris développent dès l'âge de 3 mois une hyperalgésie (réponse exacerbée à un stimulus douloureux) mais pas d'allodynie (réponse douloureuse à un stimulus non douloureux) lors de l'exposition à des stimuli thermiques chauds (Figure 19).

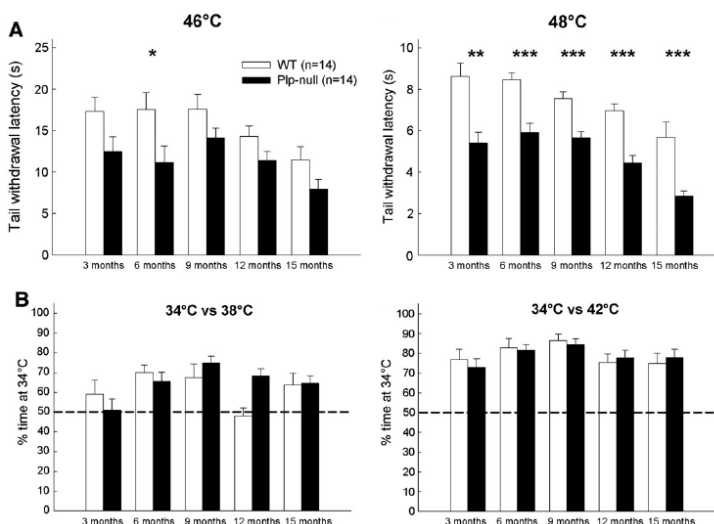


Figure 19. Evaluation de la sensibilité thermique des souris sauvages (WT) et présentant une invalidation du gène *Plp1* (Plp null)  
Extrait de Petit et al., 2014

A - Les souris PLP null développent une tendance à l'hyperalgésie (statistiquement significative uniquement à l'âge de 6 mois) lorsque celle-ci est évaluée sur une plaque chauffée à 46°C, tandis que cette hyperalgésie est très significative dès l'âge de 3 mois lorsqu'elle est évaluée sur une plaque chauffée à 48°C.

B - Lors du test de préférence de plaques en fonction de la température de celles-ci, les souris PLP null présentent des résultats similaires aux souris WT quelles que soient les températures testées. \* p<0,05 ; \*\* p<0,01 ; \*\*\* p<0,001 ; test de Bonferonni.

Ces travaux comportementaux ont été associés à une analyse électrophysiologique montrant une diminution des vitesses de conduction nerveuses périphériques (vitesse de conduction caudale et électroneuromyogramme) et centrales (potentiels évoqués somatosensoriels spinaux) tandis qu'une étude morphologique en microscopie électronique n'a pas montré d'anomalies majeurs au niveau du

nerf sciatique et l'apparition tardives d'une dégénérescence axonale et d'anomalies de la myéline (Figure 20).

Enfin la réalisation d'une étude immunohistochimique a permis de mettre en évidence au niveau de la corne dorsale de la moelle épinière (site d'intégration de l'information somatosensorielle) une prolifération et une activation précoce (dès l'âge de 3 mois) des astrocytes et de la microglie s'aggravant avec l'âge s'associant alors à une diminution du nombre de neurones et à une augmentation de l'expression du peptide relié au gène calcitonine (CGRP) et de la galanine. La surexpression de ces deux neuropeptides étant classiquement retrouvée dans la corne dorsale de modèles animaux de douleur chronique.

Ces résultats suggèrent que les souris PLP null souffrent d'une ganglionopathie associée à une dysmyélinisation centrale mais peu d'altération du nerf périphérique. Cette ganglionopathie serait provoquée par une sensibilisation de la moelle épinière induite par une activation gliale.

Ce travail a donné lieu à une publication dans *Neurobiology of Disease*.

*Petit B, Giraudet F, Béchon C, Bardin L, Avan P, Boespflug-Tanguy O, Bégou M. Mice with a deletion of the major central myelin protein exhibit hypersensitivity to noxious thermal stimuli: involvement of central sensitization. Neurobiol Dis. 2014 May;65:55-68.*

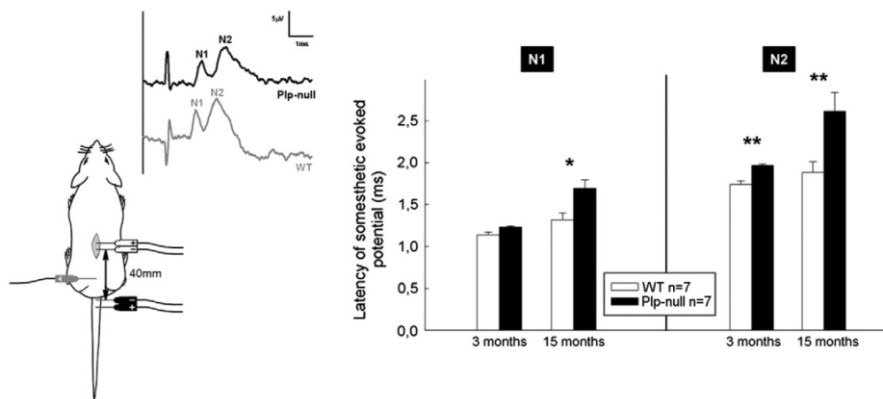


Figure 20 : Latence d'apparition des ondes N1 et N2 lors de l'enregistrement des potentiels évoqués somatosensoriels spinaux chez les souris sauvages (WT) et présentant une invalidation du gène *Plp1* (Plp null) âgées de 3 et 15 mois  
Extrait de Petit et al., 2014

Sur la gauche, représentation d'un tracé caractéristique obtenu pour une souris WT et une souris Plp null âgées de 15 mois et représentation schématique de la méthode. Sur la droite, ralentissement d'apparition des ondes N1 et N2 chez les souris Plp null âgées de 15 mois et uniquement de l'onde N2 pour les souris âgées de 3 mois. \*  $p < 0,05$  ; \*\*  $p < 0,01$  ; test de Mann-Whitney.

En plus des troubles moteurs et sensitifs, les patients atteints de SPG2 développent, souvent au moment de l'adolescence, des troubles cognitifs avec notamment des troubles de l'attention et du comportement anxieux. Afin de mieux comprendre ces symptômes une étude comportementale longitudinale a été mise en place chez les souris Plp null. Elle a montré que ces souris présentent des réponses comportementales anormales dans plusieurs types de situations anxieuses. De plus ces souris présentent des troubles de la mémoire de travail tandis que la mémoire épisodique à court et moyen terme semble préservée. Des analyses par RT-PCR quantitative et par immuno-histochimie suggèrent que des anomalies de la neurotransmission GABAergique notamment dans l'hippocampe pourraient être responsables de ces troubles comportementaux.

5.2.2.2. Implication du stress oxydant dans la physiopathologie des souris +PlpTg et Plp null

Les troubles du métabolisme énergétique ont des conséquences très délétères sur l'axone du fait de sa potentielle grande longueur et de sa demande énergétique très importante. Il est supposé qu'une diminution de la production d'ATP dans les neurones pourrait conduire à la dégénérescence axonale et serait impliquée dans la plupart des maladies neurodégénératives (Lin and Beal, 2006 ; Court and Coleman 2012). Les mitochondries axonales semblent être un point d'intégration de ces voies de dégénérescence communes et la production de ROS semblent constituées un des principaux effecteurs délétères (ces aspects seront plus détaillés dans le dernier chapitre de cette HDR concernant mes travaux de recherche depuis mon recrutement). Depuis maintenant plusieurs années, de nombreuses équipes étudient l'implication des ROS dans la dégénérescence axonale. Celle d'Aurora Pujol est spécialisée dans l'implication de ces derniers dans une forme particulière de leucodystrophie peroxysomale : l'adrénoleucodystrophie.

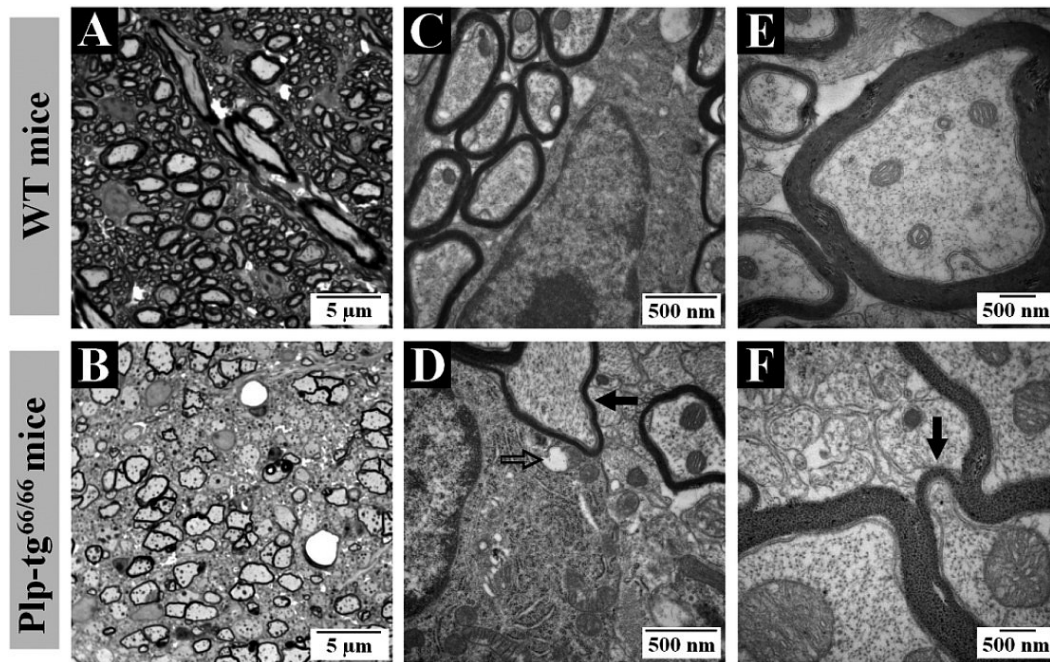
Dans le cadre du projet européen FP7 Leukotreat notre équipe a collaboré avec l'équipe du Dr Pujol pour étudier l'implication du stress oxydant et notamment la production de ROS dans la physiopathologie des PLPpathies. Ce travail a tout d'abord été initié dans le modèle des souris +PlpTg après la mise en évidence, au niveau de la moelle épinière cervicale, d'anomalies morphologiques importantes des mitochondries dans les substances blanche et grise (Figure 21).

Ce travail a permis de montrer que la surexpression de PLP est associée à des anomalies de régulation du stress oxydant ainsi qu'à un déficit bioénergétique. Ont été mises en évidence chez les souris +PlpTg : i) des lésions oxydantes sur les protéines, ii) des anomalies du métabolisme énergétique et notamment une diminution du contenu en ATP et des anomalies de la dynamique mitochondriale, iii) des anomalies de la réponse antioxydante avec notamment une diminution des niveaux de catalase (Figure 22). De façon très intéressante, une partie de ces anomalies ont été retrouvées dans les fibroblastes de patients dupliqués avec notamment une diminution des niveaux d'ATP, un déséquilibre d'expression des protéines de fusion/fission mitochondriale et enfin une augmentation de la production de ROS et des dysfonctionnements dans la respiration mitochondriale.

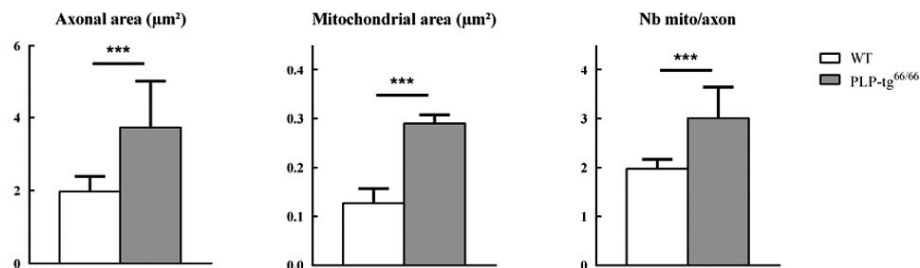
Les travaux réalisés dans le modèle +PlpTg ont été publiés dans *Brain Pathology* en 2018.

*Ruiz M, Bégou M, Launay N, Ranea-Robles P, Bianchi P, López-Erauskin J, Morató L, Guilera C, Petit B, Vaurs-Barriere C, Guéret-Gonthier C, Bonnet-Dupeyron MN, Fourcade S, Auwerx J, Boespflug-Tanguy O, Pujol A. Oxidative stress and mitochondrial dynamics malfunction are linked in Pelizaeus-Merzbacher disease. Brain Pathol. 2018 Sep;28(5):611-630.*

Une étude similaire a été débutée chez les souris Plp null. Les données préliminaires montrent des altérations moins marquées que chez les souris +PlpTg, mais néanmoins, des anomalies du stress oxydant sont présentes dans ce modèle également. De façon intéressante, les anomalies semblent ici plus marquées dans le cerveau que dans la moelle épinière. Dans le cerveau, une augmentation des protéines oxydées est retrouvée, associée à des dérégulations modérées de l'expression des enzymes anti-oxydantes (principalement augmentation de la glutathion peroxydase (GPx) et des anomalies de ratio entre le nicotinamide adénine dinucléotide oxydant (NAD<sup>+</sup>) qui est augmenté et le NADH réducteur qui est diminué. Dans la moelle, est principalement retrouvée une augmentation de la poly(ADP-ribose) polymérase (PARP), phénomène décrit dans plusieurs pathologies neurodégénératives et au cours du vieillissement en relation avec la neuroinflammation et les atteintes mitochondriales (Mekhaeil et al., 2021 ; Mao and Zhang, 2022).



### Axonal quantification



### Oligodendroglial quantification

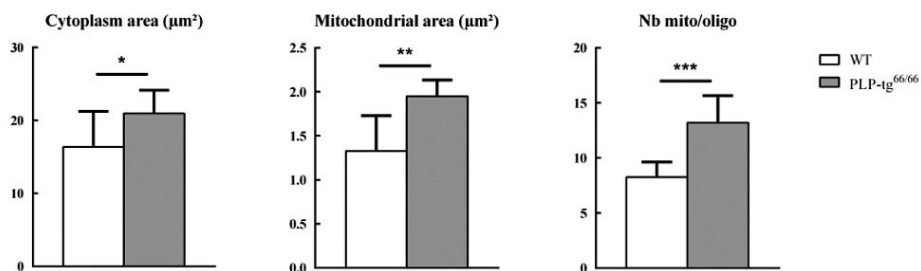


Figure 21 : Analyse neuropathologique de la substance blanche de la moelle épinière cervicale de souris sauvages (WT) et surexprimant le gène *Plp1* (+PlpTg) âgées de 6 semaines  
 Extrait de Ruiz et al., 2018

A et B - Coupes semifines de 700nm de colonnes ventrales colorées au bleu de toluidine.

C à F - Coupes ultrafines de 70 nm observées en microscopie électronique à transmission et photographiées au grossissement x325 000 (C et D) et x350 000 (E et F).

Quantification sur des sections transversales d'axone de : la surface de la section, de la surface moyenne des mitochondries et du nombre de mitochondries visibles par section d'axone.

Quantification sur des sections transversales de corps cellulaire d'oligodendrocytes de : la surface cytoplasmique sur la section, de la surface moyenne des mitochondries et du nombre de mitochondries visibles dans le cytoplasme d'un oligodendrocyte.

Flèche noire pleine : axone avec une gaine de myéline anormalement fine. Flèche noire vide : mitochondrie en cours de dégénérescence.

Analyse statistique réalisée par un test T de Student : \*p<0,05 ; \*\*p<0,01 ; \*\*\*p<0,001.

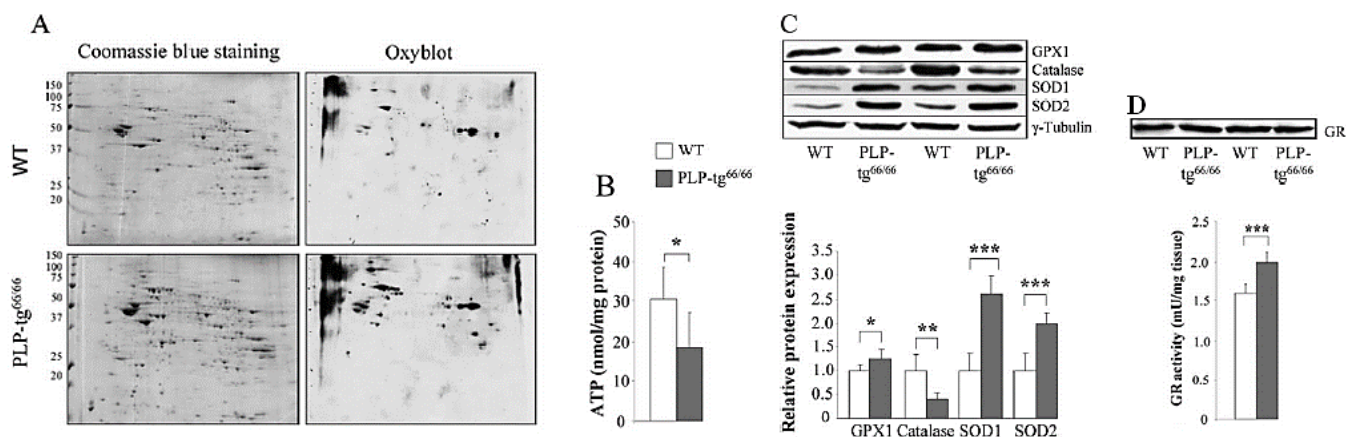


Figure 22 : Analyse neuroathologique de la substance blanche de la moelle épinière cervicale de souris sauvages (WT) et surexprimant le gène *Plp1* (+PlpTg) âgées de 6 semaines  
Adapté de Ruiz et al., 2018

A - Expérience de protéomique redox 2D réalisée sur les protéines extraites de la moelle épinière cervicale de 3 souris WT et +PlpTg. Les 21 protéines oxydées ont pu être identifiées après détection sur gel par réaction avec un anticorps dirigé contre la dinitrophenylhydrazine puis identification par spectrométrie de masse couplant une source d'ionisation laser assistée par une matrice et un analyseur à temps de vol (MALDI-TOF).

B - Niveau d'ATP mesuré par chémiluminescence en utilisant le kit ATPlite 1 step de chez PerkinElmer.

C - Expression protéique des principales enzymes antioxydantes de l'organisme montrant une augmentation d'expression de la glutathion peroxydase (GPX1), des isoformes 1 et 2 de la superoxyde dismutase (SOD1 et SOD2) et une diminution d'expression de la catalase.

D - Mesure de l'activité enzymatique de la glutathione réductase par spectométrie en utilisant le kit NWK-GR01 de chez Northwest.

Les données sont exprimées en moyenne +/- déviation standard. L'analyse statistique a été réalisée par un test T de Student : \*p < 0,05 ; \*\*p < 0,01 ; \*\*\*p < 0,001.

### 5.2.2.3. Prémices d'évaluation d'une symptomatologie chez les mères transmettrices des modèles +PlpTg et Plp null

Pour finir, un dernier aspect de la physiopathologie des PLPpathies a commencé à être abordé durant mon post-doctorat à savoir le cas des mères transmettrices (ou vectrices) de la maladie. Pendant de nombreuses années, les mères des patients ont été considérées comme asymptomatiques. Quelques rares patientes ont été décrites comme ayant eu des symptômes au cours de l'enfance, mais contrairement aux patients mâles, l'évolution des symptômes a toujours été favorable au cours du temps (Inoue et al., 2001). C'est lors de la mise en place de suivi de cohortes de patients mâles sur de nombreuses années, que plusieurs groupes ont identifiés chez les mères transmettrices accompagnant leur enfant des symptômes de faible intensité (passant inaperçu lors des suivis individuels) s'aggravant avec l'âge. Certaines mères transmettrices développent ainsi des formes d'apparition très tardives de paraplégie spastique associant des symptômes périphériques fréquents (syndrome du canal carpien, pied creux, ...) pouvant évoluer pour certaines patientes à une démence frontale progressive après 60 ans (Nance et al., 1996 ; Marble et al., 2007). De façon notable, symptômes précoces ou tardifs sont observés plus fréquemment chez les femmes transmettrices de mutations responsables de PLPpathies modérées. Cette observation clinique a été expliquée par le fait que chez les femmes porteuses de mutations responsables de formes sévères, les oligodendrocytes exprimant le chromosome pathologique sont rapidement détruit et ainsi quasiment inexistant dans le SNC mature tandis que les femmes porteuses de mutations responsables de formes modérées présenteraient une mosaïque d'oligodendrocytes sains ou malades. Afin d'expliquer chez ces femmes la présence de symptômes

précoces, il a été suggéré des anomalies du phénomène d'inactivation de l'X qui dans le cas de maladie transmissible par le chromosome X permet aux femmes porteuses d'exprimer dans leurs cellules principalement le chromosome sain plutôt que le pathologique. Lors d'une anomalie d'inactivation de l'X, les mères transmettrices auraient un nombre plus important d'oligodendrocytes exprimant le chromosome X mutant expliquant la survenue des symptômes (Woodward et al., 2000 ; Inoue et al., 2005). Dans le cas des symptômes tardifs, la présence même en quantité limitée d'oligodendrocytes exprimant le chromosome X mutant, fragiliserait le SNC qui lors du vieillissement se détériorerait plus rapidement expliquant alors la survenue des symptômes (Inoue et al., 2005). Ces hypothèses cliniques étant supportées par des données précliniques (Cuddon et al., 1998 ; Edgar et al., 2002). C'est sur la base de ces informations qu'une étude longitudinale comportementale chez les femelles transmettrices +PlpTg et Plp null a été débutée. Cette étude a tout d'abord montré que seules les femelles transmettrices Plp null prennent moins de poids en vieillissant que les souris contrôles (à partir de l'âge de 12 mois) (Tableau 4).

**Tableau 4 : Evolution du poids des souris contrôles et modèles de mères transmettrices de PLPpathies**

A – Evolution du poids en gramme chez les souris hétérozygotes pour la délétion du gène *Plp1* (Plp null hetero) en comparaison aux souris contrôles (littermate).

B – Evolution du poids en gramme chez les souris hétérozygotes pour la surexpression du gène *Plp1* (Plp overexpressing hetero) en comparaison aux souris contrôles (littermate).

Analyse statistique par ANOVA suivie d'un test post-hoc, \*  $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , ns: non significatif

<b>A</b>	WT	Plp null hetero	
3 months	21,00 +/- 0,29	20,80 +/- 0,25	ns
6 months	23,46 +/- 0,20	23,22 +/- 0,36	ns
9 months	24,94 +/- 0,37	24,07 +/- 0,35	ns
12 months	26,02 +/- 0,39	24,75 +/- 0,33	*
15 months	28,19 +/- 0,62	25,91 +/- 0,38	**

<b>B</b>	WT	Plp overexpressing hetero	
3 months	21,55 +/- 0,36	21,31 +/- 0,36	ns
6 months	23,38 +/- 0,25	23,58 +/- 0,42	ns
9 months	26,30 +/- 0,56	26,01 +/- 0,51	ns
12 months	25,52 +/- 0,47	26,35 +/- 0,60	ns
15 months	27,50 +/- 0,65	27,13 +/- 0,43	ns

Cette étude a également permis de montrer que seules les femelles Plp null développent avec le temps une hyperactivité locomotrice associée à une augmentation de l'exploration de la zone anxiogène dans le test de l'open field (Figure 23). Et enfin, que seules les femelles Plp null développent avec le temps un déficit de la mémoire de travail mis en évidence par le test du labyrinthe en Y (Figure 24).

Il est important de noter qu'une des limitations de l'étude est que du fait de la construction génique utilisée lors de la création des souris +PlpTg par transgénèse additive, le transcrit porteurs des copies supplémentaires de *Plp1* n'est pas intégrée au niveau du chromosome X mais d'un chromosome autosome non identifié ce qui ne permet pas d'étudier dans ce modèle le phénomène d'inactivation de l'X. Quoiqu'il en soit, ces résultats comportementaux sont intéressants et mériteraient d'être complétés par des études neuropathologiques.

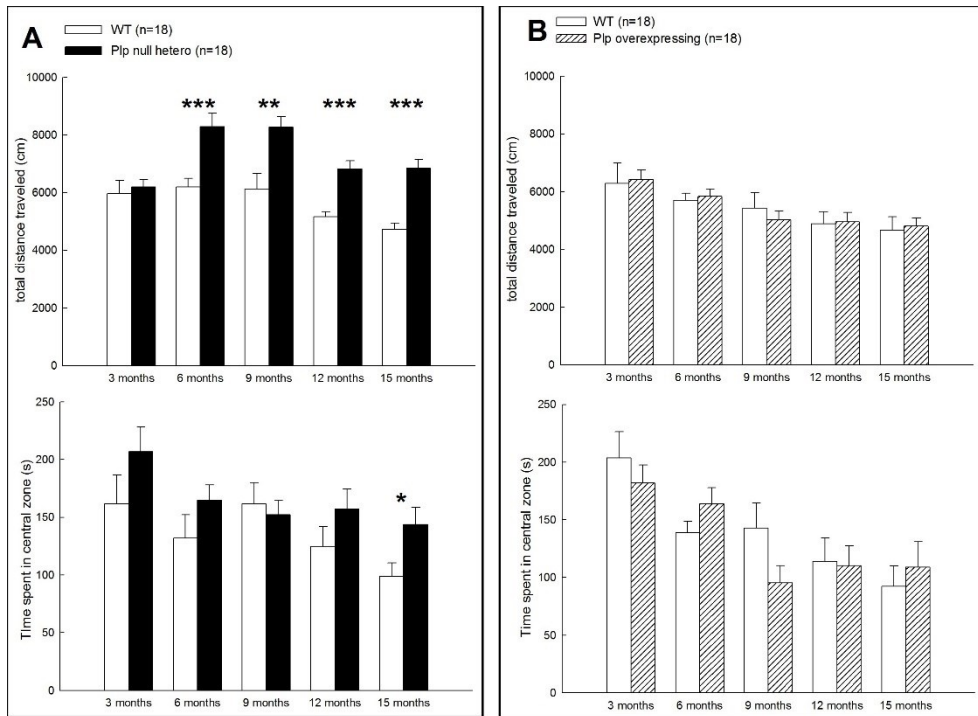


Figure 23 : Analyse par le test de l'open-field du comportement des souris contrôles et modèles de mères transmettrices de PLPpathies  
Données non publiées

A – Distance totale parcouru sur une période de 15 minutes chez les souris hétérozygotes pour la délétion du gène *Plp1* (Plp null hetero) en comparaison aux souris contrôles (WT).  
B – Temps passé dans la zone centrale de l'arène d'évaluation (zone anxiogène en comparaison au bord de l'arène) chez les souris hétérozygotes pour la surexpression du gène *Plp1* (Plp overexpressing) en comparaison aux souris contrôles (WT).  
Analyse statistique par ANOVA suivie d'un test de PLSD Fisher, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p > 0,001$ .

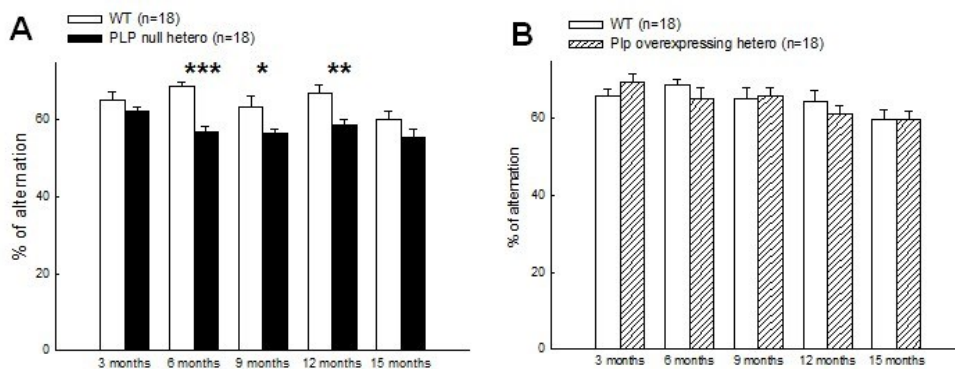


Figure 24 : Analyse par le test du labyrinthe en Y de la mémoire de travail des souris contrôles et modèles de mères transmettrices de PLPpathies  
Données non publiées

A – Pourcentage d'alternance entre les 2 bras du labyrinthe évalué sur une période de 10 minutes chez les souris hétérozygotes pour la délétion du gène *Plp1* (Plp null hetero) en comparaison aux souris contrôles (WT).  
B – Pourcentage d'alternance entre les 2 bras du labyrinthe évalué sur une période de 10 minutes chez les souris hétérozygotes pour la surexpression du gène *Plp1* (Plp overexpressing) en comparaison aux souris contrôles (WT).  
Analyse statistique par ANOVA suivie d'un test de PLSD Fisher, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p > 0,001$ .

### **5.3. Conclusion**

L'ensemble de ces travaux ont permis d'améliorer les connaissances sur la physiopathologie des PLPpathies bien qu'il reste encore de nombreux aspects à mieux caractériser à commencer par la description exacte du rôle de PLP que cela soit au niveau des oligodendrocytes mais également en ce qui concerne son expression ou celle de son isoforme DM20 dans d'autres type cellulaire.

Concernant la prise en charge thérapeutique des patients, il reste encore beaucoup à faire. Comme cela a été dit précédemment, bien que plusieurs stratégies thérapeutiques permettant de ralentir le développement de la maladie sans cibler la cause génétique aient été évaluée, pour le moment, aucune d'entre elle n'a montré son efficacité chez les patients. D'autres molécules sont en cours d'évaluation (et notamment la lériglitazone dont nous parlerons dans la dernière partie de ce mémoire) et certaines pistes sont prometteuses comme les stratégies inhibant la signalisation PARP-1 (Mekhaeil et al., 2022). D'autres pistes thérapeutiques sont également évaluées, et notamment la thérapie cellulaire avec l'espoir de pouvoir greffer aux patients des cellules capables de remyéliniser leur SNC. Des études ont été réalisées chez la souris +PlpTg avec l'obtention de résultats très encourageants pour la greffe de cellules souches neurales humaines (Marteyn et al., 2023 ; Gruenenfelder et al., 2020). Chez l'humain, un essai clinique de phase 1 a été réalisé pour tester l'innocuité d'un protocole de greffe cellulaire chez les patients PMD. Quatre sujets atteints de forme PMD3 ont été greffés avec des cellules souches neurales humaines et le suivi en IRM a 1 an puis 4 ans a montré que chez 3 patients les cellules greffées s'étaient implantées durablement et pour certaines étaient capable de remyélinisation même si les effets observés sur les symptômes semblaient très limités (Gupta et al., 2012 ; Gupta et al., 2019). Les données concernant la thérapie génique sont encore moins avancées. Seuls des essais chez la souris ont été réalisés et dans l'étude la plus convaincante, le silencing complet de la protéine PLP a permis de modifier le phénotype des souris surexprimant PLP (PMD) vers un phénotype de souris n'exprimant pas PLP (SPG2) ce qui ne correspond pas vraiment à ce que l'on pourrait appeler une guérison (Elitt et al., 2020). La route est donc probablement encore longue avant de voir arriver sur le marché le premier traitement curatif pour les patients atteints de PLPpathies.



---

**6. Activités de recherche depuis le  
recrutement comme maitre de  
conférences**



Depuis mon recrutement en 2014, je développe au sein de l'unité Neuro-Dol INSERM 1107, Université Clermont Auvergne, dans l'équipe Pharmacologie fondamentale et clinique de la douleur dirigée par le Pr Denis ARDID, **un axe de recherche douleur chronique et pathologies de la myéline** me permettant de m'intégrer dans la thématique de l'équipe tout en utilisant mes connaissances théoriques et compétences techniques acquises au cours de mon post-doctorat. Ce travail a pu être initié grâce à l'obtention en 2014 d'une subvention de 3 ans de la Fondation ARSEP ainsi que l'obtention la même année d'une bourse de thèse du ministère par mon étudiante de M2 Amélie DEMOSTHENES. L'objectif principal de ces premiers travaux était de mieux caractériser les symptômes sensitifs dans deux modèles murins mimant des formes différentes de sclérose en plaques. Ces travaux ont ensuite été élargis à l'évaluation de molécules thérapeutiques potentielles dans ces modèles grâce à l'obtention de nouveaux financements détaillés dans la partie financement et contrat de recherche de mon *curriculum vitae*. Les principaux résultats obtenus au cours de cette période seront détaillés après une présentation du contexte scientifique.

## **6.1. Contexte scientifique**

### **6.1.1. Brève introduction sur la sclérose en plaques**

**La sclérose en plaque (SEP) est une maladie auto-immune démyélinisante chronique du SNC** touchant 2,5 millions de personnes dans le monde et 110 000 personnes en France (Thompson et al., 2018 ; Foulon et al., 2017). Les premières descriptions cliniques détaillées de la maladie ont été réalisées par les docteurs Jean-Martin Charcot et son collègue Alfred Vulpian à l'hôpital de la Salpêtrière à Paris et c'est la lésion pathologique caractéristique de la maladie qui lui a donné son nom (Charcot, 1868). Il s'agit de **plaques de démyélinisation localisée dans le cerveau, la moelle épinière et/ou le nerf optique induites par une réponse immune disséminée**. Ces plaques prennent la présentation de zones bien démarquées hypocellulaires, caractérisées par une perte de myéline, avec des axones dans un premier temps relativement préservés. Elles sont souvent associées à la formation d'une cicatrice gliale principalement composée d'astrocytes et de cellules microgliales et pour certaines constituent des zones focales de destruction de la barrière hémato-encéphalique (BHE) (Compston and Coles, 2008 ; Lassmann et al., 2007) phénomènes qui seront pour certains détaillés par la suite.

**L'étiologie de la SEP est encore inconnue et la première interrogation repose sur le fait que cette pathologie soit primitivement auto-immune** avec une réponse immune qui s'attaquerait dans un second temps à la myéline du SNC **ou bien qu'elle soit primitivement neurodégénérative** avec une première atteinte au niveau du SNC qui passerait plus ou moins inaperçue mais qui déclencherait une réponse immune en périphérie qui dans un second temps provoquerait les atteintes neurologiques sévères de la SEP (Hemmer et al., 2002). De fait, plusieurs facteurs de risque de la maladie ont été identifiés mais ne permettent pas de déterminer l'étiologie exacte de la maladie. Les **facteurs de risque génétiques** tels que l'association très forte entre l'allèle HLA-DRB1\*1501 du complexe majeur d'histocompatibilité ou l'implication de variants sur les gènes codants l'interleukines (IL) 7 ou le récepteur à l'IL-2 et le développement de la SEP suggèrent plus une origine auto-immune (Hollenbach and Oksenberg, 2015 ; Nicol et al., 2017 ; International Multiple Sclerosis Genetics Consortium, 2019). Sur les plus de 50 *loci* de susceptibilité associés à la SEP, la grande majorité correspond à des gènes impliqués dans les fonctions immunes (International Multiple Sclerosis Genetics Consortium et al., 2011). Certains **facteurs de risque environnementaux** supportent également cette origine auto-immune ; c'est le cas notamment du déficit en vitamine D (molécule influençant la transcription

de nombreux gènes impliqués dans la réponse immune) provoqué par une plus faible exposition au soleil dans les pays tempérés où l'incidence de la SEP est plus élevée (Ascherio et al., 2010). Tandis que d'autres facteurs environnementaux tels que l'hypothèse d'une infection virale initiale (notamment par le virus d'Epstein-Barr ou les virus de l'herpès simplex) supportent à la fois l'hypothèse auto-immune avec la possibilité d'une homologie de séquence entre un antigène (Ag) de l'agent infectieux et un Ag de la gaine de myéline ou l'hypothèse neurodégénérative avec l'agent infectieux qui pourrait être responsable de la première lésion dans le SNC (Thompson et al., 2018 ; Soldan and Lieberman, 2022).

#### 6.1.1.1. Physiopathologie

**Si l'étiologie de la maladie n'est pas encore identifiée, au cours des 40 dernières années, les grandes étapes physiopathologiques de la maladie ont commencées à se dessiner (Figure 25). La SEP est considérée comme une maladie auto-immune médiée par les lymphocytes T (L<sub>T</sub>). Il est ainsi couramment admis que des L<sub>T</sub> CD4<sup>+</sup> autoréactifs activés à la périphérie vont franchir la BHE pour gagner le SNC où ils sont réactivés par les cellules présentatrice de l'antigène (CPA). Les L<sub>T</sub> CD4<sup>+</sup> vont alors produire des cytokines pro-inflammatoires telles que l'interféron gamma (IFN $\gamma$ ), le facteur de nécrose tumorale alpha (TNF $\alpha$ ), les IL-17 et -22 ou le facteur stimulant les colonies de granulocytes et de macrophages (GM-CSF) ; ils sont ainsi responsables de l'initiation de la réponse immune chez les patients. Par contre les L<sub>T</sub> CD4<sup>+</sup> sont rares dans les lésions démyélinisantes contrairement aux L<sub>T</sub> CD8<sup>+</sup> qui semblent donc être les acteurs de la phase effectrice de la maladie (Baecher et al., 2018). Afin d'exercer leurs fonctions cytotoxiques, les L<sub>T</sub> CD8<sup>+</sup> reconnaissent les molécules du MHC de classe I qui sont exprimées par toutes les cellules mais qui sont surexprimées au niveau des oligodendrocytes, astrocytes et des neurones au niveau des lésions actives, faisant de ces cellules des cibles potentielles des L<sub>T</sub> CD8<sup>+</sup> (Dendrou et al., 2015). Enfin, un dernier type de L<sub>T</sub> semblent jouer un rôle important dans la physiopathologie de la SEP, il s'agit des L<sub>T</sub> CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> appelés L<sub>T</sub> régulateurs (Tregs) qui semblent jouer un rôle dans la diminution de la réponse immune au cours des phases de récupération de la SEP-RR. Cependant, chez certains patients cette capacité régulatrice des Tregs semblerait diminuée ou perdue (Simmons et al., 2013).**

Néanmoins, la réponse immune dans la SEP ne se réduit pas à l'implication des L<sub>T</sub>, **de nombreuses données suggèrent dorénavant également une implication des lymphocytes B et de la réponse immune innée dans la physiopathologie de la SEP.** Concernant les lymphocytes B, dans les méninges, les follicules lymphoïdes s'accumulent et une réponse immune humorale se met en place. En présence de leurs antigènes, les LB se différencient en plasmocytes et relâchent une grande quantité d'anticorps dirigés contre les protéines de myéline permettant ainsi l'activation du système du complément entraînant la dégradation de la gaine de myéline (Dendrou et al., 2015 ; Heming and Wiendl, 2023). Concernant l'immunité innée, des mastocytes sont retrouvés au sein des méninges, des plexus choroïdes, du parenchyme cérébral ainsi qu'en bordure de lésion, notamment au niveau des lésions chroniques actives. De plus, les macrophages représentent la majorité des cellules de l'immunité innée infiltrant les lésions et sont abondants dans les régions périvasculaires. Ils sont issus de la différenciation des monocytes lors de leur infiltration dans le SNC, certains seraient pro-inflammatoires (profil M1) tandis que d'autres auraient plutôt une fonction régulatrice (profil M2). Enfin, les cellules immunitaires résidentes du SNC (principalement les cellules microgliales) sont recrutées lors de l'inflammation initiale suite à la sécrétion d'IFN- $\gamma$  et d'autres cytokines pro-inflammatoires. Elles sont retrouvées de façon abondante dans les lésions actives. Ces cellules activées en association avec les macrophages M1 amplifient le phénomène inflammatoire par la sécrétion d'IL-

1, d'IL-6 et de TNF- $\alpha$ , participant à l'influx secondaire de cellules immunes de la périphérie vers le SNC, notamment des lymphocytes Th17 (Nicol et al., 2017). Elles libèrent également des molécules cytolytiques telles que les perforines et le granzyme B provoquant des dommages au niveau des oligodendrocytes mais également des axones (Dendrou et al., 2015).

