



HAL
open science

Caractérisation d'un nouveau modèle animal de polyradiculonévrite chronique et développement de stratégies thérapeutiques

Laurent Kremer

► **To cite this version:**

Laurent Kremer. Caractérisation d'un nouveau modèle animal de polyradiculonévrite chronique et développement de stratégies thérapeutiques. Neurosciences [q-bio.NC]. Université de Strasbourg, 2018. Français. NNT : 2018STRAJ058 . tel-02271299

HAL Id: tel-02271299

<https://theses.hal.science/tel-02271299>

Submitted on 26 Aug 2019

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

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

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ

Unité de recherche :

Biopathologie de la Myéline, Neuroprotection et Stratégies Thérapeutiques,
INSERM U1119 / Université de Strasbourg

THÈSE

 présentée par :

Laurent KREMER

soutenue le : 24 septembre 2018

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

Discipline/ Spécialité : NEUROSCIENCES

**Caractérisation d'un nouveau modèle
animal de polyradiculonévrite chronique et
développement de stratégies thérapeutiques**

THÈSE dirigée par : Professeur Jérôme DE SEZE, Université de Strasbourg

ENCADRANTE : Docteur Susana BRUN, Université de Strasbourg

MEMBRES DU JURY :

Professeur Hélène ZEPHIR, Université de Lille

Professeur Jean-Philippe CAMDESSANCHE, Université de Saint-Etienne

Professeur Sylviane MULLER, Université de Strasbourg

Rapporteur externe

Rapporteur externe

Examinateur interne

Professeur Ayikoe Guy MENSAH-NYAGAN, Université de Strasbourg

Professeur Andoni ECHANIZ-LAGUNA, Université de Paris Sud

Membre invité

Membre invité

Remerciements

Je voudrais remercier :

Les membres du jury qui m'ont fait l'honneur de juger mon travail : **Jérôme de Seze, Jean-Philippe Camdessanche, Andoni Echaniz-Laguna, Guy Mensah-Nyagan, Sylviane Muller et Hélène Zéphir**

Les membres du laboratoire « Biopathologie de la Myéline, Neuroprotection et Stratégie thérapeutiques, INSERM 1119 » pour m'avoir accompagné dans ce travail et pour leur aide précieuse dont : **Guy Mensah-Nyagan, Jérôme de Seze, Elisabeth Trifilieff, Dao Lam et plus particulièrement Susana Brun** pour l'aide qu'elle m'a apportée et son encadrement tout au long de ce travail.

Les membres du service de neurologie du CHU de Strasbourg avec qui je travaille chaque jour et qui ont participé directement ou non à ma formation médicale et scientifique dont cette thèse est un prolongement.

Au plan personnel, je voudrais remercier toute ma famille et mes proches pour leur soutien ; mes parents, mes sœurs, Myriam et mes petites Mathilde et Agathe.

TABLE DES MATIERES

LISTE DES TABLEAUX	6
LISTE DES FIGURES	7
LISTE DES ANNEXES	8
LISTE DES ABREVIATIONS	9
INTRODUCTION	10
I. Les pathologies inflammatoires démyélinisantes du système nerveux et leurs modèles animaux	11
A. Pathologies inflammatoires du système nerveux central	12
A. La sclérose en plaques	12
B. L'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE)	13
B. Pathologies inflammatoires du système nerveux périphérique	13
A. Le syndrome de Guillain-Barré	13
a) La polyradiculonévrite inflammatoire démyélinisante aiguë (AIDP)	14
b) Les formes axonales	14
c) Le syndrome de Miller-Fisher	15
B. La polyradiculonévrite inflammatoire démyélinisante chronique	15
a) Epidémiologie	15
b) Physiopathologie	16
c) Diagnostic positif	17
(1) Aspects cliniques	17
(2) Evolution et pronostic	19
d) Explorations complémentaires	20
(1) Electrophysiologie	20
(2) Analyse du liquide céphalo-rachidien	21
(3) Autre examens complémentaires	23
(4) Intérêt de la biopsie nerveuse	23
e) Maladies associées et formes frontières	24
(1) Maladies générales associées	24
(2) Formes frontières	25
f) Traitements	27
(1) Immunoglobulines humaines polyvalentes	27