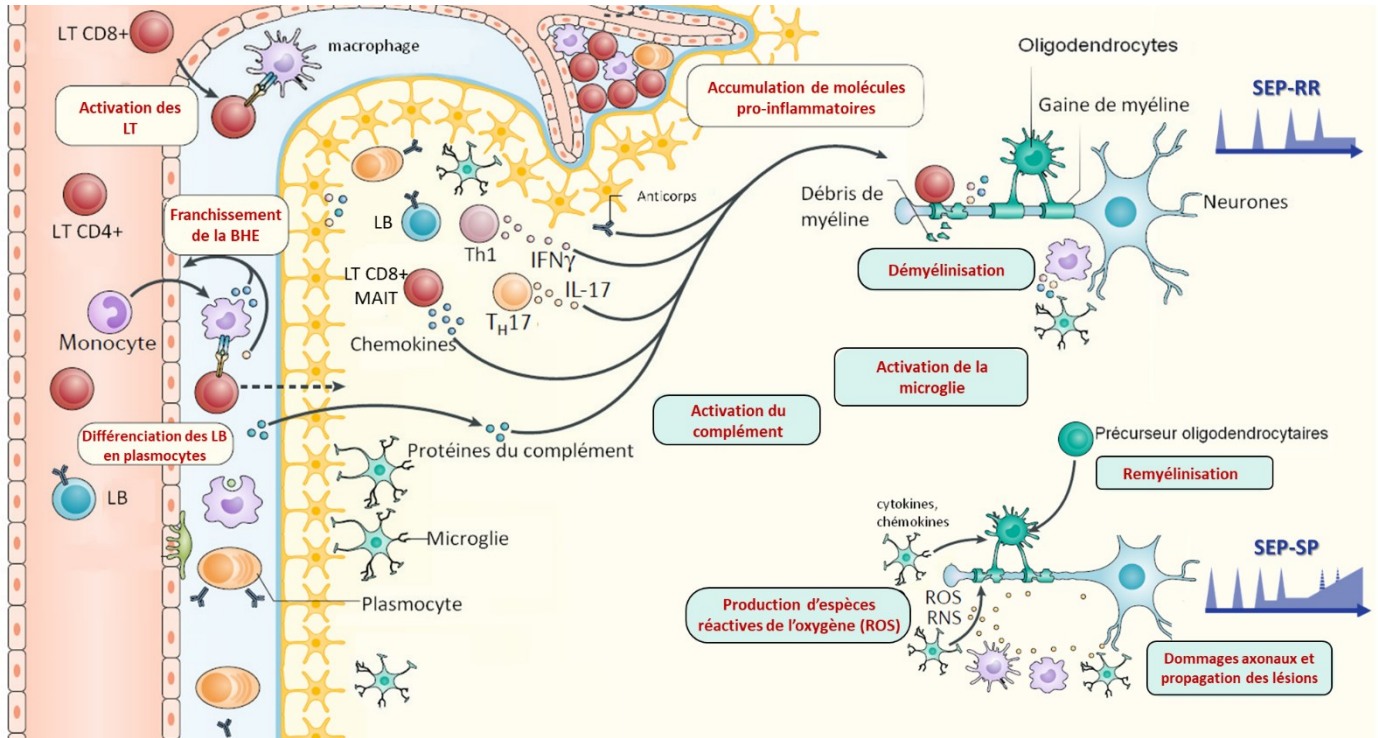


Figure 25 : Représentation schématique des grandes étapes physiopathologiques mises en jeu dans le développement de la sclérose en plaques

Adapté de Filippi et al., 2018

Les cellules immunitaires pénètrent dans le système nerveux central (SNC) à travers les vaisseaux de la barrière hématoencéphalique (BHE), l'espace sous arachnoïdien et le plexus choroïde. Au cours des rechutes de la maladie (qui sont plus fréquentes dans les phases précoces) se produit une infiltration de cellules de l'immunité innée et adaptative, telles que les lymphocytes CD4+ et CD8+, les lymphocytes B (LB) et les cellules myéloïdes (monocytes, macrophages et cellules dendritique), dans le parenchyme cérébral selon une distribution périvasculaire autour des veinules postcapillaires de la BHE. Ces cellules immunitaires en association avec la microglie et les astrocytes activés contribuent aux dommages oligodendrocytaires, à la démyélinisation et aux lésions neuro-axonales par l'intermédiaire de mécanismes dépendant du contact cellulaire ou la sécrétion de facteurs solubles. Dans les stades plus tardifs de la maladie, les épisodes d'infiltration des cellules immunitaires diminuent, laissant la place à des processus de neurodégénérescence touchant à la fois les neurones (et leur axone), les astrocytes et les oligodendrocytes du fait du développement : d'un stress oxydant, de dysfonctionnements mitochondriaux, d'une accumulation extracellulaire de fer libre, de la perte de facteurs trophiques de la myéline, d'une hypoxie, d'une altération de l'homéostasie du glutamate et d'un environnement pro-inflammatoire. Ces mécanismes tardifs seraient responsables de l'évolution des manifestations cliniques de la maladie vers une forme progressive.

SEP-RR : sclérose en plaques récurrente-rémittente

SEP-SP : sclérose en plaques progressive secondaire

IL-17 : interleukine 17

LD CD8+ MAIT : lymphocyte T invariant associé aux muqueuses

TH1 : lymphocyte T helper 1

TH17 : lymphocyte T helper 17

IFN $\gamma$  : interféron  $\gamma$

**Comme nous venons de le dire, la réponse immune et inflammatoire à des effets délétères sur la gaine de myéline qui subit une démyélinisation segmentaire (les portions des axones traversant les**

lésions perdent leur gaine de myéline). Cette dégradation intervient quelques jours à quelques semaines après l'initiation de la réponse immune (Compston and Coles, 2008). **En parallèle de cette démyélinisation, une dégénérescence des oligodendrocytes est observée** chez les patients. Ces différentes atteintes ciblant les oligodendrocytes sont responsables d'un ralentissement ou d'un blocage de l'influx nerveux provoquant les symptômes neurologiques de la maladie.

**Dans les phases précoces de la maladie des progéniteurs oligodendrocytaires (OPCs) présents dans les plaques actives de démyélinisation sont capables de se différencier en oligodendrocytes matures myélinisant permettant une remyélinisation.** Cette remyélinisation peut être complète mais la gaine de myéline alors produite est beaucoup plus fine que la myéline initialement formée et les lésions concernées sont nommées « shadow plaques » en raison de leur aspect ombré (fixant moins bien le colorant myélinique lors de l'analyse anatomopathologique) (Figure 26). La remyélinisation est plus active durant les phases de clairance des débris myéliniques ayant lieu lors de la phase aiguë de l'inflammation (Fancy et al., 2011). Elle tend à se raréfier lors de la chronicisation des lésions ; en effet dans les lésions chroniques, les oligodendrocytes sont rares du fait du faible recrutement des OPC ou de leur incapacité à se différencier (Fancy et al., 2011 ; Franklin and Ffrench-Constant, 2017).

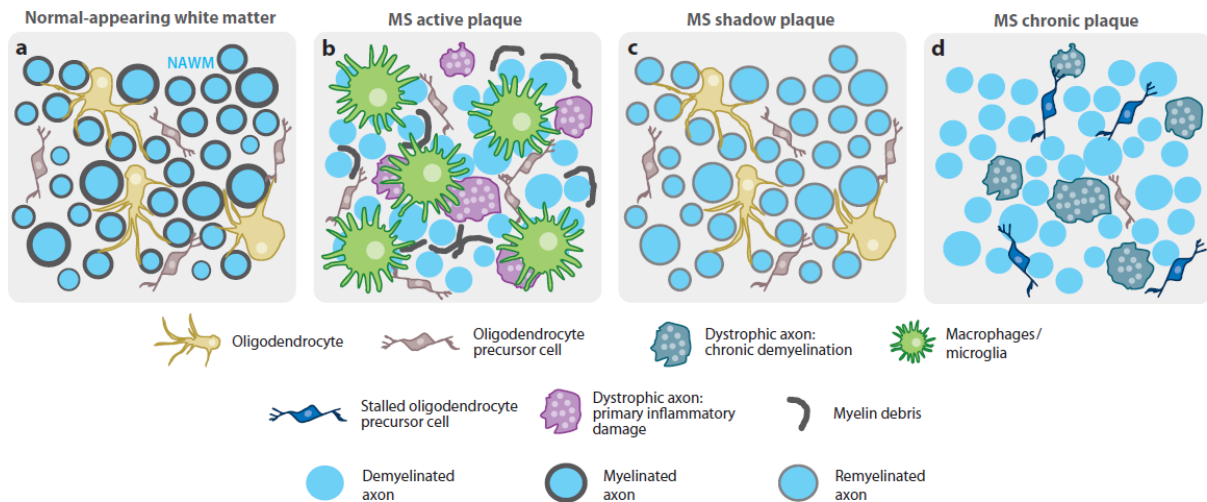


Figure 26 : Représentation schématique du niveau de myélinisation et des cellules associées dans les différents types de plaques retrouvées dans la sclérose en plaques  
*Adapté de Fancy et al., 2011*

Coupes transversales d'axones (ronds bleus) dans : a) la substance blanche d'apparence normale (NAWM) où les axones sont myélinisés et entourés d'oligodendrocytes et de précurseurs oligodendrocytaires ; b) une plaque active chronique où les axones sont démyélinisés et entourés de cellules immunes activées, de débris de myéline et de précurseurs oligodendrocytaires ; c) une « shadow » plaque où les axones sont remyélinisés avec une gaine de myéline plus fine et entourés d'oligodendrocytes et de précurseurs oligodendrocytaires ; d) une plaque inactive chronique où les axones sont démyélinisés et entourés d'un nombre réduit de précurseurs oligodendrocytaires sains, mais d'un nombre important de précurseurs oligodendrocytaires incapables de se différencier. De façon notable, des axones dystrophiques en train de dégénérer sont observables dans la plaque active chronique et dans la plaque inactive chronique.

**Dans le développement de la SEP, les axones et les neurones sont également affectés par des processus de dégénérescence se mettant parfois en place dès les premiers stades de la maladie.** Cette **neurodégénérescence peut être primaire** (non dépendante de la réponse immune ou de la démyélinisation) mais les mécanismes cellulaires alors mis en jeu sont encore peu connus (Hauser et al., 2006). **Cette neurodégénérescence peut être secondaire : 1) à la réponse immune et à l'inflammation** avec notamment une toxicité directe des cellules immunes telles que les LT CD8+ ou

des cytokines pro-inflammatoires (TNF- $\alpha$ ) et des molécules cytolytiques (perforine et/ou le granzyme B) libérées (Kutzelnigg and Lassmann, 2014) ; **2) à la démyélinisation** exposant l'axone au tissu inflammé et modifiant les besoins énergétiques de celui-ci (Friese et al., 2014). En effet, comme dit dans le chapitre de présentation de la myéline, une de ses fonctions principales est de réduire les besoins énergétiques pour le transfert de l'influx nerveux. Lors de la démyélinisation, les canaux sodiques ainsi que les canaux calciques et les récepteurs glutamatergiques qui étaient situés uniquement au niveau des nœuds de Ranvier se redistribuent le long de l'axone afin de maintenir la transmission de l'information (Dendrou et al., 2015).

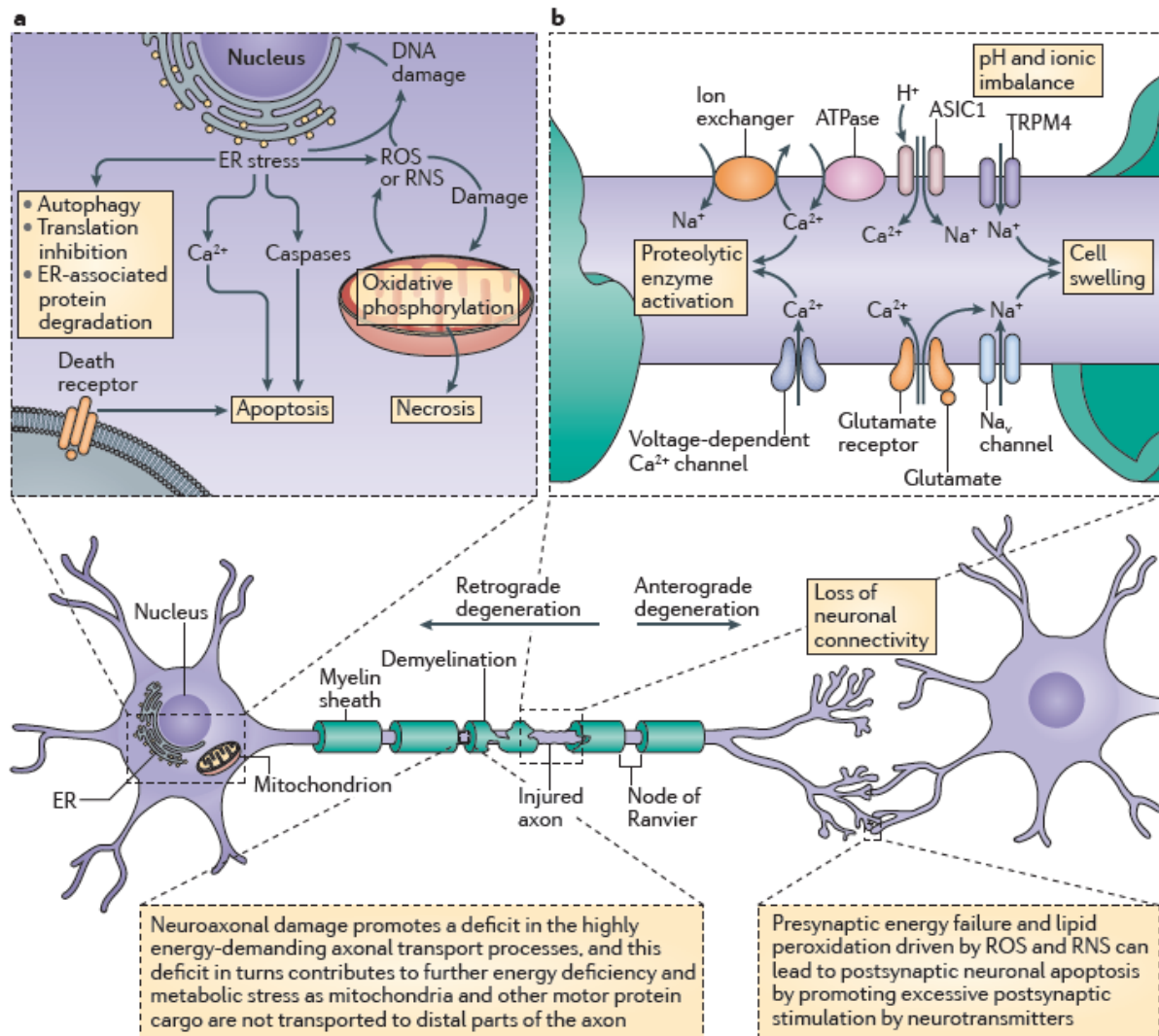


Figure 27 : Les mécanismes clés des processus à l'origine de la dégénérescence axonale  
Adapté de Dendrou et al., 2015.

Dans la sclérose en plaques, l'inflammation chronique induit la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et d'espèces réactives de l'azote (RNS) qui vont altérer le fonctionnement mitochondrial (a). Ceci favorise le stress métabolique, le mauvais repliement des protéines dans le réticulum endoplasmique (ER), une déficience énergétique. Une redistribution des canaux a lieu afin de maintenir la conduction nerveuse, cette redistribution induit un déséquilibre ionique à l'origine d'une accumulation de glutamate dans l'axone entraînant une dégénérescence de l'axone (b).

Ceci conduit à une **modification des échanges ioniques** et notamment une accumulation de sodium au sein de l'axone provoquant un fonctionnement inverse des échangeurs Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> à l'origine d'une

**augmentation de la concentration en  $Ca^{2+}$  intracellulaire.** Cet influx excessif de calcium provoque l'activation de protéases qui vont induire un dysfonctionnement du transport axonal et la dégradation de l'axone ainsi qu'un **dysfonctionnement mitochondrial**. La redistribution des canaux ioniques le long de l'axone va également induire une **augmentation de la demande énergétique** (Werner et al., 2001). En réponse à ce besoin énergétique accru, une augmentation du nombre de mitochondries est observée ainsi que certaines modifications morphologiques (Mahad et al., 2009) ayant notamment pour conséquence **dans les lésions chroniques un dysfonctionnement de la pompe ATPasique  $Na^+/K^+$** . Les axones seraient alors incapables de se repolariser correctement suite aux échanges ioniques, ce qui contribuerait au déclin neurologique (fatigue, troubles cognitifs, ...) observé lors de la chronicisation de la maladie (Dutta and Trapp, 2014) (Figure 27). Enfin, une **excitotoxicité du glutamate** semble participer au processus de dégénérescence puisque chez les patients les niveaux de glutamate sont augmentés dans le liquide céphalo-rachidien et le cerveau et que cette augmentation est corrélée avec l'étendue des lésions axonales (Werner et al., 2001).

#### *6.1.1.2. Les formes cliniques de la maladie*

Chez **85 à 90 % des patients**, la **maladie débute à l'âge de 20 ou 30 ans** par une **forme appelée récurrente-rémittente (SEP-RR)**, durant laquelle les épisodes de symptômes neurologiques apparaissent en l'absence de tout traumatisme, puis s'atténuent progressivement en quelques jours à quelques semaines jusqu'à un retour à la normale le plus souvent. **Après 15 à 25 ans d'évolution**, les symptômes neurologiques s'accumulent en l'absence de récupération, **le patient entre alors dans une forme de la maladie appelée progressive secondaire (SEP-SP)**. Enfin, **chez 10 à 15% des patients, la maladie débute un peu plus tardivement (entre 35 et 45 ans)** directement par une accumulation de symptômes neurologiques avec peu ou pas de poussées **dans une forme appelée progressive primaire (SEP-PP)** (Filippi et al., 2018 ; Thompson et al., 2018) (Figure 28).

Il est couramment considéré que **l'apparition des symptômes lors de la SEP-RR est associée à une poussée de la réponse immune et inflammatoire** et au développement de plaques dans des zones particulières du SNC. **De la localisation des plaques dépendrait le type de symptôme neurologique développé**, du fait de la dégradation de la conduction de l'influx nerveux liée à la démyélinisation. Il est ainsi fréquemment observés : des troubles visuels (dégradation rapide de l'acuité visuelle ou apparition de tâche noire dans le champ visuel) lors de lésions se développant au niveau du nerf optique ; le développement de symptômes moteurs (paralysie légère ou sévère des membres supérieurs ou inférieurs) lors de lésions se développant au niveau de la moelle ; ou encore des troubles de la coordination, de l'équilibre ou de la motricité fine lors de lésions se développant au niveau du cervelet. **La rémission des symptômes serait associée à des phénomènes de récupération avec atténuation de la réponse immune et inflammatoire et une remyélinisation au niveau des plaques actives** permettant une récupération de la fonction neurologique (Filippi et al., 2018 ; Thompson et al., 2018). Associés aux symptômes localisés de la maladie, sont également retrouvés des symptômes plus diffus tels que des ralentissements des processus cognitifs et notamment la mémoire de travail, de la fatigue ainsi que des troubles de l'humeur.

**Le développement des formes progressives quant à lui est associé au processus neurodégénératif** se mettant en place secondairement aux poussées immunes et inflammatoires (SEP-SP) ou directement en début de la maladie (SEP-PP). Plus ces phénomènes neurodégénératifs sont soutenus, plus l'atrophie cérébrale progresse et avec elle les symptômes diffus de la maladie décrits précédemment qui sont d'autant plus fréquents et intenses dans les formes progressives et qui s'accumulent de manière inexorable au cours du temps.

Néanmoins, la neurodégénérescence et la perte de substance grise interviennent précocement dans la maladie quelle qu'en soit la forme et les formes progressives de la maladie ne sont pas totalement exemptes d'atteintes immunitaires. Ainsi la dichotomie réponse immune/SEP-RR vs neurodégénérescence/SEP progressives est une vision trop simpliste de la physiopathologie de la SEP (Hemmer et al., 2002 ; Baecher et al., 2018).

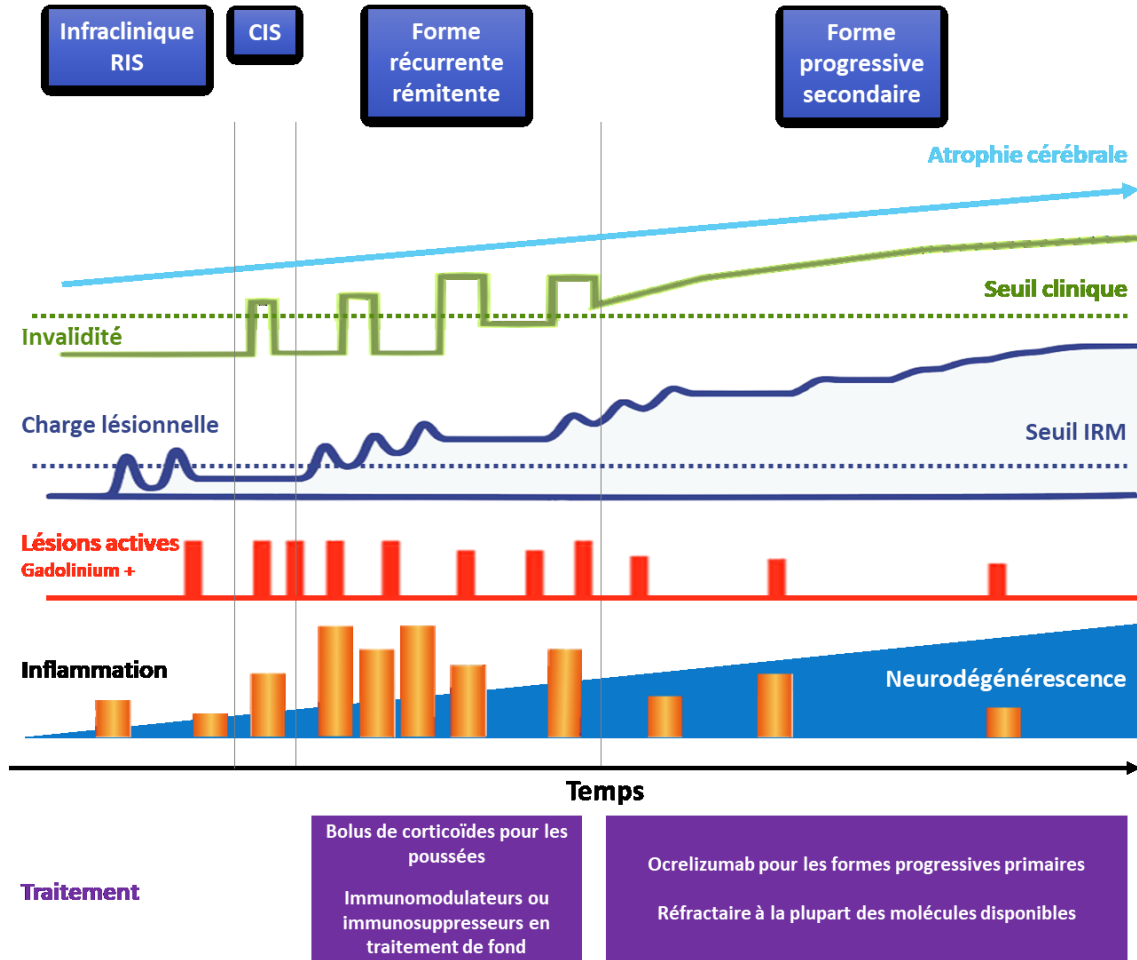


Figure 28 : Représentation schématique de l'évolution au cours du temps de la sclérose en plaques. Adaptée de Meyer et al., 2007 et Baecher and Allen, 2018

La sclérose en plaques peut être découverte de façon accidentelle à l'imagerie par résonance magnétique (IRM) sous la forme d'un syndrome radiologiquement isolé (RIS pour radiological isolated syndrome en anglais) ou se manifester sous la forme d'un syndrome cliniquement isolé (CIS pour clinical isolated syndrome en anglais) suivi par une phase de symptômes récurrents-rémitents. S'en suit une aggravation progressive des symptômes sans récupération marquant l'entrée des patients dans la phase progressive secondaire. Certains patients peuvent présenter directement des symptômes progressifs dès le début de la maladie, c'est la forme progressive primaire. Les corrélats IRM de la maladie incluent une augmentation des lésions positives au gadolinium, qui représentent la rupture de la barrière hémato-encéphalique et l'influx des cellules immunes dans le système nerveux central au niveau des lésions dites actives, ainsi que l'accumulation des anomalies observables en T2 représentant l'ensemble des plaques de démyélinisation (actives ou non) et une diminution du volume cérébral ou atrophie.

### 6.1.1.3. Le cas particulier de la douleur dans la sclérose en plaques

**La douleur chronique constitue chez les patients atteints de SEP un symptôme très invalidant et très fréquent** avec une prévalence estimée de 29 à 86% selon les études (la variabilité étant due aux

différences de paramètres utilisés pour évaluer et définir la douleur) et dont l'apparition peut être très précoce dans le décours de la maladie (Solaro and Uccelli 2011 ; Moisset et al, 2013). **La douleur associée à la SEP est hétérogène et peut ainsi prendre la forme de douleur neuropathique, par excès de nociception ou mixte** ; différents types de douleur pouvant coexister chez le même patient (Truini et al. 2013). Les douleurs par excès de nociception les plus couramment retrouvées sont la migraine, les douleurs musculaires associées à des anomalies posturales, notamment les douleurs dans le bas du dos ainsi que les douleurs associées à la névrite optique. Les douleurs mixtes correspondent à des contractions involontaires des muscles avec des douleurs liées aux spasmes toniques ou à la spasticité chronique (contraction continue des muscles induisant des dommages tissulaires et l'activation des nocicepteurs). Les douleurs neuropathiques se caractérisent par des sensations anormales ou une hypersensibilité des zones affectées, qui chez les patients atteints de SEP peuvent se retrouver à proximité de zones de déficit sensoriel. Ces douleurs peuvent être indépendantes de toute stimulation (les douleurs paroxystiques ou persistantes) ou elles peuvent être évoquées (Thompson et al. 2010). **Parmi les différents types de douleurs neuropathiques, il est possible de citer : les dysesthésies des extrémités** se caractérisant par des sensations de fourmillements, de brûlure ou de douleur le plus souvent observées au niveau des membres inférieurs (Osterberg et al., 2005) ; **le signe de Lhermitte** se caractérisant par une impression de décharge électrique le long du dos ou des membres supérieurs lors de la flexion de la nuque ; ou **la névralgie du trijumeau** se caractérisant par des crises paroxystiques de sensations de chocs électriques au niveau oro-facial. Des troubles de la sensibilité mécanique sont également observés, une forte prévalence d'hypoesthésie ou d'hyperesthésie est retrouvée chez les patients atteints de SEP présentant également des douleurs neuropathiques (61% et 34%) (Osterberg and Boivie, 2010). Ces douleurs neuropathiques sont décrites comme étant les plus persistantes et ayant un fort impact négatif sur la qualité de vie des patients (O'Connor et al., 2008 ; Thompson et al., 2010) ; de plus elles sont peu ou pas améliorées par les antalgiques conventionnels disponibles ni par les traitements de fond de la SEP (O'Connor et al. 2008 ; Solaro and Uccelli 2011 ; Truini et al. 2011).

**La physiopathologie de ces douleurs neuropathiques demeure encore partiellement inconnue.** Le développement de dysesthésie suggère des **lésions médullaires au niveau du faisceau spinothalamique pouvant modifier la transduction des signaux nociceptifs** et notamment diminuer les contrôles inhibiteurs descendants (Truini et al. 2013). De plus, **la libération de cytokines pro-inflammatoires** par les cellules immunitaires pourrait contribuer au développement de ces douleurs neuropathiques (Sachs and Teixeira, 2008). **Un phénomène de sensibilisation centrale lié à l'activation des cellules microgliales et astrocytaires** a également été suggéré mais les données disponibles concernent pour le moment principalement les modèles animaux (Doolen et al., 2018). Enfin, les **dérégulations de l'homéostasie du glutamate, du calcium et des ROS** pourraient également contribuer au développement de ces douleurs neuropathiques (Werner et al. 2001 ; Mahad et al., 2015).

Afin de développer de nouvelles molécules efficaces pour la prise en charge des douleurs neuropathiques dans le cadre de la SEP il est donc nécessaire de mieux caractériser la physiopathologie de ce symptôme puis d'évaluer des molécules ciblant des aspects particuliers.

### **6.1.2. Prise en charge thérapeutique de la sclérose en plaques**

Ces vingt dernières années, d'importants progrès ont été réalisés dans la prise en charge thérapeutique de la SEP et **les médicaments disponibles permettent de réduire significativement le nombre et la**

**durée des rechutes provoquées par la réponse immune au cours de la SEP-RR.** Malheureusement ces traitements **ne parviennent pas ou peu à arrêter l'évolution de la maladie vers une forme progressive** (Lassmann, 2017). Les médicaments disponibles sont constitués : 1) des traitements des poussées qui sont des anti-inflammatoires stéroïdiens (corticoïdes de synthèse principalement la méthylprednisolone) donnés à très forte dose sur une courte durée ; 2) des traitements de fond qui sont en première intention des immunomodulateurs et en deuxième intention des immunosuppresseurs ; 3) des traitements symptomatiques des symptômes non améliorés par les deux classes citées précédemment.

Les mécanismes d'action des traitements de fond de la SEP sont résumés dans la figure 29 ci-dessous illustrant bien que l'ensemble des molécules disponibles ciblent primitivement la réponse immune.

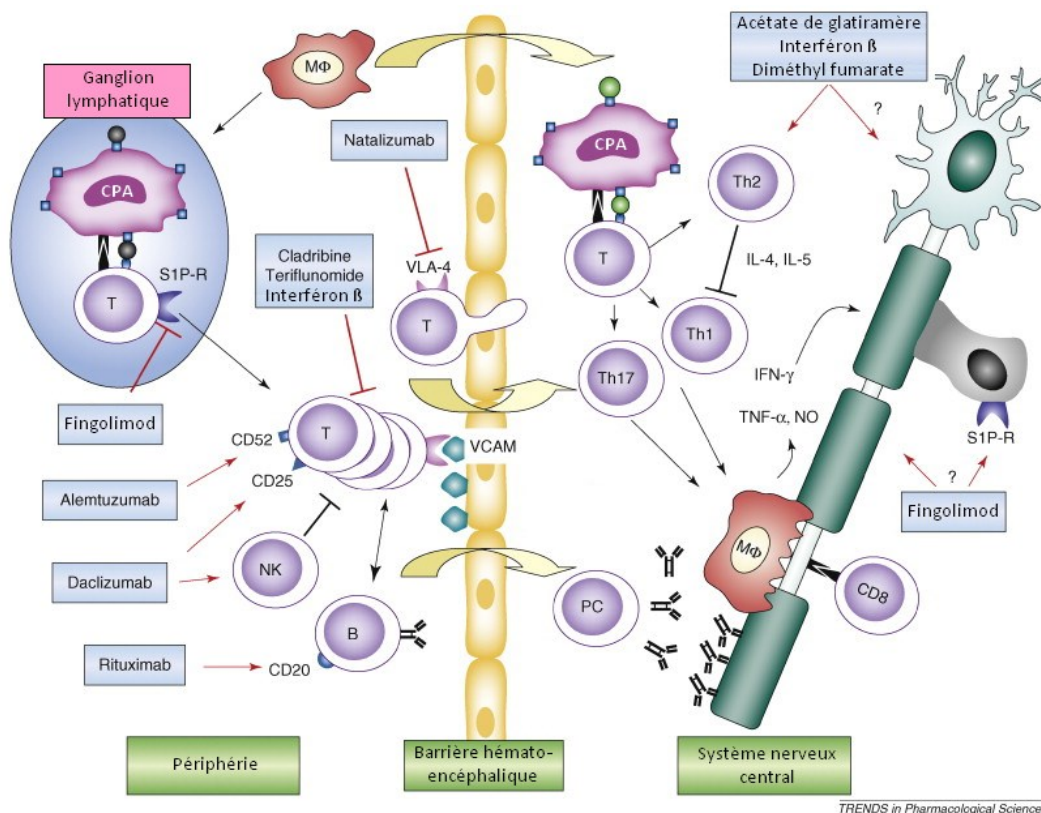


Figure 29 : Représentation schématique des cibles des traitements actuels de la sclérose en plaques. Adapté de Linker et al., 2008.

Les immunomodulateurs et les immunosuppresseurs permettent de supprimer l'activité des cellules du système immunitaire. Ils agissent soit en bloquant leurs actions au niveau du système nerveux central soit plus en amont en bloquant le passage de la barrière hémato-encéphalique ou au niveau de l'activation périphérique des cellules immunitaires.

B : Lymphocyte B ; CD : cluster de différenciation ; CPA : Cellule présentatrice de l'antigène ; IL : Interleukine ; INF- $\gamma$  : Interféron- $\gamma$  ; NK : Lymphocyte « tueur naturel » ; NO : Oxyde nitrique ; M $\Phi$  : Macrophage ; PC : Cellule plasmatique ; S1PR : Récepteur de la sphingosine 1-phosphate ; T : Lymphocyte T ; Th : Lymphocyte T helper ; TNF $\alpha$  : Facteur de nécrose tumorale  $\alpha$  ; VCAM : protéine d'adhésion des cellules vasculaires ; VLA-4 : Intégrine  $\alpha 4\beta 1$ .

Parmi toutes ces molécules actuellement commercialisées, seules l'ocrelizumab à une AMM pour les formes de SEP-PP (et non SP). Une molécule possède un mécanisme d'action qui pourrait laisser envisager une efficacité dans les formes progressives de la maladie ; il s'agit du diméthyl fumarate. En

effet, en plus de son effet inhibiteur de la maturation des cellules dendritiques et de la différenciation des  $L_T$  naïf en cellules Th1 et Th17 autoréactives, le diméthyl fumarate augmente l'activité du facteur nucléaire 2 similaire au dérivé d'érythroïde 2 (Nrf2 pour nuclear factor erythroid-2-related factor 2 en anglais), un facteur de transcription contrôlant l'expression d'un grand nombre de protéines antioxydantes et d'enzyme de détoxification. Néanmoins, l'effet de cette molécule sur les formes progressives de la maladie n'a jusqu'à présent pas été démontré.

**Enfin, l'utilisation chronique de ces immunomodulateurs ou immunosuppresseur est loin d'être dénuée d'effets indésirables** dont certains peuvent être sévères voir très sévère tels que l'augmentation du risque infectieux ou le développement d'une leucoencéphalopathie multifocale progressive provoquant une démyélinisation rapide et diffuse dans le SNC liée à la réactivation du virus JC. Ce dernier effet indésirable, provoqué par des traitements au natalizumab, diméthyl fumarate, fingolimod et ocrélizumab nécessite un arrêt immédiat du traitement dès l'apparition des premiers symptômes et en pratique dès l'augmentation significative de la concentration sanguine en anticorps anti-virus JC. **Il existe donc un intérêt tout particulier à développer de nouveaux traitements pour la prise en charge de la SEP** (Lassmann, 2017).

### **6.1.3. Le stress oxydant comme facteur aggravant de la sclérose en plaques**

#### *6.1.3.1. Brefs rappels sur le stress oxydant et les espèces réactives de l'oxygène*

En biochimie, l'oxydation est un processus au cours duquel une molécule perd des électrons spontanément ou lors de réaction métabolique couplée. Dans le métabolisme cellulaire l'oxydation des molécules fournit la force nécessaire à la production d'ATP, raison pour laquelle les mitochondries constituent la principale (mais non l'unique) localisation des phénomènes d'oxydation dans la cellule. L'oxydation des molécules peut être réalisée lors de réactions catalysées par des enzymes ou comme le résultat de la séquestration d'électron par des molécules spécifiques appelées oxydants ou pro-oxydant. En physiologie, plusieurs espèces réactives ont été impliquées en tant que pro oxydant ; elles sont nommées en fonction de la nature de leur atome réactif à savoir les espèces réactives de l'azote (RNS pour reactive nitrogen species en anglais) ou les ROS qui sont les espèces réactives les mieux caractérisés. **Le terme ROS ne se réfère pas à une molécule, mais à un ensemble de molécules dérivées de l'oxygène** formées par des réactions de réduction-oxydation ou par capture d'électron parmi lesquelles il est possible de citer les anions superoxydes  $O_2^{\bullet-}$ , les radicaux hydroxyles  $\bullet OH$ , les radicaux peroxydes  $RO_2\bullet$ , les hydroperoxydes  $RO_2H$  ou encore les radicaux alkoxydes  $RO\bullet$  (Migdal and Serres, 2011). **Néanmoins, le ROS le plus étudié et possédant le rôle majeur dans la régulation redox est le peroxyde d'hydrogène  $H_2O_2$**  qui sera le seul présenté dans ce travail à titre d'illustration. Avant de parler du stress oxydant et des effets délétères des ROS ou dans le cas présent de  $H_2O_2$ , **il est primordial de noter qu'à l'état physiologique  $H_2O_2$  est exprimé à un niveau faible dit d'équilibre de l'ordre de la nanomolaire** (approximativement entre 1 à 100 nM en fonction des types cellulaires et des localisations subcellulaires) **et qu'il joue alors un rôle fondamental dans la signalisation cellulaire** (rôle qui pourrait être comparé à celui du calcium). **Cette signalisation redox physiologique parfois appelée eustress oxydant** est impliquée dans de nombreuses fonctions cellulaires qui ne peuvent être détaillées dans ce travail mais qui sont représentées très schématiquement dans la figure 30. Cette signalisation redox physiologique est ainsi impliquée dans la réponse immunitaire, le phénomène de cicatrisation, ou encore au cours du neurodéveloppement (Sies and Jones, 2020). Les sources principales de  $O_2^{\bullet-}$  et  $H_2O_2$  sont les NADPH oxydases (NOX) transmembranaires et la chaîne de transport d'électron ou phosphorylation oxydative mitochondriale (Sáez, and Están-Capell, 2014).

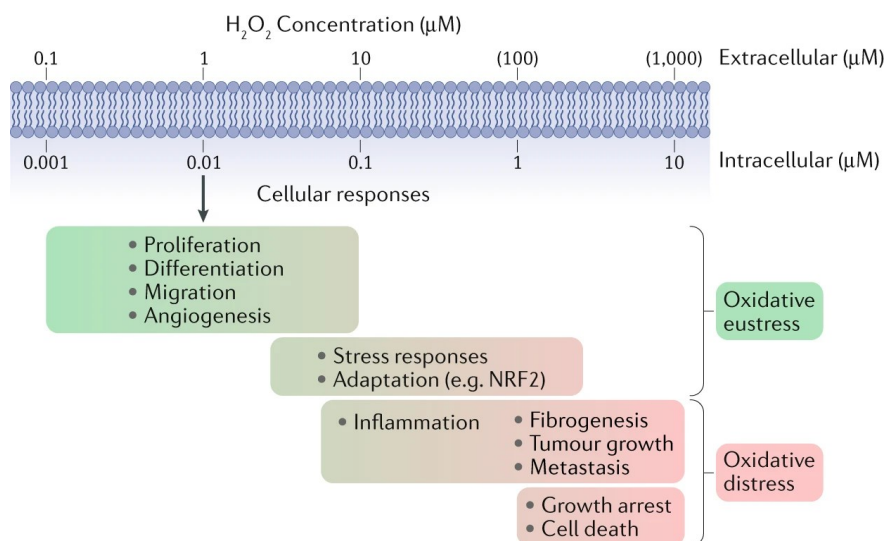


Figure 30 : Gamme de concentration estimée du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en fonction de sa réponse cellulaire physiologique (oxidative eustress) ou pathologique (oxidative distress)

*Extrait de Sies and Jones, 2020*

La concentration physiologique d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oscille entre 1 à 100 nM en fonction des types cellulaires et des localisations subcellulaires. Les réponses au stress et les stratégies adaptatives interviennent pour des concentrations supérieures à 100 nM. Des concentrations beaucoup plus importantes de l'ordre du µM sont responsables de l'arrêt de la croissance cellulaire voire de la mort cellulaire. La couleur verte illustre les niveaux d'oxydation physiologique tandis que la couleur rouge illustre le stress oxydant. Un gradient de concentration 100 fois supérieur pour l'extracellulaire que l'intracellulaire est donné à titre indicatif, cette valeur pourrait être 500 fois plus élevée si la concentration plasmatique de 5 µM d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> était prise en compte.

A l'opposé de cette signalisation redox physiologique, **se développe lorsque les niveaux de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sont trop importants, un phénomène d'oxydation non spécifique des protéines (mais également des lipides et de l'ADN) responsables de nombreuses dysfonctions cellulaires appelé stress oxydant.** Le cerveau, consommant un cinquième du glucose et de l'oxygène disponible dans l'organisme constitue l'organe le plus riche en mitochondries et par voie de conséquence le plus grand producteur de ROS. Il est de plus particulièrement susceptible aux dommages oxydants du fait : de sa richesse en acides gras sujets à la peroxydation, de sa faible activité en catalase en comparaison aux autres organes, et de ses forts niveaux en fer créant un environnement pro-oxydant (Cobley et al., 2018). **Pour l'ensemble de ces raisons, il n'est pas étonnant de retrouver une forte implication du stress oxydant dans de nombreuses pathologies neurodégénératives et notamment la SEP.** La figure 31 représente schématiquement, les conséquences de concentrations physiologiques ou toxiques d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sur la physiologie axonale.

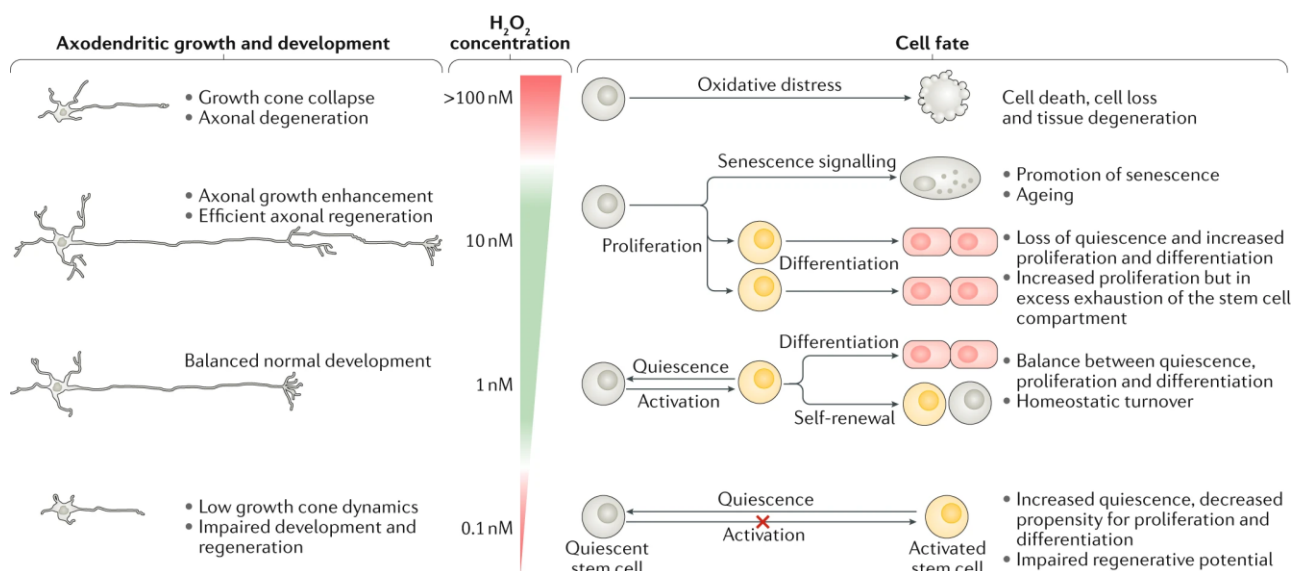


Figure 31 : Conséquences des variations de concentrations d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sur la physiologie axonale  
Extrait de Sies and Jones, 2020

La concentration physiologique en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oscille entre 1 à 10 nM et favorise à la fois les croissances axonale et dendritique (coloration verte). Une augmentation modérée de la concentration en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (jusqu'à 100 nM) est associée à des croissances axonale et dendritique augmentée qui permet la réparation axonale après une lésion. Une concentration anormalement élevée de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (> 100 nM) favorise le stress oxydant (coloration rouge) et conduit à la destruction du cône de croissance et par la suite à la dégénérescence axonale. De la même façon, une concentration anormalement élevée de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (< 0,1 nM) est délétère pour le développement neuronal.

Généralement les cellules progénitrices maintiennent un niveau bas en molécule oxydantes (notamment H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) durant les phases de quiescence ou d'auto-renouvellement cellulaire, niveau qui est augmenté durant la différenciation. Ainsi les niveaux physiologiques d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> régulent la balance entre la prolifération, l'auto-renouvellement et la différenciation. Des niveaux trop faibles en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> empêchent la sortie de quiescence et diminuent la prolifération ce qui peut impacter négativement les processus de régénéscence, tandis qu'un niveau légèrement augmenté peut être bénéfique à la prolifération puis à la différenciation avec néanmoins un risque d'épuisement du pool de progéniteur. Enfin une augmentation trop importante sera responsable d'un stress oxydant et de la mort cellulaire.

**Les mécanismes de défense cellulaire contre les dommages provoqués par les ROS incluent les antioxydants enzymatiques et non enzymatiques** (Waslo et al., 2019). Les antioxydants non enzymatiques sont des petites molécules piègeuses de radicaux libres (et notamment de ROS) qui peuvent être endogènes tels que l'acide urique, le glutathion, l'acide lipoïque ou la coenzyme Q ou bien qui peuvent être exogènes tels que la vitamine C ou ascorbate, la vitamine E ou  $\alpha$  tocophérol ou encore le sélénium (Waslo et al., 2019). **Les antioxydants enzymatiques convertissent les ROS en des espèces moins réactives et constituent ainsi le mécanisme de défense le plus important contre les dommages tissulaires induits par le stress oxydant.** Ces enzymes antioxydantes catalisent principalement trois types de réactions différentes ; la dismutation (réaction chimique dans laquelle une espèce joue à la fois le rôle d'oxydant et de réducteur), la peroxydation et la réduction de thiol. Il existe un grand nombre d'enzymes antioxydantes parmi lesquelles il est possible de citer : l'hème oxygénase, les peroxyrédoxines, la glutathion réductase ou la glutathion S-transférase ; mais **les enzymes antioxydantes les plus importantes sont les superoxyde dismutases (SOD), la catalase et les GPx** (Sáez and Están-Capell, 2014). Comme leurs noms l'indiquent, les SOD sont responsables des réactions de dismutation transformant le très réactif ion superoxyde H<sup>-</sup> en peroxyde d'hydrogène H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> qui s'il reste toujours réactif, ne possède plus d'électron libre (Figure 32).

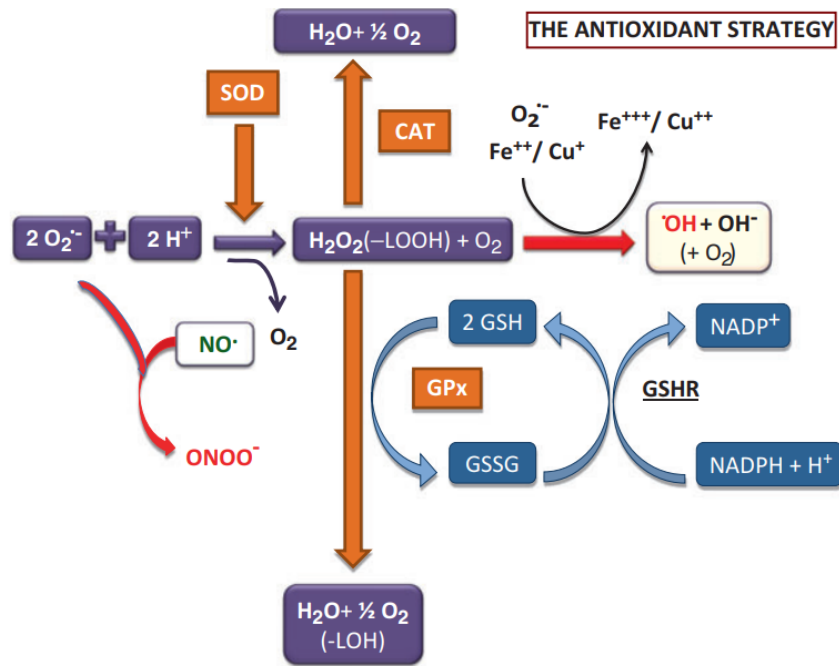


Figure 32 : Réactions catalysées par les principales enzymes antioxydantes  
Extrait de Sáez, and Están-Capell, 2014

Le fonctionnement synchronisé de la superoxide dismutase (SOD), de la catalase et de la glutathion peroxidase (Gpx) évite les interactions de  $O_2^{\bullet-}$  avec  $H_2O_2$  ainsi que la transition vers des ions métalliques ( $Cu^+/Fe^{2+}$ ) par les réactions de Haber-Weiss ou de Fenton qui seraient responsables de la formation d'espèces hautement réactives de l'oxygène telles que  $\bullet OH$  ou de la formation d'un substrat cytotoxique  $ONOO^-$  par l'interaction de  $O_2^{\bullet-}$  avec le monoxyde d'azote (NO). Ces stratégies antioxydantes protègent la cellule contre une synthèse excessive d'espèces réactive de l'oxygène et de l'azote et ainsi limite le développement d'un stress oxydant.

Trois isoformes principales de SOD ont été identifiées chez l'humain, SOD1 ou SOD à cuivre-zinc qui est localisée dans le cytosol des cellules, SOD 2 ou SOD à manganèse qui est localisée dans la mitochondrie où elle est responsable de la dismutation des radicaux superoxydes formés dans la chaîne de transport d'électron, et enfin SOD 3 ou SOD extracellulaire. La catalase est principalement localisée dans les peroxysomes où elle décompose  $H_2O_2$  en eau et oxygène (Figure 32). Elle possède également des propriétés de détoxification et de peroxydation qui ne seront pas détaillées ici. Les Gpx appartiennent à une superfamille de 8 isoenzymes (GPx1-8) qui catalysent la réduction de l'hydroperoxyde  $RO_2H$  en groupement alcoolique en utilisant le glutathion réduit comme cosubstrat (qui deviendra alors oxydé) pour l'ensemble d'entre elles, et qui décomposent  $H_2O_2$  en eau et oxygène pour celles contenant du sélénium (Figure 32). Le glutathion oxydé au cours de ces réactions sera par la suite réduit grâce à l'action de la glutathion réductase en utilisant le NADPH comme substrat (Sáez and Están-Capell, 2014). Parmi les 8 isoformes de GPx, GPx1 est la plus ubiquitaire et la plus abondante ; elle contient toujours du sélénium. Les autres isoformes ont des expressions plus localisées, à titre d'exemple Gpx2 est retrouvée principalement dans le tractus gastrointestinale tandis que Gpx3 est retrouvée principalement dans le sang.

**L'expression de ces enzymes antioxydantes est sous le contrôle de Nrf2** qui régule l'expression de plus de 250 protéines antioxydantes mais également de cytokines pro-inflammatoires selon une boucle de régulation négative activée par le stress oxydant lui-même.

*6.1.3.2. Stress oxydant et sclérose en plaques*

**Des preuves du développement du stress oxydant ont été apportées au niveau du SNC de patients atteints de SEP** par des études neuropathologiques montrant un marquage à la nitrotyrosine, un marqueur des lésions induites par les peroxy-nitrites, plus particulièrement au niveau de zones présentant une forte inflammation. Des niveaux augmentés de peroxy-nitrites, de malondialdéhyde (un marqueur de la peroxydation lipidique) et de monoxyde d'azote ont été observés dans le liquide céphalorachidien de patients (Zhang et al., 2020). D'autres marqueurs du stress oxydant ont été retrouvés dans les tissus de patients à la fois dans les plaques actives ou chroniques, tels qu'une augmentation de la présence de radicaux libre associée à une diminution des niveaux de glutathion et d'ascorbate retrouvée chez certains patients (Pegoretti et al., 2020). Une augmentation de la densité mitochondriale est également fréquemment retrouvée tout comme une accumulation au niveau des macrophages phagocytiques et des astrocytes hypertrophiques de 4-hydroxy-2-neonal un aldéhyde réactif toxique marqueur du stress oxydant (Waslo et al., 2019). Enfin, la présence de lipides, phospholipides et de nucléotides oxydés a été observée dans certains prélèvements (Haider et al., 2011 ; Dong et al., 2021).

**L'origine du stress oxydant chez les patients atteints de SEP est multiple avec très probablement une séquence temporelle et une interrelation des événements redox différentes entre la SEP récurrente-rémittente et la SEP progressive mais également selon les stades de la maladie et selon les patients.**

Une première source de ROS et de RNS sont les cellules immunitaires périphériques et les macrophages. Les ROS produits par les lymphocytes facilitent leur transmigration à travers la BHE puis favorisent la phagocytose de la myéline par les macrophages (Waslo et al., 2019). Un second acteur du stress oxydant sont les cellules microgliales qui lorsqu'elles sont activées produisent, par l'intermédiaire de l'enzyme NADPH oxydase et les myéloperoxydases des ROS (Pegoretti et al., 2020). Le stress oxydant est également amplifié par la libération de fer, initialement présents dans les feuillettes myéliniques, dans l'espace extracellulaire lors de la démyélinisation. Dans un contexte pro-oxydant déjà avancé, par la réaction de Fenton, le fer ferreux  $Fe^{2+}$  est oxydé en fer ferrique  $Fe^{3+}$ , tandis que le peroxyde d'hydrogène est converti en radical hydroxyle  $\bullet OH$  et anion hydroxyle  $OH^-$  hautement réactifs et ceci amplifie une nouvelle fois le stress oxydant participant dans certaines régions du cerveau à la propagation de la neurodégénérescence et de l'atrophie (Mahad et al., 2015).

Ces premières vagues de stress oxydant sont délétères pour le fonctionnement des mitochondries axonales qui rappellent le souffrent déjà de la surcharge énergétique provoquée par la démyélinisation. L'excès de ROS et de RNS va conduire à un arrêt de la chaîne respiratoire et à la libération d'électrons induisant une seconde vague de production de ROS et une amplification du phénomène dégénératif (Frieese et al., 2014). Une activation de l'apoptose a également lieu suite à la libération de facteurs pro-apoptotiques par les mitochondries. De plus, les espèces réactives endommagent l'ADN mitochondrial au cours du temps, le nombre de mitochondries défectueuses s'amplifie.

**Ainsi le stress oxydant va augmenter progressivement au fur et à mesure de la maladie** et étendre ses conséquences néfastes : oxydation des protéines et des lipides ainsi que des lésions de l'ADN. Il participe alors à de nombreux dysfonctionnements cellulaires touchant les canaux ioniques, la signalisation des récepteurs couplés aux protéines G ou encore le cytosquelette axonal (Kutzelnigg and Lassmann, 2014).

Ont été détaillés dans ce chapitre, les effets délétères du stress oxydant au niveau du SNC des patients atteints de SEP (Figure 33), mais **il est important de rappeler que la signalisation redox est également très importante dans le développement de la réponse immune** et que la présence du stress oxydant dans le cas de la SEP participe très probablement également à l'aggravation de la physiopathologie



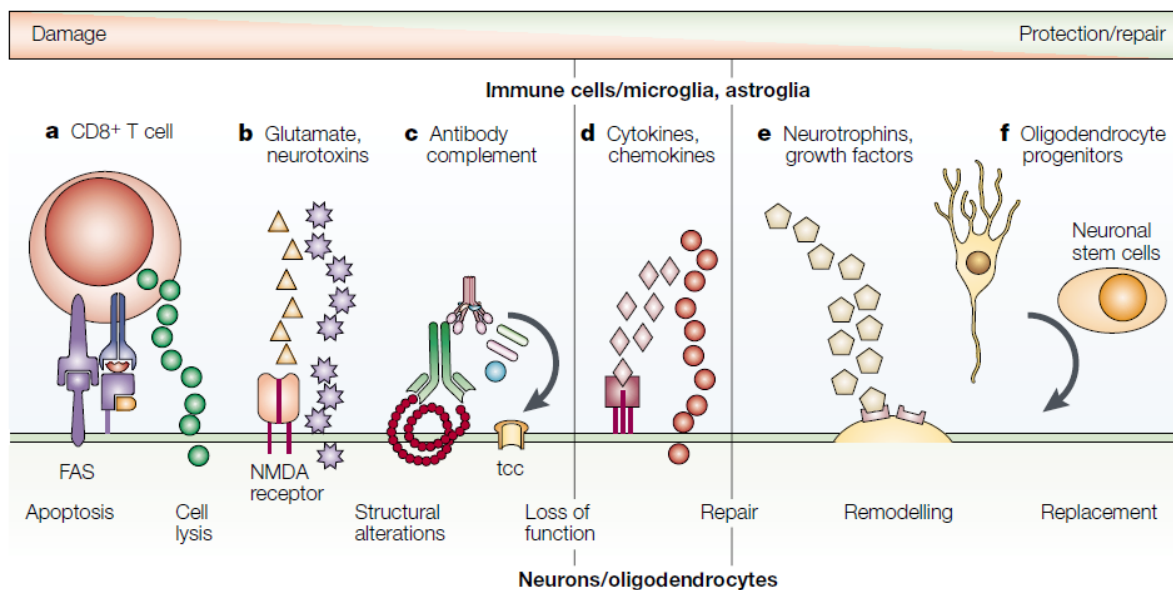


Figure 34 : Interactions moléculaires entre le système nerveux central, l'inflammation et la réponse immunitaire participant aux processus lésionnels mais également de réparation lors du développement de la sclérose en plaques  
*Extrait de Hemmer et al., 2002*

Cette illustration reprend les mécanismes de lésion et de réparation des neurones et des oligodendrocytes lors du développement de la sclérose en plaques. Ces mécanismes incluent : a) l'attaque directe des cellules par les lymphocytes T CD8 spécifiques avec la libération de granules cytotoxiques et la liaison de molécules Fas ; b) la libération par les cellules gliales d'acides aminés excitateurs et de neurotoxines qui se fixent sur des récepteurs glutamatergiques ou provoquent une excitotoxicité directe ; c) la fixation d'anticorps spécifiques conduisant à une activation du complément et à la formation du complexe d'attaque membranaire (tcc) (cette étape permettant l'élimination des débris pourrait favoriser la remyélinisation) ; d) la libération de cytokines, de métalloprotéinase de la matrice et de métabolites par les macrophages, les cellules microgliales, les lymphocytes et les astrocytes (phénomènes impliqués à la fois dans l'inflammation, la neurodégénérescence et la neuroprotection) ; e) la libération par les cellules gliales et les lymphocytes T CD4 de neurotrophines qui sont impliquées dans la neuroprotection et la réparation ; f) la migration des progéniteurs oligodendrocytaires et des cellules souches neuronales vers les lésions afin de réparer les lésions tissulaires.

NMDA : N-méthyl-D-aspartate

**Le modèle EAE est le modèle le plus couramment utilisé** et repose sur l'observation de complications neurologiques (dont la plus fréquente était une encéphalomyélite aiguë disséminée) lors de vaccinations antirabiques utilisant des virus inactivés amplifiés sur des cellules neuronales ou dans des cerveaux insuffisamment purifiés. C'est à partir de ces observations cliniques que Rivers développa en 1933 le premier modèle d'EAE en immunisant des singes par injection d'extraits de cerveaux de lapin (Rivers et al., 1933). Le modèle a par la suite été développé dans de nombreuses espèces animales incluant notamment les cochons d'inde, les lapins, les poissons zèbres mais c'est chez le rat et surtout la souris qu'il a été le plus couramment utilisé (Kipp et al., 2012). Les protocoles d'immunisation ont également évolué, les extraits de cerveau ont été remplacés par des protéines spécifiques de la myéline (MBP, MOG ou PLP) elles-mêmes remplacées par des **peptides encéphalitogènes** tels que MBP<sub>1-37</sub>, la MOG<sub>35-55</sub> et la PLP<sub>139-151</sub>, permettant l'obtention de modèles plus reproductibles (Mix et al., 2010). Plus tard, afin de potentialiser l'immunisation fût ajouté : 1) l'**adjuvant complet de Freund** (CFA), un mélange d'huile de paraffine (permettant de libérer progressivement les antigènes

sensibilisant) et de *Mycobacterium tuberculosis* (stimulant une réponse immune intense) afin de stimuler la réponse immune humorale ; puis 2) la **toxine pertussique** (PTX) produite par la bactérie *Bordetella pertussis* afin d'augmenter la perméabilisation de la BHE (Denic et al., 2016). L'EAE peut également être induite par immunisation passive (transfert de L<sub>T</sub> activés d'une souris immunisée vers une souris saine) mais ce mode d'induction ne sera pas développé dans ce travail.

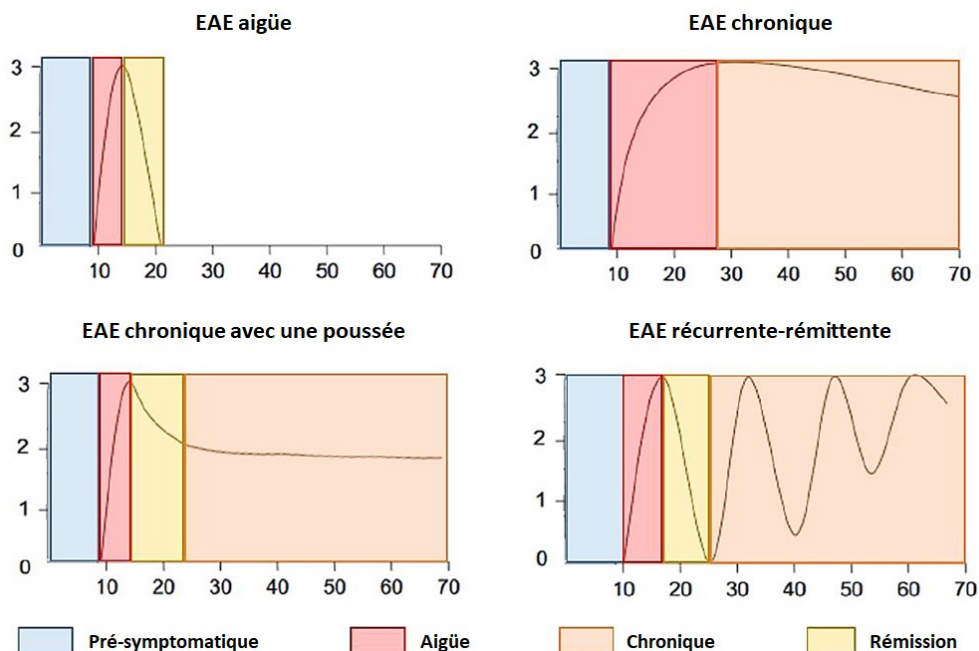


Figure 35 : Représentation schématique du déroulement temporel des symptômes dans les différentes variantes d'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE) induites chez la souris et utilisées pour étudier les troubles sensitifs  
*Adapté de Hemmer et al., 2002*

Chez les souris, l'EAE se caractérise par une paralysie ascendante débutant par une atteinte de la queue, suivi de la paralysie des pattes arrière puis avant, évaluée par une échelle à cinq points, pouvant varier d'un modèle à un autre, mais qui communément s'échelonne de 0 (aucun signe clinique) à 5 (mort de l'animal). Un score de 4 correspond à l'apparition de paralysies sévères des membres inférieurs et/ou supérieurs. Dans les modèles utilisés pour étudier les troubles sensitifs il est nécessaire que les symptômes moteurs ne soient pas trop sévères afin que les souris soient capables d'exercer des mouvements de retrait lors de l'exposition à des stimuli douloureux. Ainsi dans ces modèles un score clinique supérieur à 3 est rarement dépassé.

Suite à l'immunisation, plusieurs phases de la maladie peuvent être distinguées en fonction des protocoles d'induction du modèle : une phase pré-symptomatique, suivie d'une phase aiguë qui correspond à l'apparition et au pic des symptômes qui peut être immédiatement suivie : d'une phase de rémission complète des symptômes dans le cas d'une EAE aiguë, d'un plateau lorsqu'aucune amélioration des symptômes n'est constatée dans le cas d'une EAE chronique, soit d'une récupération incomplète suivie d'un plateau de stagnation des symptômes dans le cas d'une EAE chronique à poussée unique, soit enfin d'une alternance de phases de rémissions et de rechutes dans le cas d'une EAE récurrente-rémittente.

**Chez la souris, selon les protocoles d'immunisation et les fonds génétiques utilisés, différentes formes de SEP peuvent être mimées** (Figure 35). Par exemple, les souris SJL sont sensibles à l'immunisation par l'administration de PLP, MOG et de MBP (que ce soit la protéine entière ou un peptide). Lorsqu'elles sont immunisées avec du PLP<sub>139-151</sub>, elles présentent souvent une forme d'EAE-RR alors qu'une immunisation avec de la MOG<sub>35-55</sub> induit une forme chronique (Kipp et al., 2012). Les souris C57BL/6 sont sensibles uniquement à une immunisation par la MOG et développent le plus

souvent une forme chronique de la maladie à l'exception d'un modèle de forme RR pour lequel le CFA a été remplacé par du Quillaja A ou Quil A un adjuvant de vaccination classiquement utilisé en médecine vétérinaire stimulant la réponse immune sans l'effet inflammatoire également induit par le CFA (Peiris et al., 2007 ; Khan et al., 2014). **Enfin, toujours selon le protocole d'immunisation, les souris EAE peuvent développer différents types de symptômes ; dans ce travail nous ne nous intéresserons qu'à des modèles EAE développant des troubles sensitifs** (Khan and Smith, 2014).

**Bien que présentant de nombreuses caractéristiques cliniques et neuropathologiques communes avec celles observées dans la SEP, le modèle EAE présente également plusieurs limites** (Mix et al., 2010). Tout d'abord, dans ce modèle animal, **l'initiation de la maladie est « artificielle » et l'évolution temporelle des symptômes diffère de ce qui est observée en clinique**. Chez l'homme, la maladie est très probablement initiée plusieurs années avant le début des manifestations cliniques, alors que les symptômes dans les modèles EAE sont détectés dans les semaines, voire les jours qui suivent l'induction de la maladie. A cela, s'ajoute le fait que **les lignées de souris utilisées lors des études précliniques ont des fonds génétiques très homogènes comparés à l'hétérogénéité génétique observée chez l'homme**. De plus, **il est évident que des différences existent entre le système immunitaire et le système nerveux humain et murin**, les données observées chez la souris ne peuvent donc qu'être hypothétiquement extrapolées à l'humain. Enfin, **l'EAE est principalement une maladie de la substance blanche sous-piale de la moelle épinière tandis que dans la SEP la démyélinisation est fortement observée au niveau de l'encéphale** et notamment du cortex (bien que des lésions spinales soient également présentes) (Ransohoff, 2012).

Probablement en conséquence de ces limitations, **si les modèles EAE ont montré un intérêt notable dans le développement des médicaments immunomodulateurs et immunosuppresseurs actuellement commercialisés pour le traitement de la SEP-RR, ils n'ont apporté que peu ou pas de connaissance(s) sur l'évolution progressive de la maladie** (Mix et al., 2010). En effet, les formes chroniques d'EAE (Figure 35) ne sont pas réellement des modèles de SEP progressive du fait de : 1) la rémission des symptômes après un temps plus ou moins long selon le type d'immunisation (de quelques semaines à quelques mois) ; 2) l'absence de dégénérescence axonale marquée et d'atrophie cérébrale. Quelques rares modèles EAE sont décrits comme pouvant mimer la SEP-SP lorsqu'ils sont induits dans des fonds génétiques très particuliers tels que les souris Biozzi ABH ou les souris non-obèse diabétique (NOD) possédant toutes les deux des haplotypes particuliers de la classe II du complexe majeur d'histocompatibilité les rendant susceptibles aux pathologies auto-immunes (Simmons et al., 2013).

**C'est pour l'ensemble de ces raisons qu'au cours des travaux de recherche discutés dans le prochain chapitre, en comparaison à un modèle de souris EAE, les souris Plp null ont été utilisées non pas comme un modèle de SEP-PP à proprement parlé mais comme un modèle de pathologie dysmyélinisante conduisant à une dégénérescence axonale secondaire associée à des atteintes du stress oxydant et provoquant des symptômes moteurs, cognitifs et sensitifs**. Nous faisons l'hypothèse que des médicaments pouvant améliorer la physiopathologie de ces souris, pourraient améliorer aux moins certains aspects physiopathologiques des formes progressives de SEP.

## 6.2. Principaux résultats

### 6.2.1. Développement des modèles animaux et évaluation des troubles sensitifs

Comme cela vient d'être dit juste avant, le projet de recherche repose sur une analyse en parallèle de deux modèles animaux mimant deux aspects distincts de la physiopathologie de la SEP : la réponse immune et inflammatoire par le biais d'un modèle EAE et la dégénérescence axonale par le biais des souris Plp null. Devant le très large éventail des modèles EAE induits chez la souris, notre choix s'est porté sur celui développé par l'équipe de Maree T Smith étant donné qu'il 1) mime la forme la plus commune de la maladie à savoir la SEP-RR, 2) développe une allodynie mécanique sévère et de durée importante associée à des troubles moteurs modérés permettant l'évaluation de traitements préventifs ou curatifs sur des durées relativement longues (Khan et al., 2014). Ce travail a pu être initié grâce à l'obtention en 2017 d'une subvention de la Fondation ARSEP et d'une bourse de thèse du ministère pour mon étudiante en M2 Amélie Démosthènes.

Il a dans un premier temps fallu mettre en place le modèle au laboratoire et affiner sa caractérisation comportementale. Notre première étude avec les souris EAE-RR a permis de confirmer qu'elles développent une allodynie mécanique à partir de J30 et de montrer que ces souris présentent également une hyperalgésie au chaud et une allodynie au froid lorsque les stimulations sont appliquées sous la patte (Figure 36). L'évaluation des symptômes présents dans la sphère oro-faciale a montré que les souris EAE-RR ne présentent pas d'anomalies de la sensation au froid ni de la sensibilité mécanique pour des stimuli statiques. Par contre lorsque cette sensibilité mécanique est évaluée par des stimuli dynamiques, les souris EAE-RR présentent une allodynie transitoire.

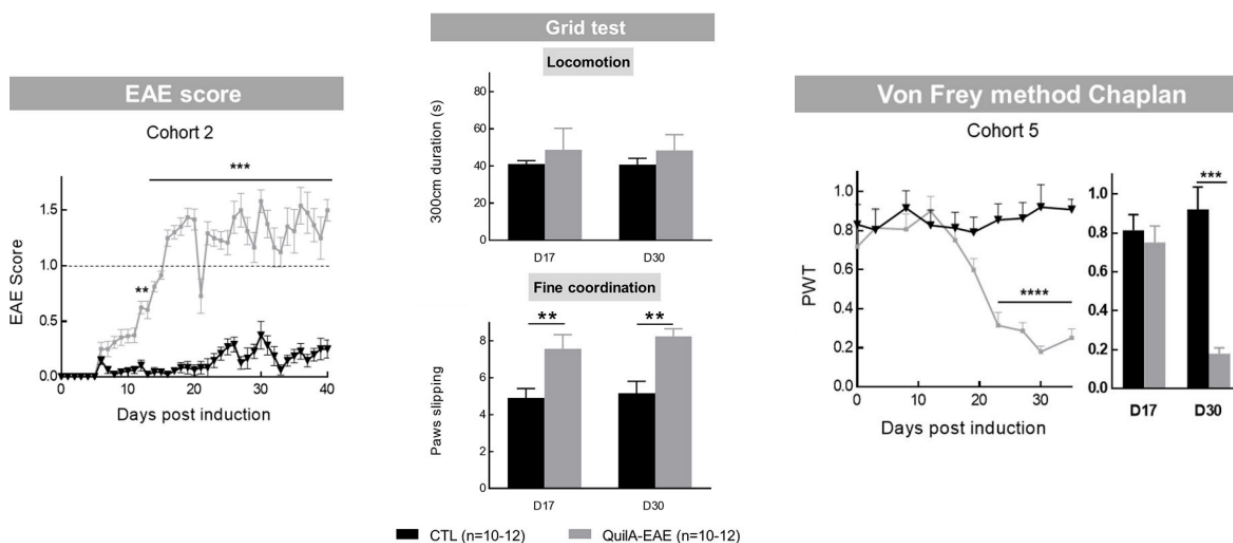


Figure 36 : Caractérisation comportementale du modèle d'encéphalomyélite auto-immune expérimentale récurrente-rémittente (EAE-RR)

*Adapté de Démosthènes et al., 2022*

Suivi longitudinal du score EAE basé sur l'échelle décrite par Khan et al., 2014 avec 0 pas de symptômes et 4 quadriplégie. ANOVA 2 voies suivies du test *post-hoc* Sidak ; \* $p < 0,01$  ; \*\*\* $p < 0,001$  vs contrôle (CTL).

Test de la grille permettant de tester la motricité fine des souris évaluées par le temps nécessaire pour parcourir 300 cm sur la grille (locomotion) et le nombre de faux-pas à travers les mailles de la grille durant ce parcours (coordination fine). ANOVA 2 voies suivies du test *post-hoc* Sidak ; \*\* $p < 0,001$ .

Allodynie mécanique évaluée par le test de von Frey selon la méthode de Chaplan. Le seuil mesuré (PWT) est un indicateur de la résistance du filament de nylon utilisé pour évoquer un retrait de la patte chez les souris. ANOVA 2 voies suivie du test *post-hoc* Sidak ; \*\*\* $p < 0,001$  ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ .

L'évaluation du score EAE (selon l'échelle décrite par Khan et al., 2014) a confirmé une évolution des symptômes par poussée (score modéré de 2 - paralysie de la queue et une paralysie unilatérale partielle de la patte arrière) suivi de phase de rémission (score inférieur à 1 - faiblesse de la queue) (Figure 36). L'évaluation des comportements moteurs a montré que les souris EAE-RR ne présentent pas de modification de l'activité locomotrice spontanée (test de l'open-field), ni de diminution de la coordination motrice (test du rotarod), ni de diminution de la force musculaire (test d'agrippement). Seule la réalisation d'un test moteur permettant d'évaluer la coordination motrice fine a permis de mettre en évidence un déficit chez ces souris. Aucune modification n'a été observée chez les souris EAE-RR en ce qui concerne la mémoire de travail évaluée par le labyrinthe en Y, ou les comportements de type anxieux qu'ils soient évalués par le test d'enfouissement de bille ou le labyrinthe en croix surélevé. Enfin, dans une dernière expérience, nous avons évalué la capacité d'une dose aiguë de prégabaline à réduire les troubles sensitifs observés chez les souris EAE-RR. Les résultats obtenus montrent une efficacité dose dépendante de la prégabaline (dose de 10 et 30 mg/kg) pour réduire l'hyperalgésie thermique et l'allodynie mécanique.

Ce travail a donné lieu à une publication dans *Frontiers in Neurology*.

*Démsthènes A, Sion B, Giraudet F, Moisset X, Daulhac L, Eschalier A, Bégou M. In-Depth Characterization of Somatic and Orofacial Sensitive Dysfunctions and Interfering-Symptoms in a Relapsing-Remitting Experimental Autoimmune Encephalomyelitis Mouse Model. Front Neurol. 2022 Jan 17;12:789432. doi: 10.3389/fneur.2021.789432.*

### **6.2.2. Evaluation de l'effet d'un cocktail antioxydants chez les souris présentant une invalidation du gène codant les protéolipoprotéines**

Ce travail faisait suite aux résultats obtenus en collaboration avec l'équipe d'Aurora Pujol ayant montré la présence d'un stress oxydant modéré dans le modèle des souris Plp null (chapitre 5.2.2. p50) avec l'objectif de compléter l'analyse comportementale des troubles sensitifs dans le modèle et d'évaluer l'effet thérapeutique potentiel d'un cocktail de trois molécules antioxydantes : l'acide lipoïque, la N-acétylcysteine et la vitamine E ( $\alpha$ -D-tocophérol), administré chez des animaux âgés de 3 à 7 mois. Ce cocktail utilisé par l'équipe d'Aurora Pujol avait montré son efficacité pour ralentir la dégénérescence axonale dans un modèle de X-ALD (López-Erauskin et al., 2011). Les molécules avaient alors été choisies car possédant des fonctions antioxydantes complémentaires : l'acide lipoïque est capable de réduire les formes oxydées du glutathion, du coenzyme Q10 et de l'ascorbate, de chélater les métaux et de jouer le rôle de piègeur de radicaux libres. La N-acétylcysteine stimule la production de glutathion et joue le rôle de piègeur de radicaux libres. La vitamine E est capable de réduire les radicaux peroxydes RO<sub>2</sub>• en hydroperoxydes RO<sub>2</sub>H moins réactif (López-Erauskin et al., 2011).

Au cours de cette étude, l'évaluation des comportements sensitifs au niveau somatique (patte) a montré l'apparition d'une hyperalgésie au chaud chez les souris Plp null dès l'âge de 3 mois et d'une hypoalgésie mécanique dès l'âge de 6 mois en l'absence d'allodynie au froid. Ces résultats confirment l'apparition très précoces des symptômes sensitifs chez les souris Plp null. Concernant l'évaluation des comportements sensitifs au niveau oro-facial, une hyposensibilité mécanique a été observée à partir de 6 mois uniquement pour les stimuli mécaniques dynamiques les plus intenses qui s'accompagne d'une hyposensibilité au froid présente chez les animaux dès 3 mois. Malheureusement, le cocktail antioxydant testé n'a montré aucun effet sur les comportements testés (Figure 37).

L'effet du cocktail anti-oxydant n'a pas été évalué dans le modèle EAE-RR car Khan et al., avaient déjà montré dans une étude précédente l'effet bénéfique de l'acide lipoïque seul dans ce modèle (Khan et al., 2015). Par contre, il est à noter qu'un traitement similaire a été mis en place chez les animaux +PlpTg dès la naissance (d'abord en traitant la mère allaitante puis l'animal lui-même après le sevrage). Ce traitement a dû être arrêté prématurément (avant les 4 semaines des animaux) car les souris traitées contrôles et +PlpTg présentaient une perte de poids et des troubles moteurs sévères (encore plus sévères que le phénotype des souris +PlpTg). Ce résultat confirme l'importance d'identifier des traitements antioxydants respectant la signalisation redox physiologique ; et ce en fonction du niveau développemental des animaux traités. En effet, un traitement antioxydant bien toléré chez les animaux adulte peut s'avérer très délétère chez les animaux prépubères dont le développement (du SNC notamment) n'est pas terminé.

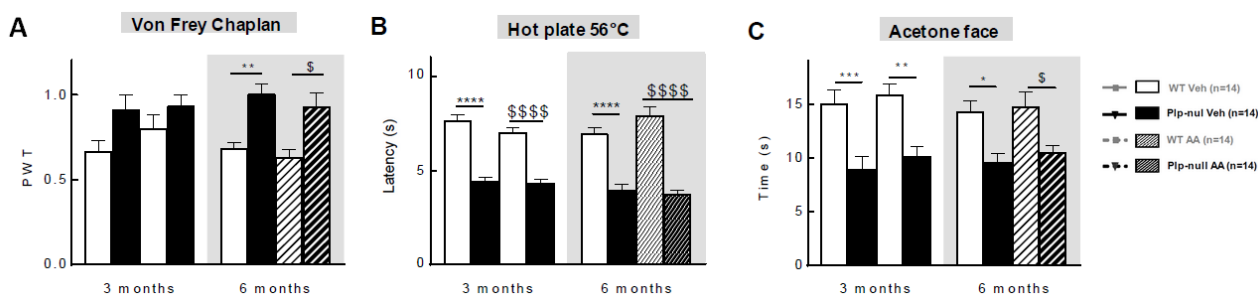


Figure 37 : Caractérisation comportementale de l'effet du cocktail antioxydant sur les souris sauvages (WT) et présentant une invalidation du gène *Plp1* (Plp null)

Données non publiées

A - Absence d'effet du cocktail antioxydant sur l'allodynie mécanique somatique développée chez les souris Plp-null à partir de 6 mois évaluée par le test de von Frey selon la méthode de Chaplan.

B - Absence d'effet du cocktail antioxydant sur l'hypoalgésie thermique somatique développée chez les souris Plp-null à partir de 3 mois évaluée par l'exposition à une plaque chauffée à 56°C.

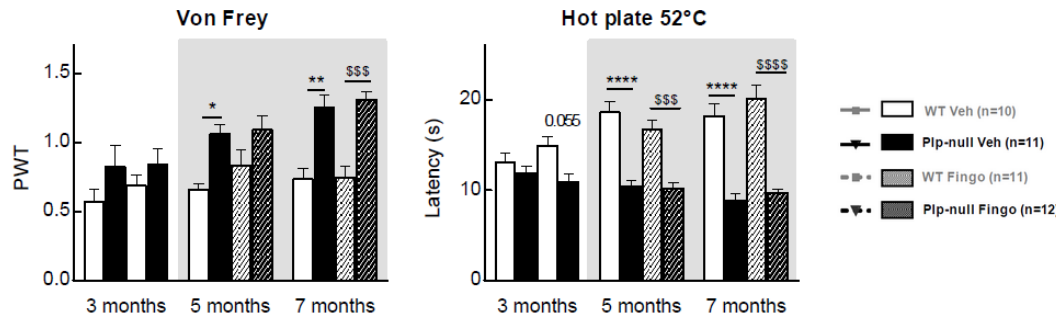
C - Absence d'effet du cocktail antioxydant sur l'hypoalgésie thermique au froid développée chez les souris Plp-null à partir de 3 mois lors de l'application d'acétone à côté de la zone des vibrisses.

ANOVA 2 voies suivie d'un test *post hoc* de Tuckey - \* $p < 0,05$  ; \*\*\* $p < 0,001$  \*\*\*\* $p < 0,0001$  comparaison Plp-null véhicule (Veh) vs WT Veh -  $\$p < 0,05$  ;  $\$\$p < 0,01$  ;  $\$\$\$p < 0,0001$  comparaison Plp-null traitées (AA) vs WT AA - # $p < 0,05$  ; ## $p < 0,01$  comparaison Plp-null Veh vs Plp-null AA

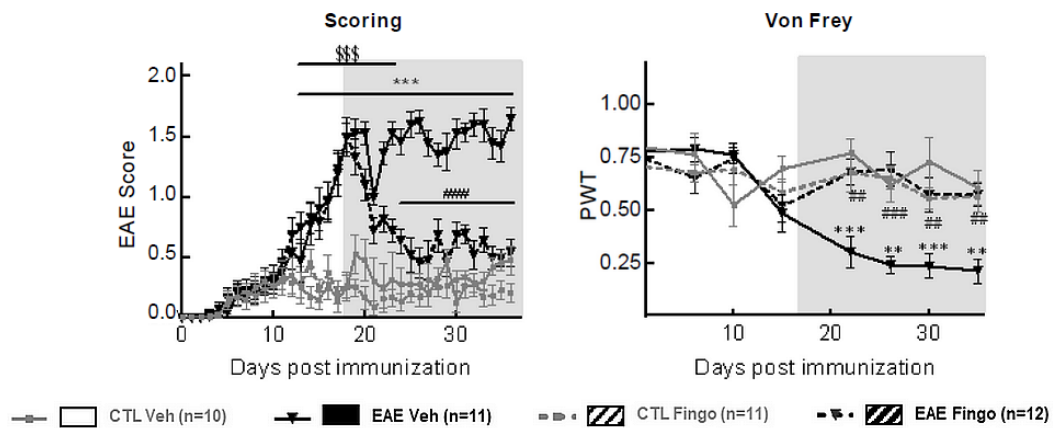
### 6.2.3. Evaluation de l'effet antalgique du fingolimod dans le modèle d'encéphalomyélite auto-immune expérimentale récurrente-rémittente

Le fingolimod est classiquement utilisé comme immunosuppresseur dans le traitement de la SEP pour son action d'antagoniste fonctionnel des récepteurs à la sphingosine 1-phosphate de type 1 (S1PR1) induisant lors de sa fixation une internalisation irréversible et une dégradation du récepteur prévenant ainsi la sortie des lymphocytes en dehors des organes lymphoïdes secondaires, inhibant ainsi l'attaque du SNC par les lymphocytes pathogéniques (Brinkmann et al., 2010) (figure 29). Néanmoins, il existe plusieurs sous-types de S1PR (1 à 5) localisés dans différents tissus et le fingolimod pourrait avoir d'autres propriétés au niveau de l'organisme que son action immunosuppressive. Il a notamment été démontré que le fingolimod aurait des propriétés antalgiques dans plusieurs modèles animaux de douleur chronique en se fixant sur des S1PR présents au niveau du cerveau et de la moelle (Salvemini et al., 2013 ; Sim-Selley et al., 2018). Nous avons alors voulu tester l'hypothèse selon laquelle le fingolimod pourrait, en plus de son effet immunosuppresseur, être bénéfique pour les patients atteints de SEP exprimant des douleurs chroniques et notamment neuropathiques.

**Early curative chronic treatment with fingolimod 0.5mg/kg in Plp-null model**



**Early curative chronic treatment with fingolimod 0.5mg/kg in EAE model**



**Late curative chronic treatment with fingolimod 0.5mg/kg in EAE model**

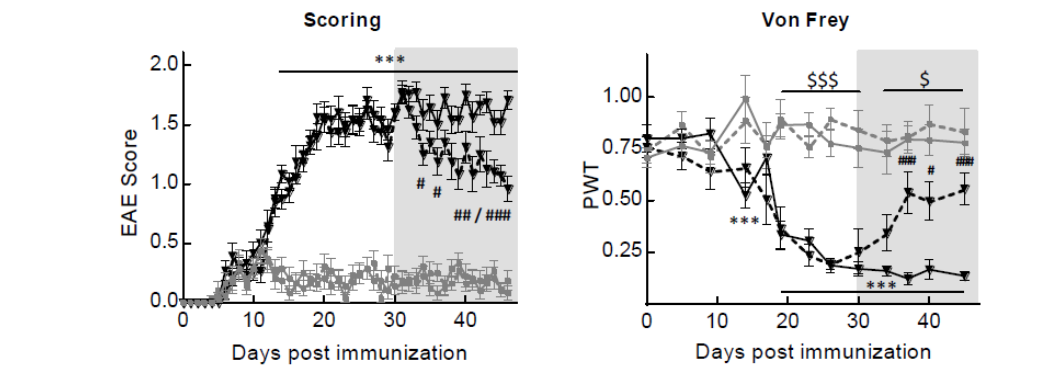


Figure 38 : Effets de traitements curatifs chroniques au fingolimod chez les souris sauvages (WT) et présentant une invalidation du gène *Plp1* (Plp null) ainsi que chez les souris présentant une encéphalomyélite auto-immune expérimentale récurrente-rémittente (EAE-RR) et leurs contrôles  
Données non publiées

Le traitement curatif précoce par le fingolimod dans l'eau de boisson à la dose de 0,5mg/kg ne permet pas de corriger l'allodynie mécanique ni l'hyperalgésie thermique chez les souris Plp null.

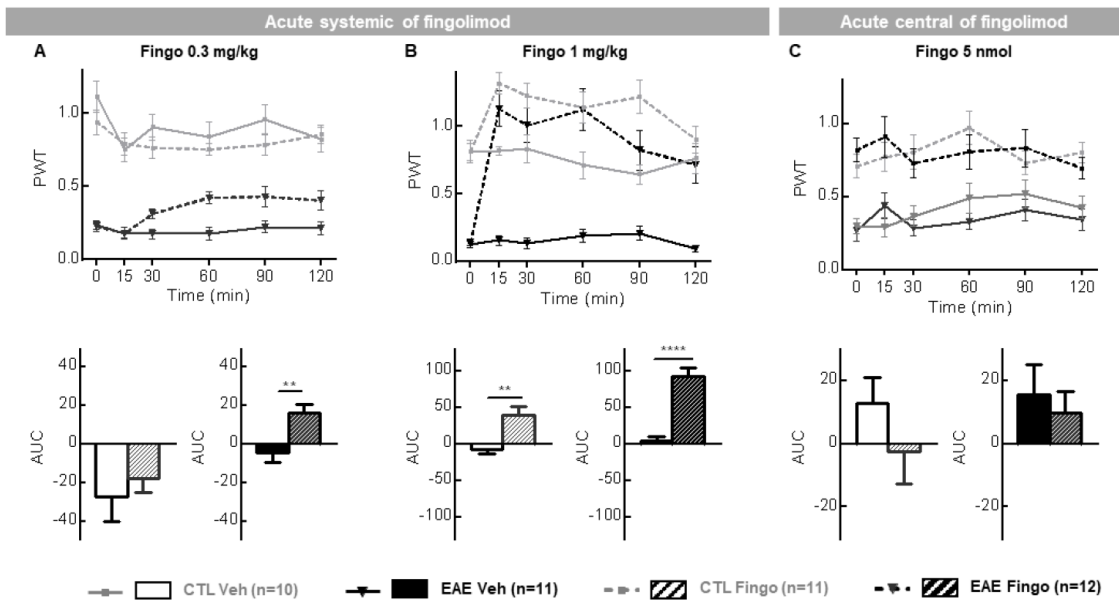
Le traitement curatif précoce par le fingolimod dans l'eau de boisson à la dose de 0,5mg/kg permet de corriger le score EAE et l'allodynie mécanique chez les souris EAE-RR.

Le traitement curatif tardif par le fingolimod dans l'eau de boisson à la dose de 0,5mg/kg permet de diminuer le score EAE et l'allodynie mécanique chez les souris EAE-RR.

Analyse statistique par ANOVA 2 voies suivie d'un test *post hoc* de Tuckey - \*p<0,05 ; \*\*p<0,01 ; \*\*\* p<0,001 comparaison des souris modèles vs contrôle non traitées - \$ p<0,05 ; \$\$ p<0,01 ; \$\$\$ p<0,001 ; comparaison des souris modèles vs contrôle traitées au fingolimod - # p<0,05 ; ## p<0,01 ; ### p<0,001 comparaison des souris modèles non traitées vs fingolimod.

Pour cela nous avons : 1) évalué l'effet d'un traitement chronique précoce au fingolimod sur les troubles sensitifs présents chez les souris Plp null, 2) évalué l'effet d'un traitement chronique précoce puis tardif au fingolimod sur les troubles sensitifs présents chez les souris EAE-RR, 3) évalué l'effet de traitements aigus au fingolimod administrés selon différents modes d'administration sur les troubles sensitifs présents chez souris EAE-RR.

Lors des traitements chroniques, le fingolimod a été administré (selon le protocole décrit dans d'autres articles) dans l'eau de boisson à la dose de 0,5mg/kg/j chez des souris Plp null et contrôles âgés de 3 à 7 mois et chez des souris EAE-RR et contrôles du 17<sup>ème</sup> au 30<sup>ème</sup> jour post-induction (traitement curatif précoce) puis du 37<sup>ème</sup> au 47<sup>ème</sup> jour post-induction (traitement curatif tardif). Ces traitements chroniques ont permis de montrer une absence d'effet du fingolimod dans les troubles sensitifs des souris Plp null, mais une très bonne efficacité chez les souris EAE-RR que cela soit pour le traitement curatif précoce ou tardif (Figure 38). Enfin, l'administration aiguë de fingolimod aux doses de 0,3 et 1mg/kg en i.p. réduit significativement l'allodynie mécanique observée chez les souris EAE-RR avec un effet sédatif également observé pour la dose de 1mg/kg ; tandis que l'administration intrathécale du fingolimod à la dose de 5 nanomoles n'a pas montré d'effet sur l'allodynie mécanique ni d'effet sédatif (Figure 39).



**Figure 39 : Effets de l'administration aiguë de fingolimod sur la sensibilité mécanique des souris présentant une encéphalomyélite auto-immune expérimentale récurrente-rémittente (EAE-RR) et leurs contrôles**  
*Données non publiées*

L'administration intrapéritonéale de fingolimod à la dose de 0,3 mg/kg augmente le seuil de retrait de la patte (diminution de la sensibilité mécanique) lors du test de von Frey chez les souris EAE-RR uniquement, tandis qu'à la dose de 1 mg/kg ce seuil est augmenté chez les souris EAE-RR et contrôle, effet associé à une diminution de la distance parcourue dans un open-field pendant 45 minutes (sédation, données non montrées). L'administration intrathécale de fingolimod à la dose de 5 nanomoles n'a pas montré d'effet sur la sensibilité mécanique ni sur la sédation. Les résultats sont exprimés sous la forme de courbes représentant le décours temporel du seuil de retrait de la patte (PWT) ou d'histogramme des aires sous la courbe (AUC). L'analyse statistique n'a été réalisée que pour les AUC en utilisant une ANOVA une voie suivie du test *post hoc* de Tukey \* $p < 0,05$  ; \*\* $p < 0,01$  ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

Chez les souris EAE-RR lors des traitements chroniques, l'effet du fingolimod sur les symptômes sensitifs étant concomitant à l'effet sur le score EAE, il est difficile de déterminer si l'effet sur les symptômes sensitifs est un effet propre ou une conséquence de l'effet immunosuppresseur. Par contre

l'effet des traitements aigus sur les symptômes sensitifs suggèrent un effet antalgique propre étant donné que sur un décours temporel de 120 minutes l'effet immunosuppresseur n'a pas le temps de se mettre en place. Le fait que l'effet antalgique du fingolimod ne soit pas retrouvé après une administration intrathécale semble suggérer un effet périphérique de la molécule sur ces comportements sensitifs. Il est néanmoins également possible que la dose de 5 nanomoles utilisée soit trop faible. Enfin, la présence d'un effet sédatif lors de l'administration i.p. suggère qu'en plus de ces effets immunosuppresseurs et antalgiques, le fingolimod pourrait (au moins à forte dose) des effets sur les phénomènes de veille et de sommeil. Enfin, l'absence d'effet du fingolimod sur les symptômes sensitifs des souris Plp null confirme que les mécanismes physiopathologiques entre les modèles Plp null et EAE-RR sont différents et n'impliquent pas pour les premiers la signalisation S1P. Une limitation importante de ce travail est qu'il se limite à une analyse comportementale et que s'il permet de faire des hypothèses sur l'effet du fingolimod sur les troubles sensitifs, il ne permet pas de tirer de conclusions mécanistiques.

Au moment de l'initiation de notre projet, aucune étude n'avait évalué l'effet du fingolimod sur la douleur neuropathique dans des modèles de SEP. Cependant, Doolen et al., furent les premiers à démontrer que le fingolimod peut corriger l'hyperalgésie (thermique au froid et mécanique) et la transmission nociceptive spinale (expression de pERK et mobilisation de  $Ca^{2+}$  dans les neurones spinaux) dans un autre modèle d'EAE (Doolen et al., 2018).

A la fin de cette étude s'est posée la question de continuer notre projet avec le modèle d'EAE-RR développé par Khan et al., en 2014. En effet, au cours des trois ans de thèse d'Amélie nous avons rencontré les difficultés suivantes. Tout d'abord, nous avons rencontré à plusieurs reprises des difficultés d'immunisation lors de l'induction du modèle, en l'absence du moindre changement dans le protocole. Ces difficultés d'immunisation sont documentées pour d'autres formes de modèles EAE induits chez la souris (Teuscher et al., 2004 ; Bittner et al., 2014) mais se sont avérées relativement fréquentes avec ce modèle EAE (entre 15 à 20% de nos séries d'expérience). De plus, lorsque nous avons réalisé des études neuropathologiques, les anomalies étaient peu fréquentes, dans des zones très limitées rendant l'étude de l'effet d'un traitement très subjective. En effet, en fonction de la zone anatomique analysée entre deux souris différentes (appartenant au même groupe) il était possible de décrire des phénotypes très différents. C'est la raison pour laquelle, nous avons depuis cette dernière étude modifié le modèle EAE étudié. Nous travaillons dorénavant sur le modèle décrit par Olechowski et al., 2009, qui développe également des troubles sensitifs robustes tels que l'allodynie au froid et l'allodynie mécanique. Afin que les troubles sensitifs puissent être évalués, les symptômes moteurs sont également modérés, du fait de l'administration d'une dose réduite de peptide MOG<sub>35-55</sub> en association avec du CFA et de la toxine pertussis. Ce modèle est décrit comme mimant une forme d'EAE chronique avec une poussée (EAE-CP, Figure 35).

#### **6.2.4. Evaluation de l'effet de la lériglitazone chez les souris présentant une invalidation du gène codant les protéolipoprotéines**

La lériglitazone (initialement nommé Min-102) est un nouvel agoniste sélectif du récepteur gamma activé par les proliférateurs de peroxydases (PPAR $\gamma$ ) développé par la société Minoryx Therapeutics qui, contrairement aux autres membres de cette classe thérapeutique, présente une très bonne biodisponibilité dans le cerveau après administration par voie orale. Le PPAR $\gamma$  est un récepteur nucléaire jouant un rôle clé dans la biogénèse et le fonctionnement mitochondrial, le métabolisme

énergétique, les fonctions antioxydantes et le stockage des acides gras et un traitement chronique à la lériglitazone stimule ces fonctions cellulaires dans un modèle murin d'ataxie de Friedreich (Rodríguez-Pascau et al., 2021a) ainsi que dans un modèle murin d'X-ALD (Rodríguez-Pascau et al., 2021b) (Figure 40) avec pour conséquences d'améliorer les symptômes moteurs dans ces deux modèles. Ces travaux précliniques ont conduit à l'évaluation clinique de la lériglitazone. L'essai clinique de phase II dans l'ataxie de Friedreich s'il a montré la bonne tolérance de ce traitement après 48 semaines de traitement n'a pas permis de montrer en IRM d'amélioration morphométrique ou microstructurale au niveau de la moelle épinière des patients (critère de jugement principal) malgré la validation de plusieurs critères de jugement secondaires (Pandolfo et al., 2022). De façon assez similaire, l'essai clinique de phase II-III dans l'adrénomyélonéuropathie (forme modérée de X-ALD), qui vient juste d'être publié, n'a pas permis de montrer d'amélioration au test de marche des 6 minutes (critère de jugement principal) malgré une nouvelle fois l'amélioration de plusieurs critères de jugement secondaire et la confirmation d'une bonne tolérance de la molécule après 96 semaines de traitement. Une prise de poids et un œdème périphérique étant tout de même observés respectivement chez 70 et 64% des patients traités (Köhler et al., 2023).

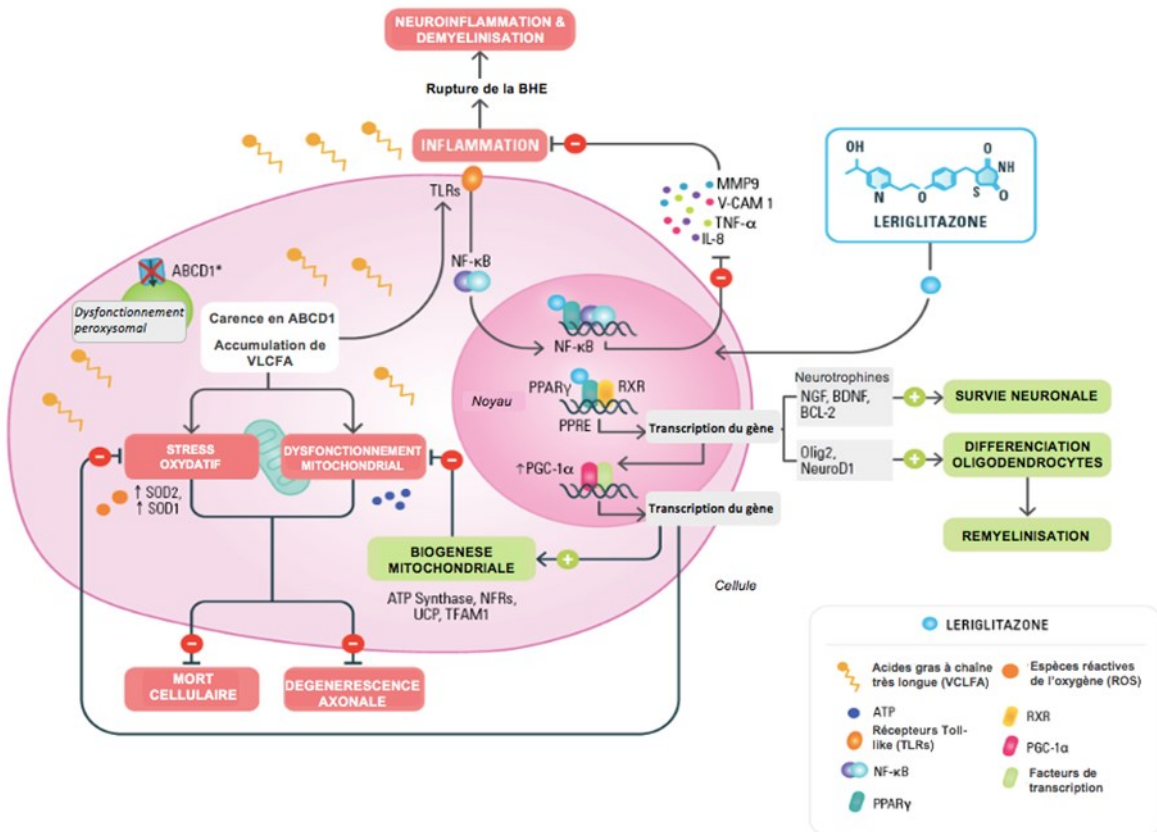


Figure 40 : Mécanismes d'action de la lériglitazone dans un modèle d'adrénoleucodystrophie liée à l'X (X-ALD)

*Adapté du site web de la société Minoryx Therapeutics, 2023*

La lériglitazone permet de diminuer le stress oxydatif, la neuroinflammation et présente des effets neuroprotecteurs dans les modèles animaux d'X-ALD via son action sur diverses voies biologiques (biogenèse mitochondriale, survie neuronale, différenciation oligodendrocytaire).

Depuis 2016, un travail collaboratif avec la société Minoryx Therapeutics a été mis en place afin d'évaluer l'effet de la lériglitzone sur les souris Plp null. Cette molécule a été administrée dans les croquettes des animaux selon un protocole similaire aux précédentes études précliniques, chez des souris âgées de 3 à 7 mois. Ces travaux n'étant pas encore publiés, les résultats ne peuvent être détaillés dans ce manuscrit. Il est néanmoins possible de préciser que les effets comportementaux de la lériglitzone dans le modèle Plp null s'avèrent modérés et qu'un pourcentage significatif de souris traitées a développé au niveau de l'œil (et plus probablement la rétine) une opacification blanche (visible lors de la manipulation des animaux) qui n'est pas s'en rappeler un des nombreux effets indésirables ayant nécessité en 2010 le retrait du marché de la rosiglitazone (molécule de la même classe thérapeutique) à savoir le risque d'œdèmes maculaires (Tatti et al., 2008).

#### **6.2.5. Evaluation de l'effet de l'extrait de pépin de raisin dans un modèle d'encéphalomyélite auto-immune expérimentale**

La coopération entre l'UMR 1107- NEURO-DOL et le laboratoire des substances bioactives du centre de biotechnologie de Borj Cédria, a débuté en décembre 2017 lorsque Maha MABROUK et le Dr Meherzia MOKNI nous ont contacté pour nous proposer d'évaluer l'effet organoprotecteur de l'extrait de pépins de raisins (GSE pour Grape Seed Extract) dans nos modèles murins de SEP. Après un premier séjour de Maha au laboratoire, de mai à août 2018, les résultats sur l'effet du GSE étaient tellement encourageants qu'une thèse en cotutelle a été mise en place avec en co-encadrement le Dr Laurence TERRAIL pour la partie française et le Pr Meherzia MOKNI et le Dr Mohammed EL AYED pour la partie tunisienne. Le GSE est un produit d'origine naturelle riche en différents extraits polyphénoliques tels que des flavonoïdes, des stilbènes ou encore des proanthocyanidines, et ayant montré des effets bénéfiques dans différentes conditions physiopathologiques comme l'obésité ou l'ischémie cérébrale dans des modèles animaux mais également chez l'humain (Ma and Zhang, 2017 ; Sochorova et al., 2020). Ces effets bénéfiques ont été attribués aux propriétés de piègeurs des radicaux libres, de chélateurs de métaux, d'activateurs de voies de survie cellulaire, de régulateurs de la fonction mitochondriale ou encore de modulateurs de l'inflammation des polyphénols (Gupta et al., 2020). Néanmoins, tout comme le terme ROS ne se réfère pas à une molécule, mais à un ensemble de molécules dérivées de l'oxygène, le terme polyphénol se réfère à un ensemble de molécules polyphénoliques et est très souvent utilisé dans la littérature de façon générique permettant de décrire des effets pléiotropiques de ces molécules alors que chaque polyphénol pris individuellement possède en réalité des fonctions beaucoup plus réduites. De manière assez similaire le terme GSE renvoie à des préparations très différentes en termes de techniques d'extraction, d'espèces et de variétés de raisin ou encore de régions d'exploitation des vignes (Antonić et al., 2020 ; Yammime et al., 2020). Pourtant il est évident que chacun de ces paramètres a une influence importante sur la composition en polyphénols (et autre molécules) du GSE et que les données de GSE différents ne sont pas forcément extrapolables entre-elles. Dans notre cas, les pépins de raisin sont obtenus à partir des déchets de la vinification (marc ou ensemble des résidus secs résultant du pressurage ou du foulage des raisins ainsi que de la cuvaïson) de grappes de raisin de l'espèce *Vitis Vinifera*, variété Carignon produits par la coopérative vinicole Ceptunes (Grombalia, Gouvernorat de Nabeul). Ces pépins sont d'abord isolés puis séchés au soleil et enfin moulus. La poudre de pépin de raisin obtenue est stockée à température ambiante à l'abri de la lumière et est utilisée pour extraire extemporanément le GSE dans une solution d'éthanol à 10%. L'intérêt de travailler avec cet extrait est qu'il contient un mélange de molécules actives dont les effets individuels peuvent agir en coopération voir en synergie. La présence de chaque

molécule en relativement faible concentration peut de plus limiter le développement d'effets indésirables (Jones et al., 2012). La composition du GSE utilisé au cours de ce travail a été récemment décrit par Kadri et al., en 2019. Il est composé de 3 fractions : une phase phénolique, une phase lipidique et une phase aqueuse. Les principaux composés retrouvés dans la phase phénolique sont l'épicatéchine et la catéchine, l'acide gallique, les dérivés de quercétine et la quercétine (Figure 41).

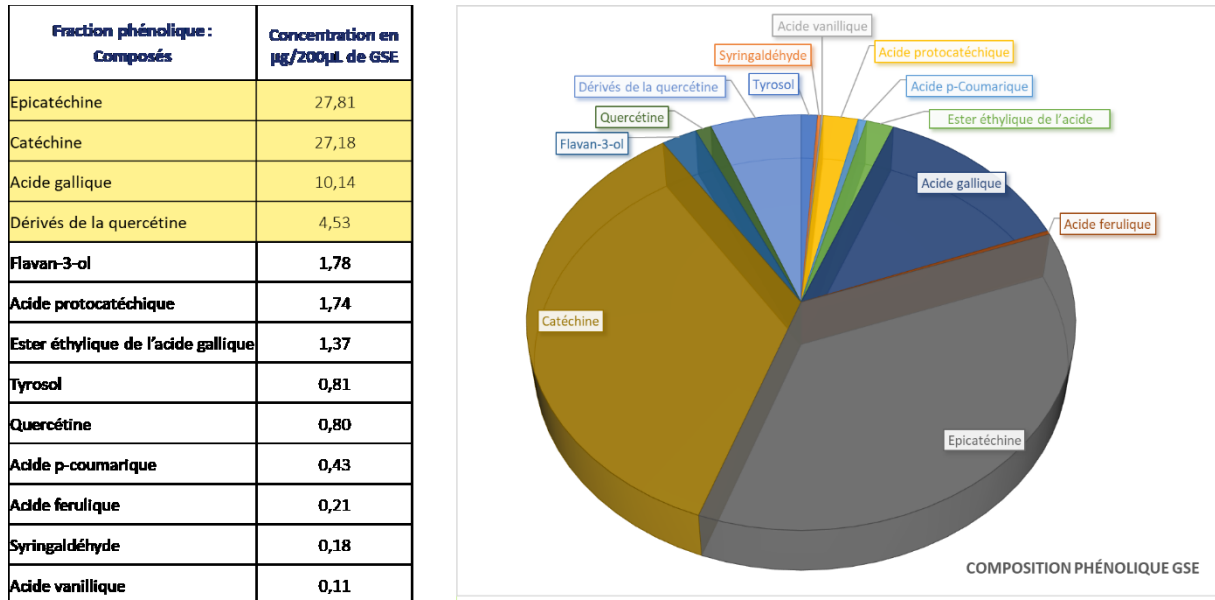


Figure 41 : Composition de la phase phénolique de l'extrait de pépin de raisin donné pour 200µL (dose quotidienne injectée à une souris)  
Adapté de Kadri et al 2019

L'effet d'un traitement curatif au GSE a été évalué dans le modèle d'EAE-CP à partir du 10<sup>ème</sup> jour post-induction jusqu'au 20 ou 30<sup>ème</sup> jour post-induction. Ce traitement quotidien par voie i.p. a corrigé le score EAE et les troubles sensitifs présents chez les souris EAE (Figure 42).

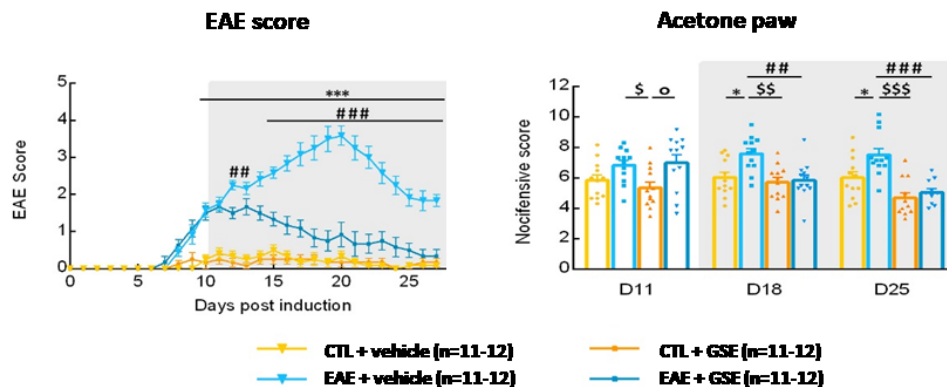


Figure 42 : Effets de l'extrait de pépin de raisin sur le score EAE et la sensibilité thermique au froid des souris présentant une encéphalomyélite auto-immune expérimentale chronique à une poussée (EAE-CP) et leurs contrôles (CTL)

Adapté de Mabrouk et al., 2022

Le score EAE a été déterminé selon l'échelle décrite par Olechowski et al., 2009. La sensibilité thermique au froid a été évaluée en déposant une goutte d'acétone sous les pattes arrière des souris et en évaluant leur réponse comportementale (nocifensive score). Analyse statistique par une ANOVA 2 voies suivie d'un test *post hoc* de Sidak. \* $p < 0,05$  ; \*\*\* $p < 0,001$  comparaison EAE + véhicule vs CTL + véhicule - ### $p < 0,01$  ; #### $p < 0,001$  comparaison EAE + GSE vs EAE + véhicule - \$\$ $p < 0,01$  ; \$\$\$ $p < 0,001$  comparaison EAE + véhicule vs CTL + GSE - ° $p < 0,05$  comparaison EAE + GSE vs CTL + GSE.

Les analyses biochimiques suggèrent que cet effet est médié par une correction de l'oxydation des protéines dans le cerveau et la moelle épinière des souris, provoquées par une restauration de l'activité des enzymes antioxydantes SOD, catalase et GPx qui sont diminuées chez les souris EAE non traitées (Figure 43).

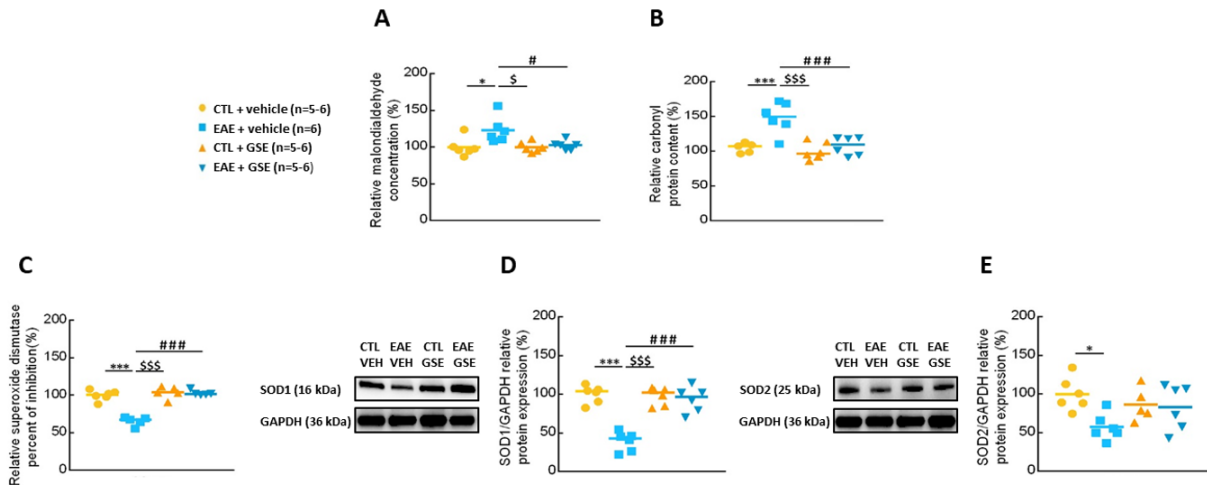


Figure 43 : Effets de l'extrait de pépin de raisin sur les marqueurs du stress oxydant et l'activité de la superoxyde dismutase dans la moelle épinière des souris présentant une encéphalomyélite auto-immune expérimentale chronique à une poussée (EAE-CP) et leurs contrôles (CTL) après 10j de traitement  
Adapté de Mabrouk et al., 2022

Les augmentations de la peroxydation lipidique (A) et de l'oxydation des protéines (B) chez les souris EAE-CP sont corrigées après 10j de traitement pas le GSE.

Les diminutions de l'activité enzymatique SOD (C) et de l'expression de SOD1 (D) et SOD2 (E) chez les souris EAE-CP sont corrigées après 10j de traitement pas le GSE.

Analyse statistique par une ANOVA 2 voies suivie d'un test *post hoc* de Sidak. \* $p < 0,05$  ; \*\*\* $p < 0,001$  comparaison EAE + véhicule vs CTL + véhicule - # $p < 0,05$  ; ### $p < 0,001$  comparaison EAE + GSE vs EAE + véhicule - \$ $p < 0,05$  ; \$\$\$ $p < 0,001$  comparaison EAE + véhicule vs CTL + GSE - ° $p < 0,05$  comparaison EAE + GSE vs CTL + GSE.

Ces modifications biochimiques semblent donner au GSE un effet protecteur sur : la myéline (illustrée par une correction de l'expression des protéines de myéline diminuée chez les souris EAE), l'activation gliale (illustrée par une correction de l'augmentation de l'expression des protéines astrocytaires et microgliales). Enfin, au cours de ce traitement aucun effet indésirable n'a été observé chez les souris contrôles traitées que cela soit au niveau du poids, de l'aspect général et de tous les tests comportementaux réalisés confirmant la bonne tolérance du GSE déjà décrite dans la littérature (Charradi et al., 2018).

Si ce travail est le premier à montrer un effet bénéfique du GSE dans un modèle murin d'EAE, il s'associe à un nombre croissant d'articles montrant l'effet bénéfique des polyphénols végétaux dans ces modèles. Des effets bénéfiques de : l'épigallocatechine gallate extrait du thé vert (Cai et al., 2021), l'extrait de peau de grenade (Lu et al., 2020) ou encore l'extrait de feuilles d'olivier (Giacometti and Grubić-Kezele, 2020) ont été montré dans des modèles EAE induits chez la souris ou le rat. Il est cependant ici important de noter que les essais cliniques évaluant l'effet de l'épigallocatechine gallate chez des patients atteints de SEP se sont révélés décevants. Une première étude sur 62 patients atteints de SEP-RR en co-administration avec l'acétate de glatiramère pendant 18 mois n'a pas montré d'effet sur le développement de nouvelles lésions en IRM (Bellmann-Strobl et al., 2021). Une seconde étude sur 30 patients atteints de SEP progressives vs placebo pendant 36 mois n'a pas montré d'effet sur le développement de l'atrophie (critère de jugement principal) ni sur l'amélioration de symptômes

neurologiques ou la charge lésionnelle en IRM (critères secondaires) (Rust et al., 2021). Ces premiers résultats cliniques montrent que la transposition de l'effet des polyphénols de la préclinique vers la clinique n'est pas une affaire simple, point qui sera détaillé dans la partie projets de recherche de ce manuscrit.

Ce travail a donné lieu à une publication dans *Frontiers in Immunology*.

*Mabrouk M, El Ayed M, Démosthènes A, Aissouni Y, Aouani E, Daulhac-Terrail L, Mokni M, Bégou M. Antioxidant effect of grape seed extract corrects experimental autoimmune encephalomyelitis behavioral dysfunctions, demyelination, and glial activation. Front Immunol. 2022 Aug 17;13:960355. doi: 10.3389/fimmu.2022.960355.*



---

## **7. Projets de recherche**



## **7.1. Développement de l'extrait de pépin de raisin en tant que stratégie thérapeutique pour les patients atteints de sclérose en plaques**

### **7.1.1. Poursuite de la caractérisation de l'effet de l'extrait de pépin de raisin**

Si les résultats obtenus lors de notre première étude sur le GSE sont très encourageants, de nombreux points doivent être encore être travaillés avant de pouvoir envisager son utilisation en tant que stratégie thérapeutique pour les patients atteints de SEP.

#### **7.1.1.1. Sur le stress oxydant**

Une limitation importante de notre première étude est qu'elle n'évalue pas la production des espèces réactives ni la signalisation redox aberrante conduisant à l'oxydation des macromolécules. De plus, lors de notre étude 10j après la mise en place du traitement, nous ne pensions pas trouver une amélioration aussi importante du stress oxydant chez les souris EAE traitées au GSE (Figure 43). En effet, les niveaux de correction sont quasiment identiques à ceux observés après 20j de traitement (données non présentées) et ne permettent pas de déterminer si certains mécanismes de réparation se mettent en place en premier. Ainsi il serait intéressant : 1) d'étudier la production des espèces réactives et la signalisation redox aberrante avant la mise en place du traitement, 2) d'évaluer l'effet du traitement au GSE sur les paramètres déjà étudiés seulement 5j après l'initiation du traitement afin d'avoir une meilleure idée de la cinétique d'effet du GSE sur les atteintes pro-oxydantes induites par l'EAE.

Une autre limite importante de ce travail est d'avoir étudié les atteintes neuropathologiques de l'EAE et leurs corrections par le traitement au GSE en utilisant seulement des quantifications par western blot sur des extractions protéiques globales (moelle épinière ou encéphale). Si cela nous a permis d'avoir une idée générale des effets du GSE sur le stress oxydant, la démyélinisation et l'activation astrocytaire et microgiale, il est primordial de mieux caractériser ces effets dans des zones particulières du cerveau ou pour des types cellulaires donnés. Cette étude histologique est d'autant plus importante que notre travail a mis en évidence de nombreuses altérations dans le cerveau des souris EAE-CP corrigées par le GSE dans un modèle décrit comme développant principalement des atteintes spinales. Mieux caractériser les effets du GSE au niveau de l'encéphale est particulièrement intéressant dans la perspective du traitement des patients atteints de SEP.

#### **7.1.1.2. Sur la réponse immune et inflammatoire**

Ce premier travail s'est intéressé à caractériser l'effet du GSE sur le stress oxydant, mais comme cela a été montré dans la description de la physiopathologie de la SEP, ce stress oxydant est toujours secondaire à la réponse immune. Les effets comportementaux très importants et rapides provoqués par le traitement suggèrent un possible effet du GSE sur la réponse immune et inflammatoire. Afin d'étudier la réponse immune, une collaboration vient tout juste d'être initiée avec l'équipe maladies inflammatoires du système nerveux central : mécanismes et thérapies du Pr Abdelhadi SAOUDI au sein de l'institut toulousain des maladies infectieuses et inflammatoires (INFINITY). Les premières expériences qui viennent d'être débutées ont pour objectif de déterminer si le GSE est capable de modifier la réponse immune et si c'est le cas, de déterminer si cette action a lieu au niveau de : l'activation périphérique, de la transmigration de la BHE et/ou de la réactivation centrale des cellules immunitaires. Pour cela des souris EAE vont être traitées au GSE, les cellules immunitaires seront isolées de la rate, des ganglions lymphatiques, du cerveau et de la moelle épinière. Une partie de ces cellules seront directement analysées en cytométrie en flux afin de comptabiliser le nombre de cellules et de définir leurs profils immunitaires (L<sub>T</sub> CD4+, L<sub>T</sub> CD8+, Tregs, ...). Une autre partie sera mise en

culture et stimulée avec du peptide MOG<sub>35-55</sub> afin de tester les capacités d'activation de ces cellules en présence ou absence de GSE. Pour cela, les cellules immunitaires seront de nouveau analysées en cytométrie de flux et les surnageants de culture seront étudiés à l'aide du kit LEGENDplex inflammation permettant de quantifier simultanément des analytes solubles dans des très petits volumes de liquide biologique. En effet, cette technique d'immunodosage sur billes utilise la cytométrie en flux pour la quantification des analytes. Les analytes étudiés seront principalement des IL, le TNF $\alpha$ , l'IFN $\gamma$  et le GM-CSF.

#### *7.1.1.3. Valorisation des données obtenues lors de l'étude protéomique*

Au cours de sa thèse, Maha a réalisé une analyse protéomique de l'effet du GSE (après 20j de traitement) sur la plateforme protéomique PISSARO IRIB – ROUEN sous l'encadrement du Dr Pascal COSETTE. Cette étude a été réalisée par chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem sur 6 échantillons de moelle et de cerveau de souris EAE-CP et contrôles traitées au GSE ou à son véhicule (24 échantillons au total). L'analyse des résultats a été réalisée par une quantification sans étiquette (label free) suivi d'analyses bio-informatiques permettant l'identification et la quantification de l'expression des protéines (logiciel Proteome Discoverer en utilisant la base de données Swiss-Prot et le moteur de recherche Mascot) et l'analyse d'enrichissement selon les termes d'ontologie de gènes (GO, projet bio-informatique destiné à structurer la description des gènes et des produits géniques dans le cadre d'une ontologie commune à toutes les espèces, logiciel ingenuity pathways analysis). Cette étude a montré que sur les 1400 à 1800 protéines identifiées dans chaque prélèvement, 105 sont dérégulées dans le cerveau et 41 dans la moelle épinière lors d'une analyse globale sur les 4 groupes. La comparaison deux à deux des groupes montre que : 89 protéines sont dérégulées dans le cerveau et 12 dans la moelle épinière lorsque sont comparées souris contrôles et EAE-CP traitées au véhicule (effet du modèle) ; et 29 sont dérégulées dans le cerveau et 54 dans la moelle épinière lorsque sont comparées souris EAE-CP traités au véhicule vs traités au GSE (effet du traitement).

Le faible nombre de protéines dérégulées dans nos conditions expérimentales (105 dans le cerveau et 41 dans la moelle épinière lors d'une analyse globale sur les 4 groupes) peut paraître surprenant. Il s'explique probablement par le fait que nous avons travaillé sur des protéines issues de tissus très inhomogènes (ensemble des cellules de l'encéphale et de la moelle épinière). Afin de raffiner les résultats obtenus, il serait intéressant de réaliser une étude protéomique sur des types cellulaires particuliers (cellules immunitaires infiltrées, astrocytes, cellules microgliales, oligodendrocytes, neurones) issus de régions anatomiques plus précises (par exemple pour la moelle : corne dorsale, corne ventrale, cordon antérieur, ...).

Dans ce rapport, seule une partie de résultats obtenus sur les protéines extraites du cerveau seront présentées pour illustration. L'analyse quantitative a permis d'identifier les protéines les plus surexprimées ou sous exprimées dans le modèle EAE-CP et après le traitement au GSE chez les souris EAE-CP (Figure 44). Parmi les protéines hautement dérégulées est à noter la présence de protéine de l'adhésion cellulaire (desmoplakine) et du réarrangement du cytosquelette (coronine 1A), du stress oxydant et de la fonction mitochondriale (hème oxygénase 2, succinate semi-aldéhyde déshydrogénase, protéine de liaison au composant 1 du complément, sous-unité epsilon de l'ATP synthase), du métabolisme lipidique (monoacylglycérol lipase), de l'homéostasie calcique (protéine régulatrice de la calmoduline PCP4 également appelée PEP-19) ou encore de la fonction synaptique (synapsine 2).

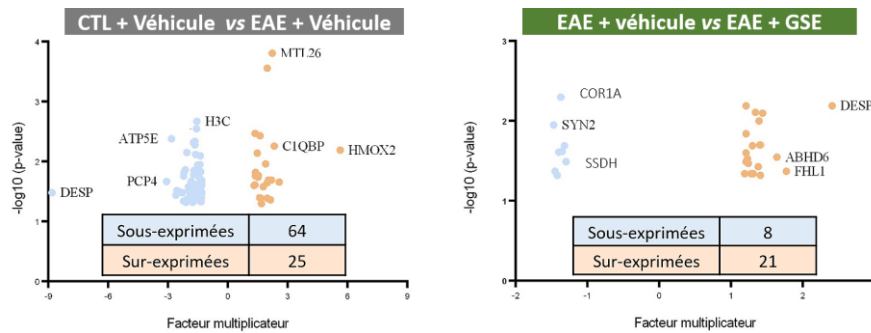


Figure 44 : Analyse quantitative de l'étude protéomique évaluant les effets de l'extrait de pépin de raisin dans le cerveau des souris présentant une encéphalomyélite auto-immune expérimentale chronique à une poussée (EAE-CP) et leurs contrôles (CTL)

Données non publiées

PCP4 : Protéine régulatrice de la calmoduline PCP4

ATP5E : Sous-unité epsilon de l'ATP synthase

C1QBP : Protéine de liaison au composant 1 du complément

MLT26 : Protéine similaire à la méthyltransférase 26

SSDH : Succinate semi-aldéhyde déshydrogénase

FHL1 : Protéines 1 à quatre domaines LIM et demi

DESP : Desmoplakine

HMOX2 : Hème oxygénase 2

SYN2 : Synapsine 2

COR1A : Coronine 1A

ABHD6 : Monoacylglycérol lipase

Les analyses d'enrichissement ont été réalisées pour les ontologies : processus biologiques, fonctions moléculaires, composants cellulaires et voies métaboliques et/ou signalisation et les résultats obtenus pour sont présentés dans la figure ci-dessous (Figure 45). L'objet n'est pas de faire ici une analyse exhaustive de ces résultats, mais de mettre en évidence des dérégulations importantes constituant autant de nouvelles pistes d'étude de l'effet du GSE chez les souris EAE-CP. Ainsi, il est possible de noter que les données concernant l'effet du GSE sur les souris EAE-CP montrent un enrichissement des ontologies apoptose, axogénèse, métabolisme et synthèse d'ATP et bêta-oxydation des acides gras au cours de l'analyse par processus biologiques. Tandis que l'analyse par composants cellulaires met en évidence un enrichissement pour le cytosol, le noyau, la membrane plasmique, les mitochondries, les axones et la gaine de myéline. Si certains de ces enrichissements confirment les effets du GSE déjà étudiés dans le modèle EAE-CP, d'autres suggèrent des effets pour le moment non évalués ; c'est le cas notamment : de l'énergétique cellulaire et de la fonction mitochondriale ou encore de l'axogénèse et de la potentielle neuroprotection.

Bien que les données obtenues au cours de cette étude de transcriptomique restent encore à analyser plus en détail, parmi les différentes pistes d'étude suggérées, la première que nous prévoyons d'investiguer est le métabolisme lipidique. En effet, de nombreuses données supportent un rôle de celui-ci (incluant des modifications du cholestérol, des oxystérols, des sphingolipides et des acides gras) dans la physiopathologie de la SEP. Le métabolisme lipidique est à la fois impliqué dans la régulation de la signalisation des cellules immunes, la remyélinisation et la neurodégénérescence (Cantuti-Castelvetri et al., 2018 ; Hubler et al., 2018 ; Grassi et al., 2020 ; Pineda-Torra et al., 2021). La dérégulation de ce métabolisme peut ainsi favoriser ou empêcher chacun de ces processus. S'il existe un effet bénéfique du GSE sur les anomalies du métabolisme lipidique dans l'EAE il est donc important de le caractériser ce que nous prévoyons de faire en collaboration avec l'équipe du Pr Ezzedine Aouani en Tunisie et le Pr Pascal Cosette sur la plateforme PISSARO d'analyse protéomique à Rouen qui développe actuellement des nouvelles méthodes d'analyse lipidomiques. A plus long terme (et en relation avec le projet financé par le Pack Ambition International de la région Auvergne Rhône-Alpes qui sera présenté dans le chapitre suivant), un projet est également envisagé en collaboration avec l'équipe du Dr Nicolas Cénac et la plateforme MetToul-Lipidomique pour l'analyse des acides gras à longue chaîne et des lipopeptides produits par le microbiote colique.

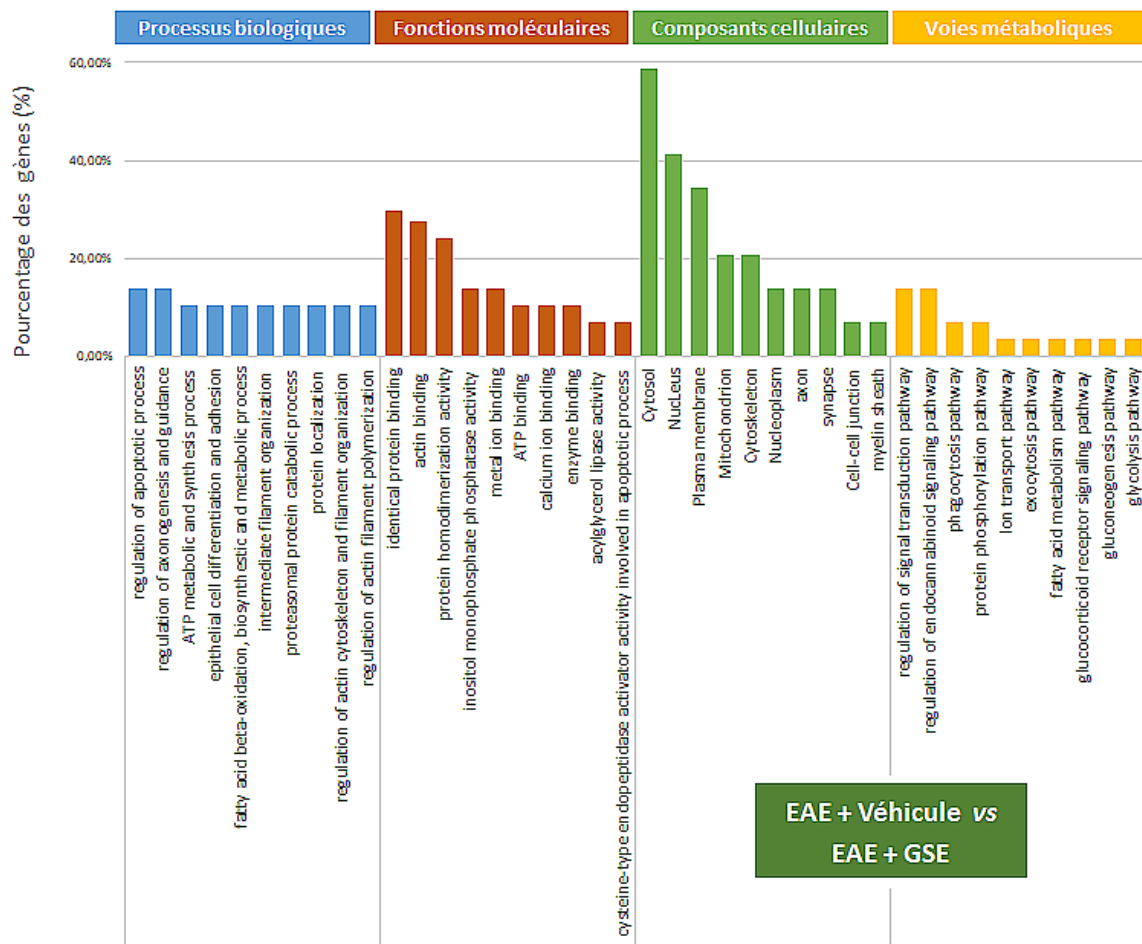
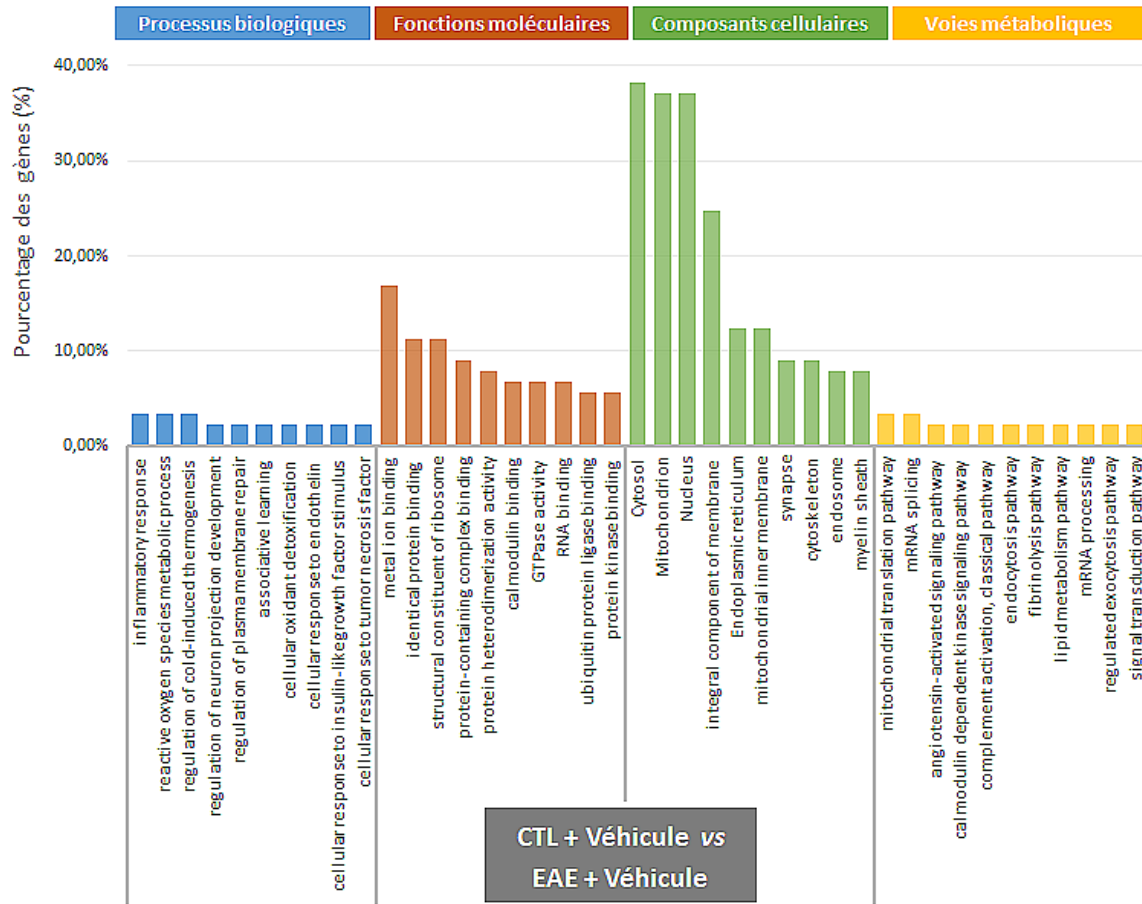


Figure 45 : Résultats des analyses d'enrichissement selon les termes d'ontologie de gènes (processus biologiques, fonctions moléculaires, composants cellulaires et voies métaboliques et/ou signalisation)  
*Données non publiées*

Ces résultats ont été obtenus lors de l'étude protéomique évaluant les effets de l'extrait de pépin de raisin (GSE) dans le cerveau des souris présentant une encéphalomyélite auto-immune expérimentale chronique à une poussée (EAE-CP) et leurs contrôles (CTL). Ils sont donnés pour une comparaison des protéines dérégulées entre les souris CTL et EAE-CP non traitées et pour une comparaison des protéines dérégulées entre les souris EAE-CP non traitées (véhicule) et traitées (GSE).

## **7.1.2. Développement de nouvelles formulations**

### *7.1.2.1. Limitations de la formulation actuelle pour une utilisation clinique*

Le GSE dans sa formulation actuelle présentent plusieurs limitations à une possible utilisation clinique. Tout d'abord, son mode de préparation et d'administration ; il doit être préparé extemporanément et être injecté ce qui n'est pas compatible à une utilisation clinique. Des premiers essais chez l'homme mis en place par l'équipe du Pr Ezzedine AOUNI ont ainsi été réalisés non pas avec le GSE mais avec la poudre de pépin de raisin administrée par voie orale (Turki et al., 2016 ; Bejaoui et al., 2022). Bien que ces essais cliniques aient été menés à bien sur une durée relativement longue de 6 mois et aient montré des effets encourageants (qui sont néanmoins à pondérer du fait du nombre faible de patients inclus et de l'absence d'administration en aveugle que cela soit pour le patient et le praticien), les doses administrées de 1g/kg de poudre par jour, ne peuvent raisonnablement pas être envisagées pour une utilisation clinique sur le long terme. Le recours à ces fortes doses s'explique par la faible solubilité des polyphénols, leur faible perméabilité aux membranes biologiques et notamment intestinales et leur rapide dégradation notamment par les enzymes hépatiques (Anand et al., 2022). Il a par exemple été montré chez l'humain, qu'après l'administration orale de quercétine ou d'épicatéchine à des doses de 250 à 500 mg seule une très faible quantité de ces molécules (<1%) était retrouvée dans le sang des patients avec des concentrations plasmatiques observées de l'ordre de 20 nM. Ces faibles concentrations s'expliquent par un fort métabolisme de ces molécules par les enzymes hépatiques de phase II les transformant en métabolites conjugués retrouvés dans le sang à des concentrations supérieures à 1 µM (Manach et al., 2005).

Une deuxième limitation du GSE vient du fait que, comme cela a été dit précédemment, ce terme GSE renvoie à des préparations très différentes en termes de techniques d'extraction, d'espèces et de variétés de raisin et de régions d'exploitation des vignes (Antonić et al., 2020 ; Yammime et al., 2020). Le tableau 5 illustre les concentrations en composés bioactifs obtenues à partir de pépins, de peau ou de marc de raisin de variétés différentes en fonction des protocoles d'extraction utilisés ; et les résultats obtenus sont très variables en fonction des conditions. Parmi les différences les plus notables, certaines publications décrivent la présence de resvératrol dans la composition du GSE étudié, tandis que cette molécule n'a jamais été retrouvée dans le GSE préparé par l'équipe du Pr Ezzedine AOUNI. De plus, la composition en polyphénols peut également varier en fonction des conditions météorologiques et notamment du niveau d'ensoleillement (Gupta et al., 2020). Ainsi même pour les grappes de raisin de l'espèce *Vitis Vinifera*, variété Carignon produits par la coopérative vinicole Ceptunes (Grombalia, Gouvernorat de Nabeul), la composition en substances bioactives telle qu'elle est décrite dans Kadri et al., 2019 peut légèrement fluctuer d'une année sur l'autre. Il va sans dire, qu'en l'absence d'une composition définie et stable d'un lot sur l'autre, le GSE ne pourra obtenir d'autorisation de mise sur le marché en tant que médicament.

Tableau 5 : Concentrations en composés bioactifs obtenues à partir de pépins, de peau ou de marc de raisin de variétés différentes en fonction des techniques d'extraction utilisées  
Extrait de Yammime et al., 2020

Dans cet article ne sont présentées que les données concernant des composés obtenus par le procédé d'extraction en eau subcritique qui est une méthode d'extraction permettant de limiter l'utilisation de solvants.

n.d. : non déterminée

DM : matière sèche

MPa : mégapascal

DS : peau sèche

Grape by-product matrix	Operating/extraction conditions	Targeted bio-compounds
Red grape pomace (A-1575)	10 MPa, 110 °C, 100 % water, 1.4 g/L sodium metabisulfite	Total polyphenols: 6.23 g/100g DM Total anthocyanins: 5.93 mg/100g DM
Grape seeds (Tempranillo)	6-7 MPa, 150 °C,	Gallic acid: 232.1 mg/100 g (6.3) DM
Red grape pomace (Source n.d.**)	8 MPa, 120 °C, 1:1 (v/v) ethanol, 0.8 % (v/v) HCl	Total polyphenols: 1.26 g/100 g (7) DS Total flavanols: 3.5 mg/100 g (11.6) DS
Red grape pomace (Pinot noir)	10 MPa, 150 °C	Total polyphenols: 6.070 g/100 g DM
Grape skins (Sumbelt grapes)	100 % water	Total flavonoids: 1.425g /100g DM
Red grape pomace (Cortina)	6.8 MPa, 100 °C 50 % ethanol/water (v/v)	Anthocyanins: 450 mg/100 g (1) DM
White grape pomace (Zinfandel)	11.6 MPa, 140 °C; 100 % water	Total polyphenols: 3.08 g/100 g DS
Red grape pomace (Cabernet-Sauvignon)	10 MPa, 140 °C, 100 % water	Anthocyanins 130 mg/100 g DM Procyanidin 2077 mg/100 g DM
Red grape pomace (Cabernet-Sauvignon)	10 MPa, 140 °C, 70 % ethanol/water (v/v)	Total polyphenols: 16.2 g/100 g DM
Red grape pomace (Pinot noir)	10 MPa, 100 °C, 100 % water	Total antioxidants 1.06 mg/g Anthocyanins 1.050 g/100 g Condensed tannins 0.52 g/100g
Red grape pomace (Pinot noir)	10 MPa, 120 °C, 100 % water	Total polyphenols: 7.76 g/100 g

Enfin, l'objectif à long-terme étant de développer l'utilisation clinique du GSE, la mise en place d'essais cliniques rigoureux (nombre important de patients, randomisés en double aveugle) nécessitera un coût financier important qui ne pourra être supporté par une cellule de valorisation ou une société privée que si cet investissement peut ensuite être récupéré lors de la commercialisation du produit. Or pour le moment, en tant que dérivé de produits naturels, le GSE dans sa formulation actuelle n'est pas brevetable. Il est même d'ores et déjà commercialisé au Etats-Unis ou en Europe en tant que complément alimentaire statut pour lequel il a reçu un agrément de l'autorité européenne de sécurité des aliments (EFSA) ainsi qu'une certification GRACE (pour « generally recognized as safe ») de la FDA. Il est néanmoins très important de noter que les produits commercialisés en tant que complément alimentaire sont des gélules décrites comme contenant de très faibles quantités de GSE. Ainsi les gélules commercialisées par la société californiana gold nutrition contiennent 100mg de GSE VitaFlavan produit par la société française DRT (dérivés résiniques et terpéniques). Ce GSE est produit à partir de pépins de raisin blanc cultivés dans le sud-ouest de la France. La description du contenu polyphénolique de cet extrait révèle des molécules similaires à celles retrouvées dans le GSE de notre étude, mais à des concentrations extrêmement différentes (Caimari et al., 2017). D'autres gélules commercialisées par la société Dynveo contiennent 150 mg de GSE également produit à partir de pépins de raisin blanc cultivés dans trois régions françaises (Aquitaine, Champagne et Loiret). La composition de ce GSE n'a pas été retrouvée. Ainsi le GSE commercialisé en tant que complément alimentaire l'est pour des doses très largement inférieures à celle décrite dans les rares essais cliniques utilisant ce produit à savoir 1g/kg (Turki et al., 2016 ; Bejaoui et al., 2022).

Ainsi, pour l'ensemble de ces limitations, il est nécessaire de développer une nouvelle formulation du GSE permettant de : 1) concentrer les molécules bioactives et d'augmenter leurs biodisponibilités, 2) fournir une composition stable sur les différents lots de production, 3) déposer un brevet afin de favoriser la valorisation du produit. Cet objectif est l'objet du financement Pack Ambition International obtenu auprès de la région Auvergne Rhône-Alpes et fait l'objet d'une demande d'ANR PRCI (appel à projet générique l'agence nationale pour la recherche, demande de projet de recherche collaboratif – International) en cours de rédaction. Ce projet est décrit dans le chapitre suivant.

#### 7.1.2.2. Description du projet

- Choix de la stratégie de formulation

Comme cela a déjà été dit, plusieurs polyphénols ou extrait polyphénoliques ont montré des effets bénéfiques dans le modèle EAE : l'épigallocatechine gallate extrait du thé vert (Cai et al., 2021), l'extrait de peau de grenade (Lu et al., 2020) ou encore l'extrait de feuilles d'olivier (Giacometti and Grubić-Kezele, 2020). Dans le cas du GSE utilisé dans notre étude, plus de 15 polyphénols différents ont été identifiés (Figure 40) parmi lesquels l'épicatéchine et la catéchine (présentes en très forte concentration), la quercétine et ses dérivés ainsi que l'acide gallique, font très probablement partis des molécules actives dans le modèle. En effet, l'épicatéchine et la catéchine présentent une structure proche de l'épigallocatechine gallate du thé vert ayant montré son efficacité dans le modèle EAE (Cai et al., 2021). Les données propres à ces molécules au niveau des pathologies neurologiques sont très rares dans la littérature. Concernant l'acide gallique, plusieurs études ont permis de démontrer un effet neuroprotecteur de cette molécule (Shabani et al., 2020). De plus, une étude récente montre que l'acide gallique supprime l'inflammation (diminue l'expression de la cyclooxygénase de type 2 et de NFκB) et favorise la myélinisation (augmentation de l'expression de MBP) dans des cocultures de cellules gliales et de neurones hippocampiques suite à l'induction d'une démyélinisation par l'administration de lysophosphatidylcholine (Siddiqui et al., 2019). Enfin, Stegnjačić et al., en 2022 ont montré qu'une forme phénéthyl ester d'acide gallique (afin d'augmenter la biodisponibilité de la molécule) administrée pendant 9j à partir du 7<sup>ème</sup> jour post-immunisation permet de diminuer l'intensité des symptômes de rats EAE sans modifier la durée de ces symptômes (Stegnjačić et al., 2022). Enfin, la quercétine est un puissant inducteur de nrf2 cet effet pourrait être responsable de l'augmentation d'expression des principales enzymes antioxydantes induites par le GSE dans notre étude (Forman et Zhang, 2021, Shen et al., 2021). De plus, la quercétine pourrait avoir des effets immunomodulateurs intéressants, une étude *in vitro* menée sur des cellules mononucléaires de sang périphérique de patients atteints de SEP ayant montré sa capacité à réduire la prolifération de ces cellules et à moduler les niveaux d'IL-1β, de métalloprotéinase matricielle 9 et de TNF-α dans les surnageants de culture (Sternberg et al., 2008). Enfin son utilisation dans un modèle souris d'EAE-RR a montré sa capacité à améliorer les symptômes neurologiques et à diminuer la réponse immune (Muthian and Bright, 2004).

Cependant, pour toutes les molécules décrites ci-dessus, les doses administrées dans les articles où elles sont utilisées seules sont toujours plus fortes que celles administrées dans 200μL de GSE. De plus, les effets des molécules administrées seules sont souvent plus modérés que ceux obtenus avec notre GSE. Ce dernier point étant cependant relativement subjectif, les modèles EAE utilisés tout comme les protocoles de traitement (date de début et durée de traitement) étant différents d'une étude à une autre. Néanmoins, ces deux constats suggèrent que les différents composés actifs du GSE agissent en synergie, qui plus est, avec potentiellement l'implication d'autres molécules dont les fonctions ne sont

pas encore connues ou qui n'ont pas été détectées du fait de leur faible concentration mais qui resteraient néanmoins bioactives. Ainsi, le développement de nouvelles formulations de GSE n'a de sens qu'en tentant de préserver cette synergie.

Un intérêt tout particulier du GSE est que son utilisation pour ses propriétés bioactives permet également de réduire l'impact environnemental de la vinification par l'utilisation d'une partie des déchets produits (20 à 30% du raisin) et jusqu'à présent non utilisés. Chaque année, la production de vin génère 15 millions de tonnes de déchets de vinification dans le monde, 1,5 millions en France (Antonić et al., 2020). Même à petite échelle, l'utilisation des pépins de raisin en santé humaine serait une manière de limiter ce gâchis. Ainsi, il était important que nos nouvelles formulations utilisent toujours comme matière première la poudre de pépins de raisins issus du marc de vinification. Pour cela, nous avons initié une collaboration avec l'équipe du Pr Boris Mizaikoff à l'Institut de Chimie Analytique et Bioanalytique (Institute of Analytical and Bioanalytical Chemistry, IABC) de l'université d'Ulm en Allemagne qui possède une grande expérience dans la technique d'impression moléculaire (ou molecular imprinting) (Molinelli et al., 2002 ; Saad et al., 2021). Cette technique permet de créer dans un matériau synthétique (un polymère) des sites récepteurs artificiels spécifiques d'une molécule cible permettant de reconnaître et d'adsorber sélectivement la molécule cible (Molinelli et al., 2005). L'impression moléculaire selon l'approche non covalente consiste à mettre en contact la cible (également appelée template par anglicisme) avec un mélange de monomères (étape 1) capables de la complexer (étape 2). La polymérisation conduite en présence d'un monomère réticulant, permet d'obtenir un réseau polymère rigide (étape 3) qui, après élimination de la molécule cible, porte des sites complémentaires de cette dernière capables de la reconnaître de manière spécifique (Figure 46).

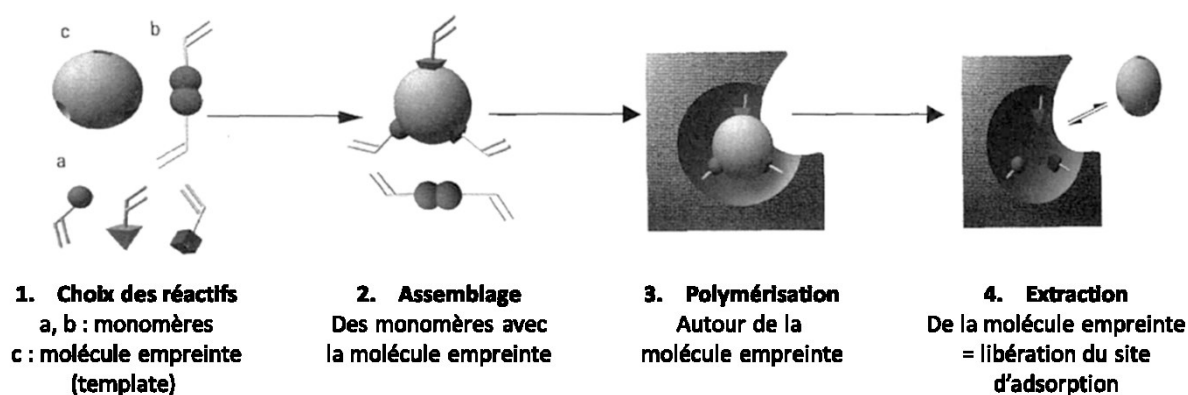


Figure 46 : Représentation schématique du processus d'empreinte moléculaire par l'approche non covalente

*Extrait de Hugon-Chapuis and Pichon, 2007*

Les polymères ainsi imprimés (MIP pour molecularly imprinted polymers) possèdent une très haute sélectivité pour leur molécule cible, comparable à celle des anticorps pour leur antigène (Molinelli et al., 2005 ; Hugon-Chapuis and Pichon, 2007). Ils peuvent alors notamment être utilisés comme matrice d'affinité en séparation, comme récepteurs artificiels pour le criblage des bibliothèques ou encore comme éléments de reconnaissance dans les capteurs ainsi qu'en immuno-analyse. Dans notre cas, ils seront utilisés pour sélectivement extraire les polyphénols du GSE. Afin de préserver la synergie des différents polyphénols au sein du GSE, l'impression moléculaire ne sera pas réalisée pour reconnaître de manière spécifique un polyphénol en particulier mais l'ensemble des molécules présentant au moins un cycle aromatique avec un ou plusieurs groupes hydroxyles attachés, à savoir la structure

chimique commune à tous les polyphénols (Crozier et al., 2006). Toutes les étapes concernant le développement des MIP puis l'extraction des polyphénols sont actuellement en cours de réalisation à l'Institut de Chimie Analytique et Bioanalytique d'Ulm.

Une fois les polyphénols extraits du reste du GSE, ils peuvent être concentrés dans une nouvelle formulation permettant si possible d'améliorer leur biodisponibilité. La nanoformulation des polyphénols est une des solutions possibles, l'encapsulation des molécules actives dans une membrane formée d'un composant différent permettrait de les protéger des dégradations trop rapides, d'améliorer leur perméabilité voire de favoriser leur diffusion dans des compartiments particuliers (Anand et al., 2022). Les paramètres importants ici sont : le choix de la molécule qui sera utilisée pour l'encapsulation puisque celle-ci doit être biocompatible et la taille des particules qui dépend notamment de la méthode d'encapsulation choisie. Une nouvelle fois cette partie du projet est sous la responsabilité du Pr Boris Mizaikoff qui possède une bonne expérience dans les techniques de nano-encapsulation (Wei et al., 2006 ; Kranz et al., 2009). Il a ainsi fait le choix d'utiliser le chitosan pour nano-encapsuler les polyphénols. Le chitosan est un polysaccharide linéaire naturel dont l'utilisation biomédicale s'est développée au cours de ces dernières années du fait de ses propriétés biophysiques (biodégradable, biocompatible), mais également de certaines propriétés biologiques (antimicrobiennes et anti-inflammatoire). Enfin, dans le cadre des maladies neurologiques, il présenterait l'intérêt considérable d'être capable de passer la BHE permettant ainsi la libération des molécules qu'il encapsule dans le SNC (Kravanja et al., 2019). Toutes les étapes concernant la fabrication des nanoparticules ainsi que leur caractérisation seront réalisées à Ulm. Les nouvelles formulations une fois finalisées seront envoyées à Clermont-Ferrand pour être analysées *in vivo*.

Il est important de noter qu'un des risques possibles de la stratégie développée est que l'ensemble des effets du GSE ne repose pas uniquement sur la phase phénolique mais également sur d'autres composés. Par exemple la phase lipidique du GSE contient du monostéarate de glycérol qui a été utilisé dans plusieurs études comme une matrice pour les nanoparticules lipidiques solides afin d'améliorer le transport des composés à travers la BHE (Natarajan et al., 2016). La phase aqueuse quant à elle contient du tréhalose pour lequel des fonctions neuroprotectrices ont été montrées dans plusieurs modèles de maladies neurodégénératives (Portbury et al., 2017 ; Lee et al., 2018). Néanmoins, ce n'est qu'en testant l'effet de nos nouvelles formulations purement phénoliques en comparaison à la formulation classique du GSE que nous pourrons savoir si ces formulations sont aussi efficaces ou non. Il sera toujours possible d'envisager un complément à ces formulations par la suite.

- Protocoles d'évaluation des nouvelles formulations

Brièvement, différentes formulations seront réalisées : deux à trois avec des doses connues d'un nombre déterminé de polyphénols et une dernière à partir de l'ensemble des polyphénols présents dans le GSE. Ces différentes formulations seront, dans un premier temps, évaluées en parallèle en comparaison d'un traitement avec le GSE classique selon le protocole de traitement utilisé dans l'article Mabrouk et al., 2022 sur les paramètres suivants : suivi longitudinal du poids et du score EAE et évaluation hebdomadaire des troubles moteurs et sensitifs. Seules les formulations présentant des effets significatifs seront ensuite évaluées pour étudier : 1) les effets biochimiques du traitement et 2) les modifications neuropathologiques toujours en reprenant une nouvelle fois les protocoles décrits dans Mabrouk et al., 2022.

Dans un second temps, une ou deux formulations seront retenues pour des études supplémentaires qui comprendront : 1) une évaluation à plus long terme de l'effet du traitement pour notamment étudier de possibles effets indésirables tardifs, 2) une évaluation neuropathologique détaillée incluant des études immunohistochimiques et en microscopie électronique, 3) une évaluation de l'effet du GSE sur le microbiote. Cette évaluation sera réalisée car : des atteintes du microbiote ont été mises en évidence chez les souris EAE (Ochoa-Repáraz et al., 2009) et les patients atteints de SEP (Chen et al., 2016 ; Correale et al., 2022) et des modifications du microbiote ont été montrées suite à un traitement par le GSE ou d'autres extraits polyphénoliques (Lu et al., 2020 ; Ferreira et al., 2023). Cette partie du travail sera faite en collaboration avec le Dr Frédéric CARVALHO membre de l'UMR Neuro-Dol travaillant sur les douleurs d'origine viscérale qui a une grande expérience de l'analyse du microbiote intestinal et de ses conséquences fonctionnelles (Defaye et al., 2020 ; Miquel et al., 2016).

## **7.2. Rôle des protéolipoprotéines dans le développement des troubles sensitifs**

Pour ce dernier projet, je souhaiterais développer un axe plus physiopathologique et moins thérapeutique. Pour cela, je prévois de déposer une demande de financement à l'appel d'offre annuel de l'association européenne contre les leucodystrophies (ELA) au mois de juin. Ce projet se fera en collaboration avec le Pr Hauke Werner du Max Planck Institute pour les sciences multidisciplinaires à Göttingen en Allemagne (ancien Institute of Experimental Medicine) pour la production des souris transgéniques et le Dr Aubin MOUTAL de l'école de médecine de l'université de St. Louis aux Etats-Unis pour la production d'outils de surexpression et de sous-expression protéique qui seront nécessaires au projet.

Comme cela a été dit dans le chapitre 5.1.1 p31, la gaine de myéline a pour fonction principale de favoriser la conduction saltatoire de l'influx nerveux mais elle possède des fonctions annexes telles que la protection physique, le support métabolique mais également l'élimination des ions produits par les neurones. Pour l'ensemble de ces fonctions, la gaine de myéline joue un rôle fondamental dans les fonctions motrices, cognitives et sensitives des individus. Concernant les fonctions sensitives, un faisceau d'arguments récents, suggère une implication de la myélinisation dans le développement de douleurs chroniques. Tout d'abord (et comme nous l'avons déjà bien décrit dans ce manuscrit) les symptômes sensitifs et notamment douloureux sont présents dans de nombreuses pathologies dys-ou démyélinisante sans qu'il soit clairement déterminé si l'origine de ces douleurs est : la dégénérescence axonale associée à ces maladies ou bien un effet direct de la dégradation de la gaine de myéline ou bien encore la conséquences de la réponse inflammatoire associée à cette dégradation de la gaine (les 3 hypothèses ne s'excluent pas forcément les unes des autres). Parmi les acteurs de la gaine de myéline, la protéine PLP dont les fonctions exactes ne sont pas encore toutes élucidées pourraient jouer un rôle tout particulier dans la perception sensitive.

Tout d'abord, l'implication indirecte de PLP/DM20 dans l'inclusion membranaire de SIRT2, une déacétylase NAD<sup>+</sup> dépendante qui permettrait de maintenir la déacétylation de certaines protéines assurant la stabilité des microtubules, renforce l'idée d'interactions rapprochées entre l'axone et l'oligodendrocyte (Werner et al., 2007). Ces interactions pourraient passer par une fonction neuroprotectrice de PLP/DM20 dans le SNC des mammifères, indépendante de sa fonction de compaction de la myéline (Campagnoni and Skoff, 2001 ; Wang et al., 2008). De plus, une possible action de PLP au niveau de la membrane mitochondriale et par conséquent, dans le métabolisme énergétique du SNC, a été également suggérée par les résultats observés chez les animaux sur-

exprimant le gène *Plp1*. Une première hypothèse serait que PLP, par sa conformation transmembranaire et ses motifs permettant son intégration aux membranes mitochondriales, pourrait agir comme régulateur du potentiel de membrane mitochondriale par la formation de pores (Hüttemann et al., 2009 ; Hogan et al., 2009). Une autre hypothèse testée *in vitro* serait que PLP inséré dans la membrane mitochondriale pourrait acidifier le milieu de culture, notamment en augmentant les lactates, et augmenter la quantité d'ATP dans le milieu. Transposé *in vivo*, PLP pourrait provoquer une acidose et augmenter l'ATP extracellulaire, deux mécanismes connus pour participer à la neurodégénérescence (Appikarla et al., 2014). Cet effet serait spécifique de PLP et ne serait pas retrouvé pour son isoforme DM20 (Somayajulu et al., 2018). Certaines études ont également avancé l'hypothèse selon laquelle PLP/DM20 pourraient avoir un rôle de canal. Cette hypothèse repose sur (1) la conformation à quatre domaines transmembranaires de ces protéines qui se rapproche de celle d'autres protéines canaux, (2) la capacité de ces protéines à former des hexamères de type hémicanal et (3) le fait que la présence de ces protéines induirait des modifications voltage-dépendantes dans le cerveau (Díaz et al., 1990 ; Knapp, 1996 ; Greer et Lees, 2002). De plus, une expression des protéolipoprotéines dans les neurones et leur implication dans le fonctionnement neuronal a été rapportée dans plusieurs études (Ikenaka et al., 1992 ; Miller et al., 2009). Au moins dans certaines structures et notamment la *medulla oblongata*, PLP/DM20 agiraient dans les neurones sur le fonctionnement de certains types de canaux potassiques calcium dépendants impliqués dans la régulation de l'intensité des potentiels d'action et dont l'absence ou la sous-expression sont connues pour induire des épilepsies ou des ataxies (Mayer et al., 2009).

Finalement, une étude récente a montré que l'activation de la voie éphrine-B3/EphBs au niveau spinal est capable de moduler la sensibilité à la douleur chez des souris sauvages par un mécanisme dépendant de PLP (Zhang et al., 2021). Brièvement, cette étude décrit qu'une diminution de l'expression de éphrine B3 (souris présentant une délétion du gène) provoque : 1) au niveau de la moelle épinière des atteintes de la gaine de myéline et une diminution de l'expression de PLP et 2) au niveau comportemental une hypersensibilité pour des *stimuli* mécanique et chaud. De façon très intéressante, la transfection de PLP au niveau spinal corrige cette hypersensibilité, et pour confirmer l'implication de PLP, les auteurs ont montré que la diminution de l'expression de PLP par administration intrathécale d'ARN antisens était suffisante pour induire une hyperalgésie thermique et mécanique chez des souris contrôles.

Tous ces travaux sont préliminaires et la plupart des données n'ont pas été répliquées ou détaillées par la suite. Néanmoins, l'ensemble de ces hypothèses formulées à des époques différentes par des équipes différentes suggèrent que le rôle de PLP ne se cantonne pas à la simple compaction de la gaine de myéline mais qu'il pourrait jouer un rôle dans l'interaction myéline axone, avoir une fonction métabolique au niveau de la mitochondrie voire qu'il pourrait avoir une fonction neuronale ; et que par l'un de ses mécanismes (ou par une voie non encore identifiée) il pourrait jouer un rôle dans la régulation des seuils sensitifs. Bien qu'imparfait, ce rationnel nous semble suffisant pour, sans prétendre vouloir identifier un mécanisme d'action bien particulier, déposer un projet visant à explorer un peu mieux la possible implication de PLP dans le développement de troubles sensitifs.

Pour cela, nous prévoyons une étude selon trois axes de travail. Le premier axe visera à évaluer les signalisations éphrine-B/EphBs et PLP dans les moelles épinières de modèles murins de douleur chronique. Afin d'éviter une utilisation excessive de souris dans le projet, les tissus utilisés pour les quantifications en western-blot proviendraient de modèles de neuropathie chimio-induite et de modèles de douleurs neuropathiques diabétiques et traumatiques développés au laboratoire sur

d'autres projets et pour lesquels les tissus spinaux sont déjà utilisés pour d'autres analyses. Les tissus des souris EAE-CP, EAE-CR et Plp null seront également étudiés notamment pour la signalisation éphrine-B/EphBs. L'objectif est ici d'étudier si les signalisations éphrine-B/EphBs et PLP sont dérégulées dans des modèles de douleur chronique. Pour le moment, une implication de la signalisation éphrine-B/EphBs n'a été démontrée que dans un modèle de neuropathie diabétique et sans étudier en parallèle la signalisation PLP (Deng et al., 2017). Le deuxième axe visera à étudier, dans les modèles présentant une dérégulation de ces signalisations, si la correction de ces dérégulations (par surexpression de PLP et sous-expression de la voie éphrine-B/EphBs) est capable de corriger les troubles sensitifs présents dans le modèle. Enfin le dernier axe, relativement indépendant des deux premiers, visera à étudier les troubles sensitifs dans un modèle présentant non pas une invalidation complète du gène *Plp1*, mais seulement une invalidation neuronale. Un tel modèle existe déjà puisqu'il y a quelques années, l'équipe du Pr Hauke Werner a publié une étude comparant le phénotype de souris Plp null floxées dont l'expression de PLP était spécifiquement inactivée soit dans les neurones, soit dans les oligodendrocytes. Au cours de cette étude, il a été montré que seule l'invalidation de *Plp1* dans les oligodendrocytes était responsable du développement d'une dégénérescence axonale et d'une prolifération gliale (astrocytes et cellules microgliales) similaire à celles retrouvées dans le modèle présentant une invalidation complète (Lüders et al., 2017). Malheureusement, au cours de cette étude, aucune analyse comportementale n'a été réalisée. Cependant, il est crucial de savoir si les souris présentant une invalidation de *Plp1* uniquement dans les neurones sont susceptibles de développer des troubles comportementaux et notamment des troubles sensitifs. Cela prouverait un rôle du PLP neuronal sur le développement de ces comportements anormaux sans pour autant permettre d'en préciser les mécanismes d'action, mais cela serait déjà une première étape importante.

---

## **8. Conclusion générale**



A l'issue de ce travail rédactionnel en vue de l'obtention de l'habilitation à diriger des recherches, il paraît nécessaire de prendre le temps de l'analyse et de proposer quelques réflexions sur les travaux de recherche réalisées et à venir mais également sur la personne responsable de ces travaux, moi-même.

### 8.1. De la difficulté à mener à bien toutes les tâches incombant au statut d'enseignant-chercheur

Pour débiter cette conclusion et alors que ce travail rédactionnel touche à sa fin puisqu'il devra être envoyé d'ici quelques jours (avec un peu de retard, je m'en excuse une nouvelle fois), je me permets une analyse personnelle qui n'a pas grand-chose de scientifique. En rédigeant ce manuscrit plusieurs points se dégagent avec évidence. Tout d'abord, cette HDR aurait dû être soutenue il y a plusieurs années déjà ; le contenu scientifique était déjà assez important il y a au moins 5 ans déjà. Cependant, cela n'était alors pas possible car le nombre d'articles publiés n'était pas suffisant. Ceci illustre une mauvaise habitude de ma part de privilégier les projets et les collaborations, et de retarder la valorisation des travaux de recherche par des publications. C'est aussi une conséquence de mon éternel perfectionnisme, me conduisant à penser que les travaux ne sont jamais assez avancés pour être soumis. Même si j'essaye de m'améliorer avec l'âge, (les travaux de mes étudiantes en thèse sont dorénavant publiés dans de bien meilleur délai) le nombre de données non publiées présentées dans ce manuscrit prouvent que j'ai encore des progrès à faire et qu'une de mes obligations à court terme (en plus des demandes de financement ANR PRCI et ELA) doit être de finaliser plusieurs articles.

S'il est important d'être capable de reconnaître ses défauts et de tenter de les améliorer, il me semble important de préciser qu'une autre explication à cette procrastination dans l'écriture des articles est la réelle difficulté à mener de front et avec un niveau d'exigence suffisant la double tâche de l'enseignant-chercheur : enseigner et faire de la recherche. Tâche en vérité triple lorsque l'on rajoute les fonctions administratives qui semblent chaque année de plus en plus lourdes, effet possible de mon vieillissement mais plus probablement des réformes successives faites à objectifs croissants mais effectifs constants. L'objectif ici n'est pas de s'apitoyer sur son sort, mais de reconnaître que le mode de travail fractionné qu'occasionne inévitablement des tâches trop dispersées n'est pas favorable à la réflexion scientifique qui nécessite le temps de l'analyse des résultats en comparaison à la littérature scientifique, le temps de la confrontation des hypothèses puis le temps de la rédaction. Lors de cette rédaction de mémoire s'est révélée de manière encore plus intense la difficulté d'avoir en permanence à jongler entre la correction de copies, la réalisation des emplois du temps du second semestre, les cours, tout en essayant de produire le contenu de ce manuscrit. Et les sentiments de renoncement, notamment à lire de nouveaux articles qui semblaient particulièrement intéressants, et d'insatisfaction à finir ce manuscrit dans l'urgence sans pouvoir totalement y apporter le niveau de soin espéré, n'en ont été que plus grands. Cette situation n'est pas sans rappeler parfois celle des héros des romans de Kafka ou Kundera qui tentant de répondre à toutes les injonctions parfois antinomiques auxquels ils sont soumis développent un mode de fonctionnement stéréotypés dénués de sens dans lequel ils s'enferment et souvent (romantisme slave oblige) dépérissent. Si je dois avouer apprécier énormément ses auteurs pour la qualité de leurs descriptions de la nature humaine, je préférerais au lieu de me sentir dans ma vie professionnelle l'héroïne de l'une de leur histoire, conserver du temps dans ma vie personnelle pour m'adonner à la lecture de leurs romans.

## **8.2. Réflexions sur l'utilisation du modèle animal dans la recherche biomédicale**

Revenons maintenant à une réflexion un peu plus scientifique sur un point qui me questionne depuis le début de ma carrière et qui continuera probablement à me questionner jusqu'à la fin de celle-ci : est-ce que les modèles animaux sont réellement un bon outil pour étudier les pathologies humaines, et est-ce que les résultats qu'ils permettent d'obtenir justifient le sacrifice conséquent en vies animales inhérent à leurs utilisations.

### **8.2.1. Analyse générale**

Déjà dans la discussion de ma thèse de neurosciences je m'interrogeais sur les critères de validité d'un modèle animal, et plus particulièrement sur la capacité des souris KO STOP à remplir ces critères. Pour cela je m'appuyais sur les 4 critères de validité d'un modèle animal de maladie psychiatrique décrits par McKinney et Bunney en 1969 : la similitude des conditions d'induction, la similitude des états comportementaux, la similitude des mécanismes de développement de la maladie et la similitude de réponse aux traitements. Quatre critères repris depuis respectivement sous les noms de validité de construction, validité de phénotype, validité d'expression et validité de prédiction (Lipska and Weinberger, 2000). Les souris KO STOP présentent une validité de construction puisqu'elles trouvent leur origine dans une perturbation du neurodéveloppement et qu'une étude japonaise publiée a montré une association entre des polymorphismes pour le gène *STOP* et la schizophrénie (Shimizu et al., 2006). Ces souris présentent également une validité de phénotype puisque comme nous l'avons montré elles présentent des troubles comportementaux mimant les symptômes productifs, déficitaires et cognitifs de la maladie dont certains apparaissent comme chez les patients après la puberté. Elles présentent aussi une validité d'expression puisque ces souris développent des anomalies neurochimiques et des altérations des fonctions synaptiques retrouvées chez les patients atteints de schizophrénie. Elles présentent enfin une validité de prédiction puisque les symptômes de type productifs sont améliorés par les neuroleptiques typiques tandis que les symptômes cognitifs ne sont pas améliorés voire sont aggravés par ces traitements.

Néanmoins, s'interroger sur les critères de validité d'un modèle animal c'est déjà assumer le fait que l'utilisation de ce modèle est justifiée dans le cadre de la recherche biomédicale. A l'heure où la reconnaissance des droits des animaux est (à juste titre) de plus en plus prise en compte, de nombreuses voix s'élèvent contre l'utilisation des animaux à des visées de recherche. Il est difficile (et clairement inopportun) de fermer les yeux sur l'évolution de la société en termes d'éthique animale ce qui conduit à une réévaluation de nos pratiques aux laboratoires et peut-être envisager de remplacer les modèles animaux. Depuis de nombreuses années, je m'intéresse aux différentes discussions et avancées sur le sujet. J'envisage de plus en plus, de développer des techniques expérimentales *in vitro* pour étudier certains mécanismes d'action en limitant le nombre d'animaux utilisés. Travailler sur des cellules souches pluripotentes induites à partir de tissus de patients constitue une option très intéressante et une direction que je souhaiterais donner à mon travail, ou du moins une partie de mon travail (Lee et al., 2017 ; Wu et al., 2018). En effet, pour des pathologies aussi complexes que la SEP ou la schizophrénie, pour lesquels les phénomènes physiopathologiques évoluent au cours du temps et impliquent l'interaction de types cellulaires très différents (certains, comme les cellules immunitaires, n'étant même pas issus du SNC), les cellules souches pluripotentes induites ou leur version encore plus évoluée les organoïdes cérébraux ne semblent à l'heure actuelle pas assez évolués pour permettre de tester toutes les hypothèses physiopathologiques. De façon encore plus marquée, lors de l'évaluation de stratégies thérapeutiques, ces modèles *in vitro* ne permettent pas d'évaluer la

biodisponibilité des composés, ni leurs effets sur les symptômes neurologiques (une molécule peut moduler le fonctionnement cellulaire des neurones sans pour autant être suffisante pour corriger les symptômes), ni leurs potentiels effets indésirables sur d'autres organes. Ainsi, malgré des questionnements éthiques, je ne vois pas comment dans un avenir proche la recherche en neuropharmacologie pourrait s'affranchir de l'utilisation des modèles animaux.

Malgré ce constat, il est tout de même possible de mener des actions permettant de limiter le nombre d'animaux utilisés. Tout d'abord, il est primordial de planifier au mieux les protocoles expérimentaux afin d'obtenir le plus de résultats exploitables possibles – comportement, quantification moléculaire ou cellulaire sur différents prélèvements - sur une même série d'animaux. Il est également très important d'augmenter la qualité des expériences (en respectant les bonnes pratiques expérimentales et en utilisant des protocoles standardisés publiés de façon détaillée) afin d'augmenter la reproductibilité des résultats expérimentaux (Mandillo et al., 2008 ; Percie et al., 2020). Dans le cas de l'EAE, le développement d'un nombre de protocoles d'induction presque aussi important que le nombre de laboratoires utilisant ce modèle rend la comparaison des données de la littérature très complexe. Enfin, choisir le modèle animal adapté à l'hypothèse formulée est également un moyen d'éviter des expériences coûteuses en animaux injustifiées. En science le modèle est une représentation simplifiée, souvent formalisée, d'un processus, d'un système ; par définition, le modèle représente une réalité, il ne constitue pas la réalité. Il en va de même du modèle animal de pathologie humaine. Si ces modèles sont utiles pour représenter la pathologie humaine et permettre des études qui ne sont pas directement réalisables chez l'homme, ils ne sont pas une copie conforme de cette pathologie. Ainsi, tout modèle animal présente ces avantages et limites (Mix et al., 2010), l'important lors de son utilisation est d'être conscient de ceux-ci et l'utilisation des critères de validité décrits ci-dessus peut être une manière formative de représenter ces avantages et limites. Pour simplifier, avant de mettre en place une étude expérimentale, il est impératif de se demander si le modèle que nous prévoyons d'utiliser est bien adapté à l'hypothèse que nous souhaitons étudier. Le prochain chapitre tentera de montrer comment nous avons appliqué ces réflexions à notre étude des modèles murins de SEP.

### **8.2.2. Analyse spécifique aux modèles animaux de sclérose en plaques**

La SEP se caractérise par une hétérogénéité des formes cliniques et des symptômes qui leur sont associés pouvant s'expliquer par la dissémination aléatoire des lésions dans l'ensemble du SNC, mais également l'évolution de la nature de ces lésions au cours du temps chez un même patient et entre les patients. Étant donné qu'il n'existe pas de modèle animal mimant l'intégralité du spectre de la SEP, l'étude comparative et combinée de plusieurs modèles nous a semblé le meilleur moyen d'appréhender la maladie dans sa globalité et d'obtenir une évaluation plus réaliste des paramètres étudiés. C'est la raison pour laquelle nous avons décidé de travailler en parallèle sur deux modèles animaux : les souris EAE (RR puis CP) en tant que modèle mimant la physiopathologie immune, inflammatoire et démyélinisante de la SEP et les souris Plp null utilisées comme un modèle de pathologie dysmyélinisante conduisant à une dégénérescence axonale secondaire associée à des atteintes du stress oxydant et provoquant des symptômes moteurs, cognitifs et sensitifs (seules les souris EAE présentent la validité de construction).

L'étude comparative et combinée de ces deux modèles a permis de mettre en évidence, l'apparition de certains troubles sensitifs communs aux deux modèles tels que l'hyperalgésie somatique au chaud

tandis que d'autres sont spécifiques d'un modèle donné. Ainsi, les souris EAE-RR développent au niveau somatique une allodynie mécanique et une allodynie au froid alors que les souris Plp null présentent une hyposensibilité mécanique sans anomalie de la réponse sensitive au froid. Lorsque la sphère orofaciale a été évaluée, une hypersensibilité lors de stimulations mécaniques intenses a été observée bien que transitoirement chez les souris EAE, tandis que les souris Plp null développent principalement une hyposensibilité au froid. Les souris EA-CP étudiées plus tardivement dans le projet présentent des symptômes sensitifs similaires aux souris EAE-RR en ce qui concerne la sphère somatique ; ceux concernant la sphère oro-faciale n'ont pas encore été étudiés.

Ces résultats obtenus dans les deux modèles démontrent qu'ils présentent la validité de phénotype et supportent notre hypothèse initiale selon laquelle différents aspects physiopathologiques de la SEP (processus inflammatoire vs dégénérescence axonale), ne conduisent pas exactement aux mêmes symptômes. Il est d'ailleurs intéressant de noter que la présence de signes d'hyposensibilité, caractéristique des atteintes neuropathiques chroniques, n'est retrouvée que chez les souris Plp null, modèle présentant un aspect neurodégénératif beaucoup plus marqué.

En clinique cette dissociation entre types de troubles sensitifs et forme de SEP a également été observée. L'étude réalisée par le service de neurologie du CHU de Clermont-Ferrand auprès de 673 patients du réseau SEP Auvergne a permis de montrer que 79% d'entre eux ont présenté des symptômes douloureux : 51% ont rapporté des douleurs avec des caractéristiques neuropathiques et 46% ont rapporté des migraines (Moisset et al., 2013). L'analyse de corrélation entre les différentes variables a montré que les douleurs migraineuses (par excès de nociception), mais pas les douleurs neuropathiques, sont associées à un âge plus jeune et une durée de maladie plus courte, à une maladie de forme SEP-RR et à une réponse positive au traitement par interféron- $\beta$ . Ceci suggère que les mécanismes physiopathologiques conduisant au développement des migraines ou des douleurs neuropathiques chez les patients atteints de SEP seraient différents. La migraine serait associée aux phénomènes inflammatoires tandis que les douleurs neuropathiques seraient plutôt dues aux lésions précoces du SNC, hypothèse également supportée par les résultats d'autres équipes (Môhrke et al., 2013 ; Graziano et al., 2015), suggérant une validité d'expression pour nos deux modèles.

Fort de ces résultats comportementaux, l'évaluation de l'efficacité de nouvelles stratégies thérapeutiques en parallèle dans les deux modèles prend tout son sens lorsque cela est possible. Les travaux réalisés par notre équipe ou celle de Marre T Smith ont montré que les souris EAE sont sensibles à un traitement au fingolimod et à un traitement antioxydant (acide lipoïque ou GSE) tandis que les souris Plp null ses sont avérées résistantes à tous les traitements testés. Ces résultats confirment à nouveau l'intérêt de notre stratégie de comparer les résultats obtenus dans les deux modèles animaux puisqu'il semblerait que tout comme en clinique, les symptômes liés à la dégénérescence axonales soient plus difficiles à traiter que ceux liés aux formes RR, suggérant une validité de prédiction de ces modèles. Aussi, serait-il très intéressant d'évaluer l'effet du GSE dans le modèle Plp null du fait de son potentiel effet neuroprotecteur. Cette étude n'a pour le moment pas été initiée car avec la formulation actuelle du GSE il serait nécessaire de réaliser des injections i.p. quotidiennes pendant de nombreuses semaines (souris âgées de 3 à 7 mois) ce qui n'est pas du tout réaliste. Nous espérons que les nouvelles formulations de GSE permettent des administrations orales peut-être moins fréquentes ce qui permettrait alors d'envisager le traitement des souris Plp null.

### 8.3. Le changement multiple de thématiques de recherche : un mal pour un bien

Pour finir, j'ai pu assister ces derniers mois à la soutenance d'HDR de deux collègues de l'UMR Neuro-Dol ayant fait leur thèse, leur post-doctorat puis leur activité de maître de conférences sur plusieurs aspects de la même thématique de douleur chronique et je dois avouer les avoir enviés pour le fait de n'avoir qu'un contexte scientifique à décrire (et non trois) et surtout parce que sur la même durée de carrière ils sont devenus des spécialistes de leur thématique de recherche, quand de mon côté je suis devenue une neuropharmacologiste généraliste. Pendant la rédaction de ce manuscrit, les trois contextes scientifiques m'ont donné beaucoup de travail, mais j'ai beaucoup apprécié lire de nouveaux articles sur des thématiques que j'avais un peu délaissées et cela m'a permis de me rendre compte que leur lecture, me donnait en fait plein d'idées pour mes projets futurs. Je pense dorénavant que ma pluralité de thématique, si elle m'a donné beaucoup de travail pour me mettre à niveau à chaque changement de laboratoire, m'apporte finalement des connaissances nombreuses et complémentaires que je peux réutiliser au grès de mes projets. Ceci est d'autant plus vrai en travaillant sur des maladies multifactorielles telles que la schizophrénie ou la SEP. C'est d'ailleurs avec une figure illustrant les nouvelles pistes physiopathologiques de la schizophrénie que je souhaiterais terminer ce manuscrit (Figure 47).

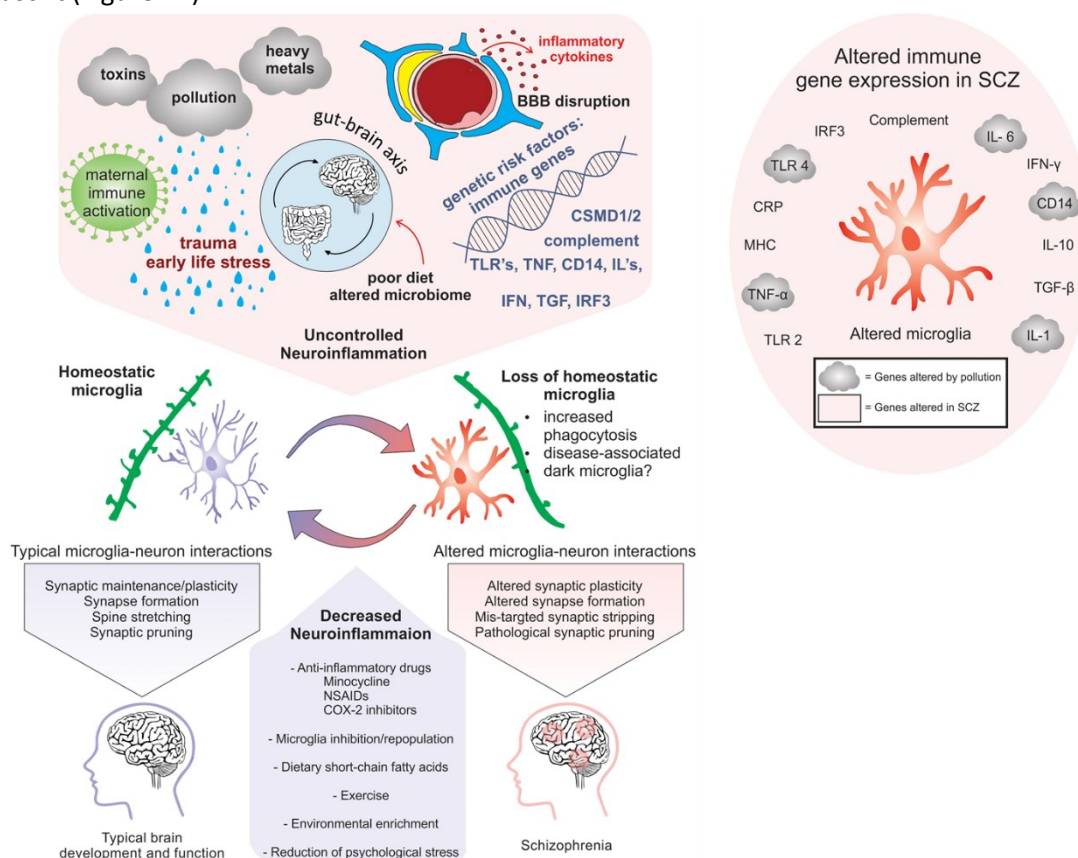


Figure 47 : La neuro-inflammation induit des changements de la microglie qui sont impliqués dans la pathogénicité de la schizophrénie  
 Extrait de Comer et al., 2022

Les facteurs de risque de la schizophrénie qui altèrent le fonctionnement de la microglie et augmente la neuro-inflammation incluent la pollution, le stress, la malnutrition induisant une dysbiose de l'axe intestin-cerveau, les infections virales et l'activation immunitaire maternelle pendant la grossesse. Dans un milieu pro-inflammatoire, la perte de l'homéostasie microgliale perturbe les interactions neurones-microglie pouvant conduire à des altérations de la plasticité et à un élagage synaptique. Ainsi, les approches thérapeutiques favorisant l'homéostasie microgliale pourraient potentiellement améliorer la symptomatologie des patients atteints de schizophrénie.

Je l'ai découvert lors de mes recherches bibliographiques réalisées pour la rédaction de ce mémoire et je lui trouve tellement de similitudes avec une figure de physiopathologie de SEP que j'y ai vu comme un signe sur la complémentarité de mes travaux de recherche (Comer et al., 2020). Peut-être que finalement mes travaux actuels pourront être utiles à des patients atteints d'une autre pathologie que la SEP...

*Addendum - Reprenant les travaux de recherche de mes différents membres du jury pour rédiger mes remerciements, j'ai découvert avec amusement que le Dr Brahim Nait-Oumesmar s'était également offert, avec un certain succès, une parenthèse de recherche dans le domaine de la schizophrénie (Maas et al., 2020a et b). Moi qui suis plutôt cartésienne, je commence à voir des signes partout ; c'est qu'il est clairement temps de terminer ce manuscrit. Merci pour votre lecture.*

---

## **9. Références bibliographiques**



### **9.1. Activités de recherche pendant la thèse**

- Abi-Dargham A, Gil R, Krystal J, Baldwin RM, Seibyl JP, Bowers M, van Dyck CH, Charney DS, Innis RB, Laruelle M. Increased striatal dopamine transmission in schizophrenia: confirmation in a second cohort. *Am J Psychiatry*. 1998 Jun;155(6):761-7.
- Andrieux A, Salin PA, Vernet M, Kujala P, Baratier J, Gory-Fauré S, Bosc C, Pointu H, Proietto D, Schweitzer A, Denarier E, Klumperman J, Job D. The suppression of brain cold-stable microtubules in mice induces synaptic defects associated with neuroleptic-sensitive behavioral disorders. *Genes Dev*. 2002 Sep 15;16(18):2350-64.
- Andrieux A, Salin P, Schweitzer A, Bégou M, Pachoud B, Brun P, Gory-Fauré S, Kujala P, Suaud-Chagny MF, Höfle G, Job D. Microtubule stabilizer ameliorates synaptic function and behavior in a mouse model for schizophrenia. *Biol Psychiatry*. 2006 Dec 1;60(11):1224-30.
- Bégou M, Brun P, Bertrand JB, Job D, Schweitzer A, D'Amato T, Saoud M, Andrieux A, Suaud-Chagny MF. Post-pubertal emergence of alterations in locomotor activity in stop null mice. *Synapse*. 2007 Sep;61(9):689-97.
- Bégou M, Bertrand JB, Brun P, Volle J, Job D, Schweitzer A, Saoud M, d'Amato T, Andrieux A, Françoise Suaud-Chagny MF. The STOP null mice model for schizophrenia display cognitive and social deficits partly alleviated by neuroleptics. *Neuroscience* 2008;157(1):29-39.
- Bertrand JB, Langlois JB, Bégou M, Volle J, Brun P, d'Amato T, Saoud M, Suaud-Chagny MF: Longitudinal MRI monitoring of brain damage in the neonatal ventral hippocampal lesion rat model of schizophrenia. *Hippocampus* 20:264-278, 2010.
- Black MD, Lister L, Hitchcock JM, Van Giersbergen P, Sorensen SM. Neonatal hippocampal lesion model of schizophrenia in rats: Sex differences and persistence of effects into maturity. *Drug Dvpt Research*. 1998 Apr;43(4):206-13.
- Bleuler E. *Dementia praecox oder Gruppe der Schizophrenien* (1911), (rééd. *Dementia praecox ou Groupe des schizophrénies*, GREC/EPEL, 2001, coll. « École lacanienne de psychanalyse »).
- Bouvrais-Veret C, Weiss S, Andrieux A, Schweitzer A, McIntosh JM, Job D, Giros B, Martres MP. Sustained increase of alpha7 nicotinic receptors and choline-induced improvement of learning deficit in STOP knock-out mice. *Neuropharmacology*. 2007 Jun;52(8):1691-700.
- Breier A, Su TP, Saunders R, Carson RE, Kolachana BS, de Bartolomeis A, Weinberger DR, Weisenfeld N, Malhotra AK, Eckelman WC, Pickar D. Schizophrenia is associated with elevated amphetamine-induced synaptic dopamine concentrations: evidence from a novel positron emission tomography method. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Mar 18;94(6):2569-74.
- Brenner E, Sonnewald U, Schweitzer A, Andrieux A, Nehlig A. Hypoglutamatergic activity in the STOP knockout mouse: a potential model for chronic untreated schizophrenia. *J Neurosci Res*. 2007 Nov 15;85(15):3487-93.
- Brun P, Bégou M, Andrieux A, Mouly-Badina L, Clerget M, Schweitzer A, Scarna H, Renaud B, Job D, Suaud-Chagny MF. Dopaminergic transmission in STOP null mice. *J Neurochem*. 2005 Jul;94(1):63-73.
- Callicott JH, Straub RE, Pezawas L, Egan MF, Mattay VS, Hariri AR, Verchinski BA, Meyer-Lindenberg A, Balkissoon R, Kolachana B, Goldberg TE, Weinberger DR. Variation in DISC1 affects hippocampal structure and function and increases risk for schizophrenia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Jun 14;102(24):8627-32.
- Carlsson A, Lindqvist M. Effect of chlorpromazine or haloperidol on formation of 3-methoxytyramine and normetanephrine in mouse brain. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)*. 1963;20:140-4.
- Carlsson A, Waters N, Holm-Waters S, Tedroff J, Nilsson M, Carlsson ML. Interactions between monoamines, glutamate, and GABA in schizophrenia: new evidence. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2001;41:237-60.
- Canuso CM, Goldstein JM, Green AI. The evaluation of women with schizophrenia. *Psychopharmacol Bull*. 1998;34(3):271-7.
- Creese I, Burt DR, Snyder SH. Dopamine receptor binding predicts clinical and pharmacological potencies of antischizophrenic drugs. *Science*. 1976 Apr 30;192(4238):481-3.
- Delay J, Deniker P, Harl JM. Utilisation en thérapeutique psychiatrique d'une phénothiazine d'action centrale élective (4560 RP) [Therapeutic use in psychiatry of phenothiazine of central elective action (4560 RP)]. *Ann Med Psychol (Paris)*. 1952 Jun;110(2 1):112-7.

- Delay J, Deniker P. Neuroleptic effects of chlorpromazine in therapeutics of neuropsychiatry. *J Clin Exp Psychopathol.* 1955 Apr-Jun;16(2):104-12.
- Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fifth Edition, Text Revision (DSM-5-TR). Edited by: American Psychiatric Association. 2022.
- Esquirol Etienne. Des maladies mentales (2 tomes) considérées sous les rapports médical, hygiénique et médico-légal. Paris: Paul Renouard pour J.-B. Baillière, Londres, Lyon et Leipzig, 1838.
- Fradley RL, O'Meara GF, Newman RJ, Andrieux A, Job D, Reynolds DS. STOP knockout and NMDA NR1 hypomorphic mice exhibit deficits in sensorimotor gating. *Behav Brain Res.* 2005 Sep 8;163(2):257-64.
- Fusar-Poli P, Tantardini M, De Simone S, Ramella-Cravaro V, Oliver D, Kingdon J, Kotlicka-Antczak M, Valmaggia L, Lee J, Millan MJ, Galderisi S, Balottin U, Ricca V, McGuire P. Deconstructing vulnerability for psychosis: Meta-analysis of environmental risk factors for psychosis in subjects at ultra high-risk. *Eur Psychiatry.* 2017 Feb;40:65-75.
- Gainetdinov RR, Mohn AR, Caron MG. Genetic animal models: focus on schizophrenia. *Trends Neurosci.* 2001 Sep;24(9):527-33.
- Gardner DM, Baldessarini RJ, Waraich P. Modern antipsychotic drugs: a critical overview. *CMAJ.* 2005 Jun 21;172(13):1703-11.
- Gory-Fauré S, Powell R, Jonckheere J, Lanté F, Denarier E, Peris L, Nguyen CH, Buisson A, Lafanechère L, Andrieux A. Pyr1-Mediated Pharmacological Inhibition of LIM Kinase Restores Synaptic Plasticity and Normal Behavior in a Mouse Model of Schizophrenia. *Front Pharmacol.* 2021 Mar 12;12:627995.
- Grinchii D, Dremencov E. Mechanism of Action of Atypical Antipsychotic Drugs in Mood Disorders. *Int J Mol Sci.* 2020 Dec 15;21(24):9532.
- Horacek J, Bubenikova-Valesova V, Kopecek M, Palenicek T, Dockery C, Mohr P, Höschl C. Mechanism of action of atypical antipsychotic drugs and the neurobiology of schizophrenia. *CNS Drugs.* 2006;20(5):389-409.
- Jablensky A. Epidemiology of schizophrenia: the global burden of disease and disability. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci.* 2000;250(6):274-85.
- Kahn RS, Keefe RS. Schizophrenia is a cognitive illness: time for a change in focus. *JAMA Psychiatry.* 2013 Oct;70(10):1107-12.
- Kahn RS, Sommer IE, Murray RM, Meyer-Lindenberg A, Weinberger DR, Cannon TD, O'Donovan M, Correll CU, Kane JM, van Os J, Insel TR. Schizophrenia. *Nat Rev Dis Primers.* 2015 Nov 12;1:15067.
- Kajitani K, Thorne M, Samson M, Robertson GS. Nitric oxide synthase mediates the ability of darbepoetin alpha to improve the cognitive performance of STOP null mice. *Neuropsychopharmacology.* 2010 Jul;35(8):1718-28.
- Laborit H. L'anesthésie facilitée par les synergies médicamenteuses. Paris: Masson et Cie, Editeurs, 1951.
- Lipska BK, Weinberger DR. To model a psychiatric disorder in animals: schizophrenia as a reality test. *Neuropsychopharmacology.* 2000 Sep;23(3):223-39.
- Martinez D, Slifstein M, Broft A, Mawlawi O, Hwang DR, Huang Y, Cooper T, Kegeles L, Zarah E, Abi-Dargham A, Haber SN, Laruelle M. Imaging human mesolimbic dopamine transmission with positron emission tomography. Part II: amphetamine-induced dopamine release in the functional subdivisions of the striatum. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2003 Mar;23(3):285-300.
- McGrath J, Saha S, Chant D, Welham J. Schizophrenia: a concise overview of incidence, prevalence, and mortality. *Epidemiol Rev.* 2008;30:67-76.
- Meltzer HY. The mechanism of action of novel antipsychotics drugs. *Schizophrenia Bulletin,* 1991, 17 : 263-287.
- Merenlender-Wagner A, Shemer Z, Touloumi O, Lagoudaki R, Giladi E, Andrieux A, Grigoriadis NC, Gozes I. New horizons in schizophrenia treatment: autophagy protection is coupled with behavioral improvements in a mouse model of schizophrenia. *Autophagy.* 2014;10(12):2324-32.
- Millan MJ, Andrieux A, Bartzokis G, Cadenhead K, Dazzan P, Fusar-Poli P, Gallinat J, Giedd J, Grayson DR, Heinrichs M, Kahn R, Krebs MO, Leboyer M, Lewis D, Marin O, Marin P, Meyer-Lindenberg A, McGorry P, McGuire P, Owen

- MJ, Patterson P, Sawa A, Spedding M, Uhlhaas P, Vaccarino F, Wahlestedt C, Weinberger D. Altering the course of schizophrenia: progress and perspectives. *Nat Rev Drug Discov.* 2016 Jul;15(7):485-515.
- Mirnic K, Middleton FA, Lewis DA, Levitt P. Analysis of complex brain disorders with gene expression microarrays: schizophrenia as a disease of the synapse. *Trends Neurosci.* 2001 Aug;24(8):479-86.
- Miyamoto S, Duncan GE, Marx CE, Lieberman JA. Treatments for schizophrenia: a critical review of pharmacology and mechanisms of action of antipsychotic drugs. *Mol Psychiatry.* 2005 Jan;10(1):79-104.
- Newcomer JW. Second-generation (atypical) antipsychotics and metabolic effects: a comprehensive literature review. *CNS Drugs.* 2005;19 Suppl 1:1-93.
- Orzelska-Górka J, Mikulska J, Wiszniewska A, Biała G. New Atypical Antipsychotics in the Treatment of Schizophrenia and Depression. *Int J Mol Sci.* 2022 Sep 13;23(18):10624.
- Owen MJ, Williams NM, O'Donovan MC. The molecular genetics of schizophrenia: new findings promise new insights. *Mol Psychiatry.* 2004 Jan;9(1):14-27.
- Powell KJ, Hori SE, Leslie R, Andrieux A, Schellinck H, Thorne M, Robertson GS. Cognitive impairments in the STOP null mouse model of schizophrenia. *Behav Neurosci.* 2007 Oct;121(5):826-35.
- Seeman MV, Lang M. The role of estrogens in schizophrenia gender differences. *Schizophr Bull.* 1990;16(2):185-94.
- Shimizu H, Iwayama Y, Yamada K, Toyota T, Minabe Y, Nakamura K, Nakajima M, Hattori E, Mori N, Osumi N, Yoshikawa T. Genetic and expression analyses of the STOP (MAP6) gene in schizophrenia. *Schizophr Res.* 2006 Jun;84(2-3):244-52.
- Silva-Gomez AB, Bermudez M, Quirion R, Srivastava LK, Picazo O, Flores G. Comparative behavioral changes between male and female postpubertal rats following neonatal excitotoxic lesions of the ventral hippocampus. *Brain Res.* 2003 May 30;973(2):285-92.
- Warner, R. Recovery from schizophrenia: Psychiatry and political economy. Boston: Routedledge & Kegan Paul. 1985.
- Uhlhaas P, Vaccarino F, Wahlestedt C, Weinberger D. Altering the course of schizophrenia: progress and perspectives. *Nat Rev Drug Discov.* 2016 Jul;15(7):485-515.

## **9.2. Activités de recherche pendant le post-doctorat**

- Aggarwal S, Snaidero N, Pähler G, Frey S, Sánchez P, Zweckstetter M, Janshoff A, Schneider A, Weil MT, Schaap IA, Görlich D, Simons M. Myelin membrane assembly is driven by a phase transition of myelin basic proteins into a cohesive protein meshwork. *PLoS Biol.* 2013;11(6):e1001577.
- Almeida RG, Lyons DA. On Myelinated Axon Plasticity and Neuronal Circuit Formation and Function. *J Neurosci.* 2017 Oct 18;37(42):10023-10034.
- Anastassiou CA, Perin R, Markram H, Koch C. Ephaptic coupling of cortical neurons. *Nat Neurosci.* 2011 Feb;14(2):217-23.
- Ben Hassen W, Bégou M, Traore A, Ben Moussa A, Boehm N, Ghandour MS, Renou JP, Boespflug-Tanguy O, Bonny JM. Characterisation of spinal cord in a mouse model of spastic paraplegia related to abnormal axono-myelin interactions by in vivo quantitative MRI. *Neuroimage.* 2009 May 15 ;46(1) :1-9.
- Bergles DE, Richardson WD. Oligodendrocyte Development and Plasticity. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2015 Aug 20;8(2):a020453.
- Boespflug-Tanguy O, Labauge P, Fogli A, Vaurs-Barriere C. Genes involved in leukodystrophies: a glance at glial functions. *Curr Neurol Neurosci Rep.* 2008 May;8(3):217-29.
- Bongarzone ER, Campagnoni CW, Kampf K, Jacobs EC, Handley VW, Schonmann V, Campagnoni AT. Identification of a new exon in the myelin proteolipid protein gene encoding novel protein isoforms that are restricted to the somata of oligodendrocytes and neurons. *J Neurosci.* 1999 Oct 1;19(19):8349-57.

- Bordet T, Berna P, Abitbol JL, Pruss RM. Olesoxime (TRO19622): A Novel Mitochondrial-Targeted Neuroprotective Compound. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2010 Jan 28;3(2):345-368.
- Bordet T, Buisson B, Michaud M, Drouot C, Galéa P, Delaage P, Akentieva NP, Evers AS, Covey DF, Ostuni MA, Lacapère JJ, Massaad C, Schumacher M, Steidl EM, Maux D, Delaage M, Henderson CE, Pruss RM. Identification and characterization of cholest-4-en-3-one, oxime (TRO19622), a novel drug candidate for amyotrophic lateral sclerosis. *J Pharmacol Exp Ther*. 2007;322, 709-20.
- Bordet T, Buisson B, Michaud M, Abitbol JL, Marchand F, Grist J, Andriambelosen E, Malcangio M, Pruss RM. Specific antinociceptive activity of cholest-4-en-3-one, oxime (TRO19622) in experimental models of painful diabetic and chemotherapy-induced neuropathy. *J Pharmacol Exp Ther*. 2008;326, 623-32.
- Bottelbergs A, Verheijden S, Hulshagen L, Gutmann DH, Goebbels S, Nave KA, Kassmann C, Baes M. Axonal integrity in the absence of functional peroxisomes from projection neurons and astrocytes. *Glia*. 2010 Oct;58(13):1532-43.
- Bradbury AM, Ream MA. Recent Advancements in the Diagnosis and Treatment of Leukodystrophies. *Semin Pediatr Neurol*. 2021 Apr;37:100876. doi: 10.1016/j.spen.2021.100876.
- Cailloux F, Gauthier-Barichard F, Mimault C, Isabelle V, Courtois V, Giraud G, Dastugue B, Boespflug-Tanguy O. Genotype-phenotype correlation in inherited brain myelination defects due to proteolipid protein gene mutations. *Clinical European Network on Brain Dysmyelinating Disease. Eur J Hum Genet*. 2000 Nov;8(11):837-45.
- Cohen CCH, Popovic MA, Klooster J, Weil MT, Möbius W, Nave KA, Kole MHP. Saltatory Conduction along Myelinated Axons Involves a Periaxonal Nanocircuit. *Cell*. 2020 Jan 23;180(2):311-322.
- Court FA, Coleman MP. Mitochondria as a central sensor for axonal degenerative stimuli. *Trends Neurosci*. 2012;35, 364-72.
- Cuddon PA, Lipsitz D, Duncan ID. Myelin mosaicism and brain plasticity in heterozygous females of a canine X-linked trait. *Ann Neurol*. 1998 Nov;44(5):771-9.
- Dautigny A, Mattei MG, Morello D, Alliel PM, Pham-Dinh D, Amar L, Arnaud D, Simon D, Mattei JF, Guenet JL, et al. The structural gene coding for myelin-associated proteolipid protein is mutated in jimpy mice. *Nature*. 1986 Jun 26-Jul 2;321(6073):867-9.
- Edgar JM, Anderson TJ, Dickinson PJ, Barrie JA, McCulloch MC, Nave KA, Griffiths IR. Survival of, and competition between, oligodendrocytes expressing different alleles of the Plp gene. *J Cell Biol*. 2002 Aug 19;158(4):719-29.
- Elitt MS, Barbar L, Shick HE, Powers BE, Maeno-Hikichi Y, Madhavan M, Allan KC, Nawash BS, Gevorgyan AS, Hung S, Nevin ZS, Olsen HE, Hitomi M, Schlatzer DM, Zhao HT, Swayze A, LePage DF, Jiang W, Conlon RA, Rigo F, Tesar PJ. Suppression of proteolipid protein rescues Pelizaeus-Merzbacher disease. *Nature*. 2020 Sep;585(7825):397-403.
- Eppelen DB, Prukop T, Nientiedt T, Albrecht P, Arlt FA, Stassart RM, Kassmann CM, Methner A, Nave KA, Werner HB, Sereda MW. Curcumin therapy in a Plp1 transgenic mouse model of Pelizaeus-Merzbacher disease. *Ann Clin Transl Neurol*. 2015 Aug;2(8):787-96.
- Eymard-Pierre E, Yamanaka K, Haeussler M, Kress W, Gauthier-Barichard F, Combes P, Cleveland DW, Boespflug-Tanguy O. Novel missense mutation in ALS2 gene results in infantile ascending hereditary spastic paralysis. *Ann Neurol*. 2006 Jun;59(6):976-80.
- Fairbanks CA. Spinal delivery of analgesics in experimental models of pain and analgesia. *Adv Drug Deliv Rev*. 2003 Aug 28;55(8):1007-41.
- Fogli A, Dionisi-Vici C, Deodato F, Bartuli A, Boespflug-Tanguy O, Bertini E. A severe variant of childhood ataxia with central hypomyelination/vanishing white matter leukoencephalopathy related to EIF21B5 mutation. *Neurology*. 2002 Dec 24;59(12):1966-8.
- Fünfschilling U, Supplie LM, Mahad D, Boretius S, Saab AS, Edgar J, Brinkmann BG, Kassmann CM, Tzvetanova ID, Möbius W, Diaz F, Meijer D, Suter U, Hamprecht B, Sereda MW, Moraes CT, Frahm J, Goebbels S, Nave KA. Glycolytic oligodendrocytes maintain myelin and long-term axonal integrity. *Nature*. 2012 Apr 29;485(7399):517-21.

- Garbern JY, Cambi F, Tang XM, Sima AA, Vallat JM, Bosch EP, Lewis R, Shy M, Sohi J, Kraft G, Chen KL, Joshi I, Leonard DG, Johnson W, Raskind W, Dlouhy SR, Pratt V, Hodes ME, Bird T, Kamholz J. Proteolipid protein is necessary in peripheral as well as central myelin. *Neuron*. 1997 Jul;19(1):205-18.
- Garbern JY, Yool DA, Moore GJ, Wilds IB, Faulk MW, Klugmann M, Nave KA, Siermans EA, van der Knaap MS, Bird TD, Shy ME, Kamholz JA, Griffiths IR. Patients lacking the major CNS myelin protein, proteolipid protein 1, develop length-dependent axonal degeneration in the absence of demyelination and inflammation. *Brain*. 2002 Mar;125(Pt 3):551-61.
- Gilles FH, Leviton A. Neonatal white matter damage and the fetal inflammatory response. *Semin Fetal Neonatal Med*. 2020 Aug;25(4):101111.
- Gobron S, Creveaux I, Meiniel R, Didier R, Herbet A, Bamdad M, El Bitar F, Dastugue B and Meiniel A (2000) Subcommissural organ/Reissner's fiber complex: characterization of SCO-spondin, a glycoprotein with potent activity on neurite outgrowth. *Glia* 32:177-191.
- Grace AA. Phasic versus tonic dopamine release and the modulation of dopamine system responsivity: a hypothesis for the etiology of schizophrenia. *Neuroscience*. 1991;41(1):1-24.
- Griffiths I, Klugmann M, Anderson T, Yool D, Thomson C, Schwab MH, Schneider A, Zimmermann F, McCulloch M, Nadon N, Nave KA. Axonal swellings and degeneration in mice lacking the major proteolipid of myelin. *Science*. 1998 Jun 5;280(5369):1610-3.
- Gruenenfelder FI, McLaughlin M, Griffiths IR, Garbern J, Thomson G, Kuzman P, Barrie JA, McCulloch ML, Penderis J, Stassart R, Nave KA, Edgar JM. Neural stem cells restore myelin in a demyelinating model of Pelizaeus-Merzbacher disease. *Brain*. 2020 May 1;143(5):1383-1399.
- Gupta N, Henry RG, Strober J, Kang SM, Lim DA, Buccini M, Caverzasi E, Gaetano L, Mandelli ML, Ryan T, Perry R, Farrell J, Jeremy RJ, Ulman M, Huhn SL, Barkovich AJ, Rowitch DH. Neural stem cell engraftment and myelination in the human brain. *Sci Transl Med*. 2012 Oct 10;4(155):155ra137. doi: 10.1126/scitranslmed.3004373.
- Gupta N, Henry RG, Kang SM, Strober J, Lim DA, Ryan T, Perry R, Farrell J, Ulman M, Rajalingam R, Gage A, Huhn SL, Barkovich AJ, Rowitch DH. Long-Term Safety, Immunologic Response, and Imaging Outcomes following Neural Stem Cell Transplantation for Pelizaeus-Merzbacher Disease. *Stem Cell Reports*. 2019 Aug 13;13(2):254-261.
- Hartline DK, Colman DR. Rapid conduction and the evolution of giant axons and myelinated fibers. *Curr Biol*. 2007 Jan 9;17(1):R29-35.
- Inoue K, Tanaka H, Scaglia F, Araki A, Shaffer LG, Lupski JR. Compensating for central nervous system dysmyelination: females with a proteolipid protein gene duplication and sustained clinical improvement. *Ann Neurol*. 2001 Dec;50(6):747-54.
- Inoue K. PLP1-related inherited dysmyelinating disorders: Pelizaeus-Merzbacher disease and spastic paraplegia type 2. *Neurogenetics*. 2005 Feb;6(1):1-16.
- Kaindl AM, Favrais G, Gressens P. Molecular mechanisms involved in injury to the preterm brain. *J Child Neurol*. 2009 Sep;24(9):1112-8.
- Kaller MS, Lazari A, Blanco-Duque C, Sampaio-Baptista C, Johansen-Berg H. Myelin plasticity and behaviour-connecting the dots. *Curr Opin Neurobiol*. 2017 Dec;47:86-92.
- Kassmann CM, Lappe-Siefke C, Baes M, Brügger B, Mildner A, Werner HB, Natt O, Michaelis T, Prinz M, Frahm J, Nave KA. Axonal loss and neuroinflammation caused by peroxisome-deficient oligodendrocytes. *Nat Genet*. 2007 Aug;39(8):969-76.
- Khalaf G, Mattern C, Begou M, Boespflug-Tanguy O, Massaad C, Massaad-Massade L. Mutation of Proteolipid Protein 1 Gene: From Severe Hypomyelinating Leukodystrophy to Inherited Spastic Paraplegia. *Biomedicines*. 2022 Jul 15;10(7):1709. doi: 10.3390/biomedicines10071709.
- Klugmann M, Schwab MH, Puhlhofer A, Schneider A, Zimmermann F, Griffiths IR, Nave KA. Assembly of CNS myelin in the absence of proteolipid protein. *Neuron*. 1997 Jan;18(1):59-70.
- Kottmeier R, Bittern J, Schoofs A, Scheiwe F, Matzat T, Pankratz M, Klämbt C. Wrapping glia regulates neuronal signaling speed and precision in the peripheral nervous system of *Drosophila*. *Nat Commun*. 2020 Sep 8;11(1):4491. doi: 10.1038/s41467-020-18291-1.

- Lee Y, Morrison BM, Li Y, Lengacher S, Farah MH, Hoffman PN, Liu Y, Tsingalia A, Jin L, Zhang PW, Pellerin L, Magistretti PJ, Rothstein JD. Oligodendroglia metabolically support axons and contribute to neurodegeneration. *Nature*. 2012 Jul 26;487(7408):443-8.
- Li F, Sami A, Noristani HN, Slattery K, Qiu J, Groves T, Wang S, Veerasammy K, Chen YX, Morales J, Haynes P, Sehgal A, He Y, Li S, Song Y. Glial Metabolic Rewiring Promotes Axon Regeneration and Functional Recovery in the Central Nervous System. *Cell Metab*. 2020 Nov 3;32(5):767-785.e7.
- Lin MT, Beal MF. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature*. 2006;443, 787-95.
- Magalon K, Zimmer C, Cayre M, Khaldi J, Bourbon C, Robles I, Tardif G, Viola A, Pruss RM, Bordet T, Durbec P. Olesoxime accelerates myelination and promotes repair in models of demyelination. *Ann Neurol*. 2012 Feb;71(2):213-26.
- Mallon BS, Shick HE, Kidd GJ, Macklin WB. Proteolipid promoter activity distinguishes two populations of NG2-positive cells throughout neonatal cortical development. *J Neurosci*. 2002 Feb 1;22(3):876-85.
- Mao K, Zhang G. The role of PARP1 in neurodegenerative diseases and aging. *FEBS J*. 2022 Apr;289(8):2013-2024.
- Marble M, Voeller KS, May MM, Stevenson RE, Schwartz CE, Simensen RJ. Pelizaeus-Merzbacher syndrome: neurocognitive function in a family with carrier manifestations. *Am J Med Genet A*. 2007 Jul 1;143A(13):1442-7.
- Marshall-Phelps KLH, Kegel L, Baraban M, Ruhwedel T, Almeida RG, Rubio-Brotans M, Klingseisen A, Benito-Kwiecinski SK, Early JJ, Bin JM, Suminaite D, Livesey MR, Möbius W, Poole RJ, Lyons DA. Neuronal activity disrupts myelinated axon integrity in the absence of NKCC1b. *J Cell Biol*. 2020 Jul 6;219(7):e201909022. doi: 10.1083/jcb.201909022.
- Marteyn A, Sarrazin N, Yan J, Bachelin C, Deboux C, Santin MD, Gressens P, Zujovic V, Baron-Van Evercooren A. Modulation of the Innate Immune Response by Human Neural Precursors Prevails over Oligodendrocyte Progenitor Remyelination to Rescue a Severe Model of Pelizaeus-Merzbacher Disease. *Stem Cells*. 2016 Apr;34(4):984-96.
- Masson MA, Nait-Oumesmar B. Emerging concepts in oligodendrocyte and myelin formation, inputs from the zebrafish model. *Glia*. 2023 Jan 16. doi: 10.1002/glia.24336. Epub ahead of print.
- Mekhaeil M, Dev KK, Conroy MJ. Existing Evidence for the Repurposing of PARP-1 Inhibitors in Rare Demyelinating Diseases. *Cancers (Basel)*. 2022 Jan 29;14(3):687. doi: 10.3390/cancers14030687.
- Meschkat M, Steyer AM, Weil MT, Kusch K, Jahn O, Piepkorn L, Agüi-Gonzalez P, Phan NTN, Ruhwedel T, Sadowski B, Rizzoli SO, Werner HB, Ehrenreich H, Nave KA, Möbius W. White matter integrity in mice requires continuous myelin synthesis at the inner tongue. *Nat Commun*. 2022 Mar 4;13(1):1163. doi: 10.1038/s41467-022-28720-y.
- Moffett JR, Ross B, Arun P, Madhavarao CN, Namboodiri AM. N-Acetylaspartate in the CNS: from neurodiagnostics to neurobiology. *Prog Neurobiol*. 2007 Feb;81(2):89-131.
- Monje M. Myelin Plasticity and Nervous System Function. *Annu Rev Neurosci*. 2018 Jul 8;41:61-76.
- Morris JA, Kandpal G, Ma L, Austin CP. DISC1 (Disrupted-In-Schizophrenia 1) is a centrosome-associated protein that interacts with MAP1A, MIPT3, ATF4/5 and NUDEL: regulation and loss of interaction with mutation. *Hum Mol Genet*. 2003 Jul 1;12(13):1591-608.
- Mukherjee C, Kling T, Russo B, Miebach K, Kess E, Schifferer M, Pedro LD, Weikert U, Fard MK, Kannaiyan N, Rossner M, Aicher ML, Goebbels S, Nave KA, Krämer-Albers EM, Schneider A, Simons M. Oligodendrocytes Provide Antioxidant Defense Function for Neurons by Secreting Ferritin Heavy Chain. *Cell Metab*. 2020 Aug 4;32(2):259-272.e10.
- Nance MA, Boyadjiev S, Pratt VM, Taylor S, Hodes ME, Dlouhy SR. Adult-onset neurodegenerative disorder due to proteolipid protein gene mutation in the mother of a man with Pelizaeus-Merzbacher disease. *Neurology*. 1996 Nov;47(5):1333-5.
- Nave KA, Werner HB. Ensheathment and Myelination of Axons: Evolution of Glial Functions. *Annu Rev Neurosci*. 2021 Jul 8;44:197-219.
- Neusch C, Rozengurt N, Jacobs RE, Lester HA, Kofuji P. Kir4.1 potassium channel subunit is crucial for oligodendrocyte development and in vivo myelination. *J Neurosci*. 2001 Aug 1;21(15):5429-38.

- Petit B, Giraudet F, Béchon C, Bardin L, Avan P, Boespflug-Tanguy O, Bégou M. Mice with a deletion of the major central myelin protein exhibit hypersensitivity to noxious thermal stimuli: involvement of central sensitization. *Neurobiol Dis.* 2014 May;65:55-68.
- Phillips RJ. Jimpy, a new totally sexlinked gene in the house mouse. *Z Indukt Abstamm Vererbungslehre.* 1954;86(3):322-6.
- Popko B, Puckett C, Lai E, Shine HD, Readhead C, Takahashi N, Hunt SW 3rd, Sidman RL, Hood L. Myelin deficient mice: expression of myelin basic protein and generation of mice with varying levels of myelin. *Cell.* 1987 Feb 27;48(4):713-21.
- Prukop T, Epplen DB, Nientiedt T, Wichert SP, Fledrich R, Stassart RM, Rossner MJ, Edgar JM, Werner HB, Nave KA, Sereda MW. Progesterone antagonist therapy in a Pelizaeus-Merzbacher mouse model. *Am J Hum Genet.* 2014 Apr 3;94(4):533-46.
- Owen MJ, O'Donovan MC, Harrison PJ. Schizophrenia: a genetic disorder of the synapse? *BMJ.* 2005 Jan 22;330(7484):158-9.
- Readhead C, Schneider A, Griffiths I, Nave KA. Premature arrest of myelin formation in transgenic mice with increased proteolipid protein gene dosage. *Neuron.* 1994 Mar;12(3):583-95.
- Ruiz M, Bégou M, Launay N, Ranea-Robles P, Bianchi P, López-Erauskin J, Morató L, Guilera C, Petit B, Vaurs-Barriere C, Guéret-Gonthier C, Bonnet-Dupeyron MN, Fourcade S, Auwerx J, Boespflug-Tanguy O, Pujol A. Oxidative stress and mitochondrial dynamics malfunction are linked in Pelizaeus-Merzbacher disease. *Brain Pathol.* 2018 Sep;28(5):611-630.
- Saab AS, Nave KA. Myelin dynamics: protecting and shaping neuronal functions. *Curr Opin Neurobiol.* 2017 Dec;47:104-112.
- Saugier-Verber, P.; Munnich, A.; Bonneau, D.; Rozet, J.-M.; Le Merrer, M.; Gil, R.; Boespflug-Tanguy, O. X-linked spastic paraplegia and Pelizaeus-Merzbacher disease are allelic disorders at the proteolipid protein locus. *Nat. Genet.* 1994, 6, 257-262.
- Sidman RL, Dickie MM, Appel SH. Mutant mice (quaking and jimpy) with deficient myelination in the central nervous system. *Science.* 1964 Apr 17;144(3616):309-11.
- Stadelmann C, Timmler S, Barrantes-Freer A, Simons M. Myelin in the Central Nervous System: Structure, Function, and Pathology. *Physiol Rev.* 2019 Jul 1;99(3):1381-1431.
- Summerton J, Weller D. Morpholino antisense oligomers: design, preparation, and properties. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 1997 Jun;7(3):187-95.
- Summerton JE. Morpholino, siRNA, and S-DNA compared: impact of structure and mechanism of action on off-target effects and sequence specificity. *Curr Top Med Chem.* 2007;7(7):651-60.
- Thakurela S, Garding A, Jung RB, Müller C, Goebbels S, White R, Werner HB, Tiwari VK. The transcriptome of mouse central nervous system myelin. *Sci Rep.* 2016 May 13;6:25828.
- Vaurs-Barriere C, Wong K, Weibel TD, Abu-Asab M, Weiss MD, Kaneshi CR, Mixon TH, Bonavita S, Creveaux I, Heiss JD, Tsokos M, Goldin E, Quarles RH, Boespflug-Tanguy O, Schiffmann R. Insertion of mutant proteolipid protein results in missorting of myelin proteins. *Ann Neurol.* 2003 Dec;54(6):769-80. doi: 10.1002/ana.10762. Erratum in: *Ann Neurol.* 2004 Jan;55(1):149-50.
- Wang E, Dimova N, Sperle K, Huang Z, Lock L, McCulloch MC, Edgar JM, Hobson GM, Cambi F. Deletion of a splicing enhancer disrupts PLP1/DM20 ratio and myelin stability. *Exp Neurol.* 2008 Dec;214(2):322-30.
- Weber JJ, Clemensson LE, Schiöth HB, Nguyen HP. Olesoxime in neurodegenerative diseases: Scrutinising a promising drug candidate. *Biochem Pharmacol.* 2019 Oct;168:305-318.
- Werner HB, Kuhlmann K, Shen S, Uecker M, Schardt A, Dimova K, Orfaniotou F, Dhaunchak A, Brinkmann BG, Möbius W, Guarente L, Casaccia-Bonnel P, Jahn O, Nave KA. Proteolipid protein is required for transport of sirtuin 2 into CNS myelin. *J Neurosci.* 2007 Jul 18;27(29):7717-30.
- Wolf NI, Ffrench-Constant C, van der Knaap MS. Hypomyelinating leukodystrophies - unravelling myelin biology. *Nat Rev Neurol.* 2021 Feb;17(2):88-103. Cohen CCH, Popovic MA, Klooster J, Weil MT, Möbius W, Nave KA, Kole

- MHP. Saltatory Conduction along Myelinated Axons Involves a Periaxonal Nanocircuit. *Cell*. 2020 Jan 23;180(2):311-322.e15.
- Woodward K, Kirtland K, Dlouhy S, Raskind W, Bird T, Malcolm S, Abeliovich D. X inactivation phenotype in carriers of Pelizaeus-Merzbacher disease: skewed in carriers of a duplication and random in carriers of point mutations. *Eur J Hum Genet*. 2000 Jun;8(6):449-54.
- Yeung MS, Zdunek S, Bergmann O, Bernard S, Salehpour M, Alkass K, Perl S, Tisdale J, Possnert G, Brundin L, Druid H, Frisé J. Dynamics of oligodendrocyte generation and myelination in the human brain. *Cell*. 2014 Nov 6;159(4):766-74.
- Yool D, Montague P, McLaughlin M, McCulloch MC, Edgar JM, Nave KA, Davies RW, Griffiths IR, McCallion AS. Phenotypic analysis of mice deficient in the major myelin protein MOBP, and evidence for a novel Mobp isoform. *Glia*. 2002 Sep;39(3):256-67.
- Yoshikawa F, Sato Y, Tohyama K, Akagi T, Furuse T, Sadakata T, Tanaka M, Shinoda Y, Hashikawa T, Itohara S, Sano Y, Ghandour MS, Wakana S, Furuichi T. Mammalian-Specific Central Myelin Protein Opalin Is Redundant for Normal Myelination: Structural and Behavioral Assessments. *PLoS One*. 2016 Nov 17;11(11):e0166732. doi: 10.1371/journal.pone.0166732.
- Zalc B, Colman DR. Origins of vertebrate success. *Science*. 2000 Apr 14;288(5464):271-2.

### **9.3. Activités de recherche depuis le recrutement comme maitre de conférences**

- Ascherio A, Munger KL, Simon KC. Vitamin D and multiple sclerosis. *Lancet Neurol*. 2010 Jun;9(6):599-612.
- Baecher-Allan C, Kaskow BJ, Weiner HL. Multiple Sclerosis: Mechanisms and Immunotherapy. *Neuron*. 2018 Feb 21;97(4):742-768.
- Bittner S, Afzali AM, Wiendl H, Meuth SG. Myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG35-55) induced experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) in C57BL/6 mice. *J Vis Exp*. 2014 Apr 15;(86):51275.
- Bellmann-Strobl J, Paul F, Wuerfel J, Dörr J, Infante-Duarte C, Heidrich E, Körtgen B, Brandt A, Pfüller C, Radbruch H, Rust R, Siffrin V, Aktas O, Heesen C, Faiss J, Hoffmann F, Lorenz M, Zimmermann B, Groppa S, Wernecke KD, Zipp F. Epigallocatechin Gallate in Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis: A Randomized, Placebo-Controlled Trial. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*. 2021 Mar 24;8(3):e981.
- Brinkmann V, Billich A, Baumruker T, Heining P, Schmouder R, Francis G, Aradhye S, Burtin P. Fingolimod (FTY720): discovery and development of an oral drug to treat multiple sclerosis. *Nat Rev Drug Discov*. 2010 Nov;9(11):883-97.
- Cai F, Liu S, Lei Y, Jin S, Guo Z, Zhu D, Guo X, Zhao H, Niu X, Xi Y, Wang Z, Chen G. Epigallocatechin-3 gallate regulates macrophage subtypes and immunometabolism to ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis. *Cell Immunol*. 2021 Oct;368:104421. doi: 10.1016/j.cellimm.2021.104421.
- Charcot JM. Histologie de la sclérose en plaques. *Gaz Hop (Paris)* (1868) 41: 554-559.
- Charradi K, Mahmoudi M, Bedhiafi T, Jebari K, El May MV, Limam F, Aouani E. Safety evaluation, anti-oxidative and anti-inflammatory effects of subchronically dietary supplemented high dosing grape seed powder (GSP) to healthy rat. *Biomed Pharmacother*. 2018 Nov;107:534-546.
- Cobley JN, Fiorello ML, Bailey DM. 13 reasons why the brain is susceptible to oxidative stress. *Redox Biol*. 2018 May;15:490-503.
- Compston A, Coles A. Multiple sclerosis. *Lancet*. 2008 Oct 25;372(9648):1502-17.
- Constantinescu CS, Farooqi N, O'Brien K, Gran B. Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) as a model for multiple sclerosis (MS). *Br J Pharmacol*. 2011 Oct;164(4):1079-106.
- Démsthènes A, Sion B, Giraudet F, Moisset X, Daulhac L, Eschalié A, Bégou M. In-Depth Characterization of Somatic and Orofacial Sensitive Dysfunctions and Interfering-Symptoms in a Relapsing-Remitting Experimental Autoimmune Encephalomyelitis Mouse Model. *Front Neurol*. 2022 Jan 17;12:789432. doi: 10.3389/fneur.2021.789432.

- Denic A, Wootla B, Pirko I, Mangalam A. Chapter 11 - Pathophysiology of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis, Editor(s): Alireza Minagar, Multiple Sclerosis, Academic Press, 2016
- Dendrou CA, Fugger L, Friese MA. Immunopathology of multiple sclerosis. *Nat Rev Immunol*. 2015 Sep 15;15(9):545-58.
- Dong Y, D'Mello C, Pinsky W, Lozinski BM, Kaushik DK, Ghorbani S, Moezzi D, Brown D, Melo FC, Zandee S, Vo T, Prat A, Whitehead SN, Yong VW. Oxidized phosphatidylcholines found in multiple sclerosis lesions mediate neurodegeneration and are neutralized by microglia. *Nat Neurosci*. 2021 Apr;24(4):489-503.
- Doolen S, Iannitti T, Donahue RR, Shaw BC, Grachen CM, Taylor BK. Fingolimod reduces neuropathic pain behaviors in a mouse model of multiple sclerosis by a sphingosine-1 phosphate receptor 1-dependent inhibition of central sensitization in the dorsal horn. *Pain*. 2018 Feb;159(2):224-238.
- Dutta R, Trapp BD. Relapsing and progressive forms of multiple sclerosis: insights from pathology. *Curr Opin Neurol*. 2014;27(3):271-8.
- Fancy SP, Chan JR, Baranzini SE, Franklin RJ, Rowitch DH. Myelin regeneration: a recapitulation of development? *Annu Rev Neurosci*. 2011;34:21-43.
- Filippi M, Bar-Or A, Piehl F, Preziosa P, Solari A, Vukusic S, Rocca MA. Multiple sclerosis. *Nat Rev Dis Primers*. 2018 Nov 8;4(1):43. doi: 10.1038/s41572-018-0041-4.
- Foulon S, Maura G, Dalichampt M, Alla F, Debouverie M, Moreau T, Weill A. Prevalence and mortality of patients with multiple sclerosis in France in 2012: a study based on French health insurance data. *J Neurol*. 2017 Jun;264(6):1185-1192.
- Franklin RJM, Ffrench-Constant C. Regenerating CNS myelin - from mechanisms to experimental medicines. *Nat Rev Neurosci*. 2017 Nov 16;18(12):753-769.
- Friese MA, Schattling B, Fugger L. Mechanisms of neurodegeneration and axonal dysfunction in multiple sclerosis. *Nat Rev Neurol*. 2014 Apr;10(4):225-38.
- Giacometti J, Grubić-Kezele T. Olive Leaf Polyphenols Attenuate the Clinical Course of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis and Provide Neuroprotection by Reducing Oxidative Stress, Regulating Microglia and SIRT1, and Preserving Myelin Integrity. *Oxid Med Cell Longev*. 2020 Jul 30;2020:6125638. doi: 10.1155/2020/6125638.
- Gupta M, Dey S, Marbaniang D, Pal P, Ray S, Mazumder B. Grape seed extract: having a potential health benefits. *J Food Sci Technol*. 2020 Apr;57(4):1205-1215.
- Jones QR, Warford J, Rupasinghe HP, Robertson GS. Target-based selection of flavonoids for neurodegenerative disorders. *Trends Pharmacol Sci*. 2012 Nov;33(11):602-10.
- Kadri S, El Ayed M, Mabrouk M, Limam F, Elkahoui S, Aouani E, Mokni M. Characterization, anti-oxidative effect of grape seed powder and in silico affinity profiling of polyphenolic and extra-phenolic compounds for calpain inhibition. *J Pharm Biomed Anal*. 2019 Feb 5;164:365-372. doi: 10.1016/j.jpba.2018.11.003.
- Haider L, Fischer MT, Frischer JM, Bauer J, Höftberger R, Botond G, Esterbauer H, Binder CJ, Witztum JL, Lassmann H. Oxidative damage in multiple sclerosis lesions. *Brain*. 2011 Jul;134(Pt 7):1914-24.
- Hauser SL, Oksenberg JR. The neurobiology of multiple sclerosis: genes, inflammation, and neurodegeneration. *Neuron*. 2006 Oct 5;52(1):61-76.
- Heming M, Wiendl H. Learning multiple sclerosis immunopathogenesis from anti-CD20 therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2023 Feb 7;120(6):e2221544120. doi: 10.1073/pnas.2221544120.
- Hemmer B, Archelos JJ, Hartung HP. New concepts in the immunopathogenesis of multiple sclerosis. *Nat Rev Neurosci*. 2002 Apr;3(4):291-301.
- Hollenbach JA, Oksenberg JR. The immunogenetics of multiple sclerosis: A comprehensive review. *J Autoimmun*. 2015;64:13-25.
- International Multiple Sclerosis Genetics Consortium; Wellcome Trust Case Control Consortium 2; Sawcer S, Hellenthal G, Pirinen M, Spencer CC, Patsopoulos NA, et al. Genetic risk and a primary role for cell-mediated immune mechanisms in multiple sclerosis. *Nature*. 2011 Aug 10;476(7359):214-9. International Multiple Sclerosis Genetics Consortium. Multiple sclerosis genomic map implicates peripheral immune cells and microglia in susceptibility. *Science*. 2019 Sep 27;365(6460):eaav7188.

- Khan N, Smith MT. Multiple sclerosis-induced neuropathic pain: pharmacological management and pathophysiological insights from rodent EAE models. *Inflammopharmacology*. 2014 Feb;22(1):1-22.
- Khan N, Woodruff TM, Smith MT. Establishment and characterization of an optimized mouse model of multiple sclerosis-induced neuropathic pain using behavioral, pharmacologic, histologic and immunohistochemical methods. *Pharmacol Biochem Behav*. 2014 Nov;126:13-27.
- Khan N, Gordon R, Woodruff TM, Smith MT. Antiallodynic effects of alpha lipoic acid in an optimized RR-EAE mouse model of MS-neuropathic pain are accompanied by attenuation of upregulated BDNF-TrkB-ERK signaling in the dorsal horn of the spinal cord. *Pharmacol Res Perspect*. 2015 Jun;3(3):e00137. doi: 10.1002/prp2.137.
- Kipp M, van der Star B, Vogel DY, Puentes F, van der Valk P, Baker D, Amor S. Experimental in vivo and in vitro models of multiple sclerosis: EAE and beyond. *Mult Scler Relat Disord*. 2012 Jan;1(1):15-28.
- Köhler W, Engelen M, Eichler F, Lachmann R, Fatemi A, Sampson J, Salsano E, Gamez J, Molnar MJ, Pascual S, Rovira M, Vilà A, Pina G, Martín-Ugarte I, Mantilla A, Pizcueta P, Rodríguez-Pascau L, Traver E, Vilalta A, Pascual M, Martinell M, Meya U, Mochel F; ADVANCE Study Group. Safety and efficacy of leriglitazone for preventing disease progression in men with adrenomyeloneuropathy (ADVANCE): a randomised, double-blind, multi-centre, placebo-controlled phase 2-3 trial. *Lancet Neurol*. 2023 Feb;22(2):127-136.
- Lassmann H, Brück W, Lucchinetti CF. The immunopathology of multiple sclerosis: an overview. *Brain Pathol*. 2007 Apr;17(2):210-8.
- Lassmann H. Targets of therapy in progressive MS. *Mult Scler*. 2017 Oct;23(12):1593-1599.
- Linker RA, Kieseier BC, Gold R. Identification and development of new therapeutics for multiple sclerosis. *Trends Pharmacol Sci* 2008 ; 29 : 558-65.
- López-Erauskin J, Fourcade S, Galino J, Ruiz M, Schlüter A, Naudi A, Jove M, Portero-Otin M, Pamplona R, Ferrer I, Pujol A. Antioxidants halt axonal degeneration in a mouse model of X-adrenoleukodystrophy. *Ann Neurol*. 2011 Jul;70(1):84-92.
- Lu XY, Han B, Deng X, Deng SY, Zhang YY, Shen PX, Hui T, Chen RH, Li X, Zhang Y. Pomegranate peel extract ameliorates the severity of experimental autoimmune encephalomyelitis via modulation of gut microbiota. *Gut Microbes*. 2020 Nov 9;12(1):1857515.
- Ma ZF, Zhang H. Phytochemical Constituents, Health Benefits, and Industrial Applications of Grape Seeds: A Mini-Review. *Antioxidants (Basel)*. 2017 Sep 15;6(3):71. doi: 10.3390/antiox6030071.
- Mabrouk M, El Ayed M, Démosthènes A, Aissouni Y, Aouani E, Daulhac-Terrail L, Mokni M, Bégou M. Antioxidant effect of grape seed extract corrects experimental autoimmune encephalomyelitis behavioral dysfunctions, demyelination, and glial activation. *Front Immunol*. 2022 Aug 17;13:960355. doi: 10.3389/fimmu.2022.960355.
- Mahad DJ, Ziabreva I, Campbell G, Lax N, White K, Hanson PS, Lassmann H, Turnbull DM. Mitochondrial changes within axons in multiple sclerosis. *Brain*. 2009 May;132(Pt 5):1161-74.
- Mahad DH, Trapp BD, Lassmann H. Pathological mechanisms in progressive multiple sclerosis. *Lancet Neurol*. 2015 Feb;14(2):183-93.
- Meier DS, Weiner HL, Guttman CR. Time-series modeling of multiple sclerosis disease activity: a promising window on disease progression and repair potential? *Neurotherapeutics*. 2007 Jul;4(3):485-98.
- Migdal C, Serres M. Espèces réactives de l'oxygène et stress oxydant [Reactive oxygen species and oxidative stress]. *Med Sci (Paris)*. 2011 Apr;27(4):405-12.
- Site web de la société Minoryx Therapeutics consulté le 10 janvier 2023 - <https://www.minoryx.com/leriglitazone/>
- Mix E, Meyer-Rienecker H, Hartung HP, Zettl UK. Animal models of multiple sclerosis--potentials and limitations. *Prog Neurobiol*. 2010 Nov;92(3):386-404.
- Moisset X, Ouchchane L, Guy N, Bayle DJ, Dallel R, Clavelou P. Migraine headaches and pain with neuropathic characteristics: comorbid conditions in patients with multiple sclerosis. *Pain*. 2013 Dec;154(12):2691-9.
- Nicol B, Laplaud DA, Liblau R. Sclérose en plaques, une maladie auto-immune. In: Moreau T, Du Pasquier R, coordinators. *Sclérose en plaques. Traité de neurologie*, Editor: Doin ; 2017 Apr. Chapter 5.

- O'Connor AB, Schwid SR, Herrmann DN, Markman JD, Dworkin RH. Pain associated with multiple sclerosis: systematic review and proposed classification. *Pain*. 2008 Jul;137(1):96-111.
- Olechowski CJ, Truong JJ, Kerr BJ. Neuropathic pain behaviours in a chronic-relapsing model of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *Pain*. 2009 Jan;141(1-2):156-64.
- Osterberg A, Boivie J, Thuomas KA. Central pain in multiple sclerosis--prevalence and clinical characteristics. *Eur J Pain*. 2005 Oct;9(5):531-42.
- Osterberg A, Boivie J. Central pain in multiple sclerosis – sensory abnormalities. *Eur J Pain*. 2010 Jan;14(1):104-10.
- Pandolfo M, Reetz K, Darling A, Rodriguez de Rivera FJ, Henry PG, Joers J, Lenglet C, Adanyeguh I, Deelchand D, Mochel F, Pousset F, Pascual S, Van den Eede D, Martin-Ugarte I, Vilà-Brau A, Mantilla A, Pascual M, Martinell M, Meya U, Durr A. Efficacy and Safety of Leriglitazone in Patients With Friedreich Ataxia: A Phase 2 Double-Blind, Randomized Controlled Trial (FRAMES). *Neurol Genet*. 2022 Nov 1;8(6):e200034. doi: 10.1212/NXG.000000000200034.
- Pegoretti V, Swanson KA, Bethea JR, Probert L, Eisel ULM, Fischer R. Inflammation and Oxidative Stress in Multiple Sclerosis: Consequences for Therapy Development. *Oxid Med Cell Longev*. 2020 May 12;2020:7191080.
- Ransohoff RM. Animal models of multiple sclerosis: the good, the bad and the bottom line. *Nat Neurosci*. 2012 Jul 26;15(8):1074-7. doi
- Rivers TM, Sprunt DH, Berry GP. Observations on attempts to produce acute disseminated encephalomyelitis in monkeys. *J Exp Med*. 1933 Jun 30;58(1):39-53.
- Rodríguez-Pascau L, Britti E, Calap-Quintana P, Dong YN, Vergara C, Delaspre F, Medina-Carbonero M, Tamarit J, Pallardó FV, Gonzalez-Cabo P, Ros J, Lynch DR, Martinell M, Pizcueta P. PPAR gamma agonist leriglitazone improves frataxin-loss impairments in cellular and animal models of Friedreich Ataxia. *Neurobiol Dis*. 2021a Jan;148:105162. doi: 10.1016/j.nbd.2020.105162.
- Rodríguez-Pascau L, Vilalta A, Cerrada M, Traver E, Forss-Petter S, Weinhofer I, Bauer J, Kemp S, Pina G, Pascual S, Meya U, Musolino PL, Berger J, Martinell M, Pizcueta P. The brain penetrant PPAR $\gamma$  agonist leriglitazone restores multiple altered pathways in models of X-linked adrenoleukodystrophy. *Sci Transl Med*. 2021b Jun 2;13(596):eabc0555. doi: 10.1126/scitranslmed.abc0555.
- Rust R, Chien C, Scheel M, Brandt AU, Dörr J, Wuerfel J, Klumbies K, Zimmermann H, Lorenz M, Wernecke KD, Bellmann-Strobl J, Paul F. Epigallocatechin Gallate in Progressive MS: A Randomized, Placebo-Controlled Trial. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*. 2021 Feb 23;8(3):e964.
- Sachs D, Teixeira AL. Up-regulation of chemokines and their receptors may contribute to pain in multiple sclerosis. *Med Hypotheses*. 2008 Sep;71(3):466-7.
- Sáez GT, Están-Capell N. Antioxidant Enzymes. In: Schwab, M. (eds) *Encyclopedia of Cancer*. Springer, Berlin, Heidelberg. (2014).
- Salvemini D, Doyle T, Kress M, Nicol G. Therapeutic targeting of the ceramide-to-sphingosine 1-phosphate pathway in pain. *Trends Pharmacol Sci*. 2013 Feb;34(2):110-8.
- Sies H, Jones DP. Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2020 Jul;21(7):363-383.
- Simmons SB, Pierson ER, Lee SY, Goverman JM. Modeling the heterogeneity of multiple sclerosis in animals. *Trends Immunol*. 2013 Aug;34(8):410-22.
- Sim-Selley LJ, Wilkerson JL, Burston JJ, Hauser KF, McLane V, Welch SP, Lichtman AH, Selley DE. Differential Tolerance to FTY720-Induced Antinociception in Acute Thermal and Nerve Injury Mouse Pain Models: Role of Sphingosine-1-Phosphate Receptor Adaptation. *J Pharmacol Exp Ther*. 2018 Sep;366(3):509-518.
- Sochorova L, Prusova B, Cebova M, Jurikova T, Mlcek J, Adamkova A, Nedomova S, Baron M, Sochor J. Health Effects of Grape Seed and Skin Extracts and Their Influence on Biochemical Markers. *Molecules*. 2020 Nov 14;25(22):5311. doi: 10.3390/molecules25225311.
- Solaro C, Uccelli MM. Management of pain in multiple sclerosis: a pharmacological approach. *Nat Rev Neurol*. 2011 Aug 16;7(9):519-27.

- Soldan SS, Lieberman PM. Epstein-Barr virus and multiple sclerosis. *Nat Rev Microbiol*. 2023 Jan;21(1):51-64.
- Tatti P, Arrigoni F, Longobardi A, Costanza F, Di Blasi P, Merante D. Retrospective analysis of rosiglitazone and macular oedema in patients with type 2 diabetes mellitus. *Clin Drug Investig*. 2008;28(5):327-32. Kutzelnigg A, Lassmann H. Pathology of multiple sclerosis and related inflammatory demyelinating diseases. *Handb Clin Neurol*. 2014;122:15-58.
- Teuscher C, Bunn JY, Fillmore PD, Butterfield RJ, Zachary JF, Blankenhorn EP. Gender, age, and season at immunization uniquely influence the genetic control of susceptibility to histopathological lesions and clinical signs of experimental allergic encephalomyelitis: implications for the genetics of multiple sclerosis. *Am J Pathol*. 2004 Nov;165(5):1593-602.
- Thompson AJ, Toosy AT, Ciccarelli O. Pharmacological management of symptoms in multiple sclerosis: current approaches and future directions. *Lancet Neurol*. 2010 Dec;9(12):1182-99.
- Thompson AJ, Baranzini SE, Geurts J, Hemmer B, Ciccarelli O. Multiple sclerosis. *Lancet*. 2018;391:1622–1636
- Thompson A, Ciccarelli O. Towards treating progressive multiple sclerosis. *Nat Rev Neurol*. 2020 Nov;16(11):589-590.
- Truini A, Galeotti F, Cruccu G. Treating pain in multiple sclerosis. *Expert Opin Pharmacother*. 2011 Oct;12(15):2355-68.
- Truini A, Barbanti P, Pozzilli C, Cruccu G. A mechanism-based classification of pain in multiple sclerosis. *J Neurol*. 2013 Feb;260(2):351-67.
- Waslo C, Bourdette D, Gray N, Wright K, Spain R. Lipoic Acid and Other Antioxidants as Therapies for Multiple Sclerosis. *Curr Treat Options Neurol*. 2019 May 6;21(6):26.
- Werner P, Pitt D, Raine CS. Multiple sclerosis: altered glutamate homeostasis in lesions correlates with oligodendrocyte and axonal damage. *Ann Neurol*. 2001 Aug;50(2):169-80.
- Zhang SY, Gui LN, Liu YY, Shi S, Cheng Y. Oxidative Stress Marker Aberrations in Multiple Sclerosis: A Meta-Analysis Study. *Front Neurosci*. 2020 Aug 26;14:823.

#### **9.4. Projets de recherche**

- Anand S, Sowbhagya R, Ansari MA, Alzohairy MA, Alomary MN, Almalik AI, Ahmad W, Tripathi T, Elderderly AY. Polyphenols and Their Nanoformulations: Protective Effects against Human Diseases. *Life (Basel)*. 2022 Oct 19;12(10):1639. doi: 10.3390/life12101639.
- Antonić B, Jančíková S, Dordević D, Tremlová B. Grape Pomace Valorization: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Foods*. 2020 Nov 7;9(11):1627. doi: 10.3390/foods9111627.
- Appikatl S, Bessert D, Lee I, Hüttemann M, Mullins C, Somayajulu-Nitu M, Yao F, Skoff RP. Insertion of proteolipid protein into oligodendrocyte mitochondria regulates extracellular pH and adenosine triphosphate. *Glia*. 2014 Mar;62(3):356-73.
- Bejaoui W, Mahmoudi M, Charradi K, Abbes-Belhadj M, Boukhalfa H, Ben-Attia M, Limam F, Aouani E. Preventive and healing effect of high dosing grape seed flour on CKD patients of various stages and aetiologies. *Biomarkers*. 2022 Dec;27(8):795-801.
- Caimari A, Mariné-Casadó R, Boqué N, Crescenti A, Arola L, Del Bas JM. Maternal intake of grape seed procyanidins during lactation induces insulin resistance and an adiponectin resistance-like phenotype in rat offspring. *Sci Rep*. 2017 Oct 3;7(1):12573.
- Campagnoni AT, Skoff RP. The pathobiology of myelin mutants reveal novel biological functions of the MBP and PLP genes. *Brain Pathol*. 2001 Jan;11(1):74-91.
- Cantuti-Castelvetri L, Fitzner D, Bosch-Queralt M, Weil MT, Su M, Sen P, Ruhwedel T, Mitkovski M, Trendelenburg G, Lütjohann D, Möbius W, Simons M. Defective cholesterol clearance limits remyelination in the aged central nervous system. *Science*. 2018 Feb 9;359(6376):684-688.

Chen J, Chia N, Kalari KR, Yao JZ, Novotna M, Paz Soldan MM, Luckey DH, Marietta EV, Jeraldo PR, Chen X, Weinschenker BG, Rodriguez M, Kantarci OH, Nelson H, Murray JA, Mangalam AK. Multiple sclerosis patients have a distinct gut microbiota compared to healthy controls. *Sci Rep*. 2016 Jun 27;6:28484. doi: 10.1038/srep28484.

Correale J, Hohlfeld R, Baranzini SE. The role of the gut microbiota in multiple sclerosis. *Nat Rev Neurol*. 2022 Sep;18(9):544-558.

Crozier A, Jaganath IB, Clifford MN. Chapter 1 - Phenols, Polyphenols and Tannins: An Overview, Plant Secondary Metabolites: Occurrence, Structure and Role in the Human Diet. Editor(s):Alan Crozier, Michael N. Clifford, Hiroshi Ashihara. John Wiley & Sons, 15 avr. 2008

Defaye M, Nourrisson C, Baudu E, Lashermes A, Meynier M, Meleine M, Wawrzyniak I, Bonnin V, Barbier J, Chassaing B, Godfraind C, Gelot A, Barnich N, Ardid D, Bonnet M, Delbac F, Carvalho FA, Poirier P. Fecal dysbiosis associated with colonic hypersensitivity and behavioral alterations in chronically Blastocystis-infected rats. *Sci Rep*. 2020 Jun 4;10(1):9146. doi: 10.1038/s41598-020-66156-w.

Deng XT, Wu MZ, Xu N, Ma PC, Song XJ. Activation of ephrinB-EphB receptor signalling in rat spinal cord contributes to maintenance of diabetic neuropathic pain. *Eur J Pain*. 2017 Feb;21(2):278-288.

Ferreira YAM, Jamar G, Estadella D, Pisani LP. Proanthocyanidins in grape seeds and their role in gut microbiota-white adipose tissue axis. *Food Chem*. 2023 Mar 15;404(Pt A):134405. doi: 10.1016/j.foodchem.2022.134405.

Forman HJ, Zhang H. Targeting oxidative stress in disease: promise and limitations of antioxidant therapy. *Nat Rev Drug Discov*. 2021 Sep;20(9):689-709.

Grassi S, Giussani P, Mauri L, Prioni S, Sonnino S, Prinetti A. Lipid rafts and neurodegeneration: structural and functional roles in physiologic aging and neurodegenerative diseases. *J Lipid Res*. 2020 May;61(5):636-654.

Greer JM, Lees MB (2002) Myelin proteolipid protein--the first 50 years. *Int J Biochem Cell Biol* 34:211-215.

Hogan V, White K, Edgar J, McGill A, Karim S, McLaughlin M, Griffiths I, Turnbull D, Nichols P (2009) Increase in mitochondrial density within axons and supporting cells in response to demyelination in the Plp1 mouse model. *J Neurosci Res* 87:452-459.

Hubler Z, Allimuthu D, Bederman I, Elitt MS, Madhavan M, Allan KC, Shick HE, Garrison E, T Karl M, Factor DC, Nevin ZS, Sax JL, Thompson MA, Fedorov Y, Jin J, Wilson WK, Giera M, Bracher F, Miller RH, Tesar PJ, Adams DJ. Accumulation of 8,9-unsaturated sterols drives oligodendrocyte formation and remyelination. *Nature*. 2018 Aug;560(7718):372-376.

Hugon-Chapuis F, Pichon V. Polymères à empreintes moléculaires pour l'extraction sélective de composés de milieux biologiques. *Ann Toxicol Anal*. 2007; 19(3): 239-251

Hüttemann M, Zhang Z, Mullins C, Bessert D, Lee I, Nave KA, Appikarla S, Skoff RP. Different proteolipid protein mutants exhibit unique metabolic defects. *ASN Neuro*. 2009 Aug 25;1(3):e00014. doi: 10.1042/AN20090028.

Ikenaka K, Kagawa T, Mikoshiba K (1992) Selective expression of DM-20, an alternatively spliced myelin proteolipid protein gene product, in developing nervous system and in nonglial cells. *J Neurochem* 58:2248-2253.

Knapp PE (1996) Proteolipid protein: is it more than just a structural component of myelin? *Dev Neurosci* 18:297-308.

Kranz C, Eaton DC, Mizaikoff B. Analytical challenges in nanomedicine. *Anal Bioanal Chem*. 2011 Mar;399(7):2309-11.

Kravanja G, Primožič M, Knez Ž, Leitgeb M. Chitosan-based (Nano)materials for Novel Biomedical Applications. *Molecules*. 2019 May 21;24(10):1960. doi: 10.3390/molecules24101960.

Lee HJ, Yoon YS, Lee SJ. Mechanism of neuroprotection by trehalose: controversy surrounding autophagy induction. *Cell Death Dis*. 2018 Jun 15;9(7):712. doi: 10.1038/s41419-018-0749-9.

Lu XY, Han B, Deng X, Deng SY, Zhang YY, Shen PX, Hui T, Chen RH, Li X, Zhang Y. Pomegranate peel extract ameliorates the severity of experimental autoimmune encephalomyelitis via modulation of gut microbiota. *Gut Microbes*. 2020 Nov 9;12(1):1857515.

Lüders KA, Patzig J, Simons M, Nave KA, Werner HB. Genetic dissection of oligodendroglial and neuronal Plp1 function in a novel mouse model of spastic paraplegia type 2. *Glia*. 2017 Nov;65(11):1762-1776. Díaz RS, Monreal

- J, Lucas M (1990) Calcium movements mediated by proteolipid protein and nucleotides in liposomes prepared with the endogenous lipids from brain white matter. *J Neurochem* 55:1304-1309.
- Manach C, Williamson G, Morand C, Scalbert A, Rémésy C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *Am J Clin Nutr.* 2005 Jan;81(1 Suppl):230S-242S.
- Mayer CA, Macklin WB, Avishai N, Balan K, Wilson CG, Miller MJ (2009) Mutation in the myelin proteolipid protein gene alters BK and SK channel function in the caudal medulla. *Respir Physiol Neurobiol* 169:303-314.
- Miquel S, Martín R, Lashermes A, Gillet M, Meleine M, Gelot A, Eschalier A, Ardid D, Bermúdez-Humarán LG, Sokol H, Thomas M, Theodorou V, Langella P, Carvalho FA. Anti-nociceptive effect of *Faecalibacterium prausnitzii* in non-inflammatory IBS-like models. *Sci Rep.* 2016 Jan 18;6:19399. doi: 10.1038/srep19399.
- Miller MJ, Kangas CD, Macklin WB (2009) Neuronal expression of the proteolipid protein gene in the medulla of the mouse. *J Neurosci Res* 87:2842-2853.
- Molinelli A, Weiss R, Mizaikoff B. Advanced solid phase extraction using molecularly imprinted polymers for the determination of quercetin in red wine. *J Agric Food Chem.* 2002 Mar 27;50(7):1804-8.
- Molinelli A, Janotta M, Mizaikoff B. Molecularly imprinted polymers for biomolecular recognition. *Methods Mol Biol.* 2005;300:243-54. doi: 10.1385/1-59259-858-7:243.
- Muthian G, Bright JJ. Quercetin, a flavonoid phytoestrogen, ameliorates experimental allergic encephalomyelitis by blocking IL-12 signaling through JAK-STAT pathway in T lymphocyte. *J Clin Immunol.* 2004 Sep;24(5):542-52.
- Natarajan J, Baskaran M, Humtsoe LC, Vadivelan R, Justin A. Enhanced brain targeting efficacy of Olanzapine through solid lipid nanoparticles. *Artif Cells Nanomed Biotechnol.* 2017 Mar;45(2):364-371.
- Ochoa-Repáraz J, Mielcarz DW, Ditrio LE, Burroughs AR, Foureau DM, Haque-Begum S, Kasper LH. Role of gut commensal microflora in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol.* 2009 Nov 15;183(10):6041-50.
- Pineda-Torra I, Siddique S, Waddington KE, Farrell R, Jury EC. Disrupted Lipid Metabolism in Multiple Sclerosis: A Role for Liver X Receptors? *Front Endocrinol (Lausanne).* 2021 Apr 13;12:639757. doi: 10.3389/fendo.2021.639757.
- Saad EM, El Gohary NA, Abdel-Halim M, Handoussa H, Mohamed El Nashar R, Mizaikoff B. Molecularly imprinted polymers for selective extraction of rosmarinic acid from *Rosmarinus officinalis* L. *Food Chem.* 2021 Jan 15;335:127644.
- Shabani S, Rabiei Z, Amini-Khoei H. Exploring the multifaceted neuroprotective actions of gallic acid: a review, *International Journal of Food Properties.* 2020 23(1): 736-752.
- Shen P, Lin W, Deng X, Ba X, Han L, Chen Z, Qin K, Huang Y, Tu S. Potential Implications of Quercetin in Autoimmune Diseases. *Front Immunol.* 2021 Jun 23;12:689044.
- Siddiqui S, Kamal A, Khan F, Jamali KS, Saify ZS. Gallic and vanillic acid suppress inflammation and promote myelination in an in vitro mouse model of neurodegeneration. *Mol Biol Rep.* 2019 Feb;46(1):997-1011.
- Somayajulu M, Bessert DA, Hüttemann M, Sohi J, Kamholz J, Skoff RP. Insertion of proteolipid protein into mitochondria but not DM20 regulates metabolism of cells. *Neurosci Lett.* 2018 Jun 21;678:90-98.
- Stegnjaić G, Tsailanis AD, Lazarević M, Gkalpinos VK, Djedovic N, Antoniou T, Stanisavljević S, Dimitrijević M, Momčilović M, Miljković Đ, Tzakos AG, Jevtić B. Phenethyl Ester of Gallic Acid Ameliorates Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *Molecules.* 2022 Dec 10;27(24):8770.
- Sternberg Z, Chadha K, Lieberman A, Hojnacki D, Drake A, Zamboni P, Rocco P, Grazioli E, Weinstock-Guttman B, Munschauer F. Quercetin and interferon-beta modulate immune response(s) in peripheral blood mononuclear cells isolated from multiple sclerosis patients. *J Neuroimmunol.* 2008 Dec 15;205(1-2):142-7.
- Turki K, Charradi K, Boukhalifa H, Belhaj M, Limam F, Aouani E. Grape seed powder improves renal failure of chronic kidney disease patients. *EXCLI J.* 2016 Jun 27;15:424-433.
- Wang E, Dimova N, Sperle K, Huang Z, Lock L, McCulloch MC, Edgar JM, Hobson GM, Cambi F (2008) Deletion of a splicing enhancer disrupts PLP1/DM20 ratio and myelin stability. *Exp Neurol* 214:322-330.

Wei S, Molinelli A, Mizaikoff B. Molecularly imprinted micro and nanospheres for the selective recognition of 17beta-estradiol. *Biosens Bioelectron.* 2006 Apr 15;21(10):1943-51. doi: 10.1016/j.bios.2005.09.017.

Yamine SS, Delsart C, Vitrac X, Mietton Peuchot M, Ghidossi R. Characterisation of polyphenols and antioxidant potential of red and white pomace by-product extracts using subcritical water extraction. *OENO One*, 2020, 54 (2), pp.263-27

## 9.5. Conclusion générale

Comer AL, Carrier M, Tremblay MÈ, Cruz-Martín A. The Inflamed Brain in Schizophrenia: The Convergence of Genetic and Environmental Risk Factors That Lead to Uncontrolled Neuroinflammation. *Front Cell Neurosci.* 2020 Aug 27;14:274. doi: 10.3389/fncel.2020.00274.

Graziano E, Hagemeyer J, Weinstock-Guttman B, Ramasamy DP, Zivadnov R. Increased contrast enhancing lesion activity in relapsing-remitting multiple sclerosis migraine patients. *Neuroimage Clin.* 2015 Aug 1;9:110-6.

Lee CT, Bendriem RM, Wu WW, Shen RF. 3D brain Organoids derived from pluripotent stem cells: promising experimental models for brain development and neurodegenerative disorders. *J Biomed Sci.* 2017 Aug 20;24(1):59. doi: 10.1186/s12929-017-0362-8.

Lipska BK, Weinberger DR. To model a psychiatric disorder in animals: schizophrenia as a reality test. *Neuropsychopharmacology.* 2000 Sep;23(3):223-39.

Maas DA, Eijsink VD, Spoelder M, van Hulten JA, De Weerd P, Homberg JR, Vallès A, Nait-Oumesmar B, Martens GJM. Interneuron hypomyelination is associated with cognitive inflexibility in a rat model of schizophrenia. *Nat Commun.* 2020 May 11;11(1):2329. doi: 10.1038/s41467-020-16218-4.

Maas DA, Martens MB, Priovoulos N, Zuure WA, Homberg JR, Nait-Oumesmar B, Martens GJM. Key role for lipids in cognitive symptoms of schizophrenia. *Transl Psychiatry.* 2020 Nov 12;10(1):399. doi: 10.1038/s41398-020-01084-x.

Mandillo S, Tucci V, Hölter SM, Meziane H, Banchaabouchi MA, Kallnik M, Lad HV, Nolan PM, Ouagazzal AM, Coghill EL, Gale K, Golini E, Jacquot S, Krezel W, Parker A, Riet F, Schneider I, Marazziti D, Auwerx J, Brown SD, Chambon P, Rosenthal N, Tocchini-Valentini G, Wurst W. Reliability, robustness, and reproducibility in mouse behavioral phenotyping: a cross-laboratory study. *Physiol Genomics.* 2008 Aug 15;34(3):243-55.

McKinney WT Jr, Bunney WE Jr. Animal model of depression. I. Review of evidence: implications for research. *Arch Gen Psychiatry.* 1969 Aug;21(2):240-8.

Mix E, Meyer-Rienecker H, Hartung HP, Zettl UK. Animal models of multiple sclerosis--potentials and limitations. *Prog Neurobiol.* 2010 Nov;92(3):386-404.

Moisset X, Ouchchane L, Guy N, Bayle DJ, Dallel R, Clavelou P. Migraine headaches and pain with neuropathic characteristics: comorbid conditions in patients with multiple sclerosis. *Pain.* 2013 Dec;154(12):2691-9.

Möhrke J, Kropp P, Zettl UK. Headaches in multiple sclerosis patients might imply an inflammatory process. *PLoS One.* 2013 Aug 5;8(8):e69570. doi: 10.1371/journal.pone.0069570.

Percie du Sert N, Ahluwalia A, Alam S, Avey MT, Baker M, Browne WJ, Clark A, Cuthill IC, Dirnagl U, Emerson M, Garner P, Holgate ST, Howells DW, Hurst V, Karp NA, Lazic SE, Lidster K, MacCallum CJ, Macleod M, Pearl EJ, Petersen OH, Rawle F, Reynolds P, Rooney K, Sena ES, Silberberg SD, Steckler T, Würbel H. Reporting animal research: Explanation and elaboration for the ARRIVE guidelines 2.0. *PLoS Biol.* 2020 Jul 14;18(7):e3000411. doi: 10.1371/journal.pbio.3000411.

Shimizu H, Iwayama Y, Yamada K, Toyota T, Minabe Y, Nakamura K, Nakajima M, Hattori E, Mori N, Osumi N, Yoshikawa T. Genetic and expression analyses of the STOP (MAP6) gene in schizophrenia. *Schizophr Res.* 2006 Jun;84(2-3):244-52.

Wu YY, Chiu FL, Yeh CS, Kuo HC. Opportunities and challenges for the use of induced pluripotent stem cells in modelling neurodegenerative disease. *Open Biol.* 2019 Jan 31;9(1):180177. doi: 10.1098/rsob.180177.