(2) Corticoïdes	28
(3) Echanges plasmatiques	28
(4) Traitements de deuxième intention	28
C. Les modèles animaux de polyradiculonévrites	29
a) Modèle animal de l'AIDP : la névrite auto-immune expérimentale (EAN).....	29
b) Modèle animal de l'AMAN.....	30
c) Modèle animal de la PIDC.....	30
II. Intérêt des peptides palmitoylés.....	31
III. Le Fingolimod	32
A. Généralités	32
B. Mécanisme d'action.....	34
C. Utilisation thérapeutique actuelle	36
D. Rationnel de l'utilisation du Fingolimod dans la PIDC.....	36
IV. Objectifs du travail de thèse.....	37
ARTICLE 1.....	39
<i>Characterization of a new rat model for chronic inflammatory demyelinating polyneuropathies.</i>	39
ARTICLE 2.....	50
<i>Chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy: A new animal model for new therapeutic targets.</i>	50
ARTICLE 3.....	54
<i>FTY720 (Fingolimod) controls the disease severity and attenuates sciatic nerves damages in rats with chronic experimental autoimmune neuritis</i>	54
DISCUSSION	82
I. Validation et caractérisation d'un modèle murin de polyradiculonévrite chronique	83
A. Données électrophysiologiques.....	83
B. Données histologiques	84
C. Données immunologiques	84
1. Infiltrations de cellules inflammatoires.....	84
2. Implication de l'interleukine 17	84
3. Balance Th1/Th2	85
4. Immunité humorale.....	86
II. Evaluation de l'effet du Fingolimod dans notre modèle animal	86
A. Evaluation clinique.....	87
B. Evaluation électrophysiologique	88

C. Evaluation histologique.....	88
D. Evaluation immunologique.....	88
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	90
BIBLIOGRAPHIE	93

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Critères électrodiagnostiques consensuels des PIDC, d'après l'EFNS et la PNS (Joint Task Force of the EFNS and the PNS, 2010)	22
Tableau 2 : PIDC et formes frontières	27

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Les cellules responsables de la myélinisation, la structure de la myéline et sa composition protéique dans le SNC et SNP.....	11
Figure 2 : Modèle d'insertion de la protéine P0 dans la membrane myélinique. En rouge, bleu et vert, les principaux peptides neuritogènes de la protéine P0.....	32
Figure 3 : Similitudes structurelles entre le fingolimod et la sphingosine.....	34
Figure 4 : Mécanisme d'action du fingolimod.....	35

LISTE DES ANNEXES

Annexe 1 : Liste des communications orales et par affiche.....	101
Annexe 2 : Poster JNLF 2014 : Validation et caractérisation d'un modèle animal de polyradiculonévrite chronique. <i>L. Kremer, S. brun, W. Beaino, O. Taleb, D. Lam, E. Triffilief, J. de Seze</i>.....	102
Annexe 3 : Poster AAN 2014 : Characterization of a new animal mode of chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. <i>L. Kremer, S. brun, W. Beaino, O. Taleb, D. Lam, E. Triffilief, J. de Seze</i>.....	103
Annexe 4 : Poster JNLF 2015 : Effet du FTY720 (Fingolimod) chez un nouveau modèle animal préclinique de polyradiculonévrite inflammatoire démyélinisante chronique. <i>L. Kremer, S Brun, E. Trifilieff, J. de Seze</i>.....	104
Annexe 5 : Poster AAN 2015 : Effect of FTY720 (Fingolimod) in a new preclinical rat model for chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy (CIDP). <i>S Brun, L. Kremer, E. Trifilieff, J. de Seze</i>.....	105

LISTE DES ABREVIATIONS

ACF : Adjuvant complet de Freund
AIDP : Polyradiculonévrite inflammatoire démyélinisante aigüe
AMAN : Acute motor axonal neuropathy
AMSAN : Acute motor and sensory axonal neuropathy
EAE : Encéphalomyélite auto-immune expérimentale
EAN : Névrite auto-immune expérimentale
EFNS : European Federation of Neurological Societies
EP : Echanges plasmatiques
GBS : Syndrome de Guillain-Barré
IFN : Interféron
Ig : Immunoglobuline
IGIV : Immunoglobulines polyvalentes intraveineuses
IL : Interleukine
IRM : Imagerie par résonance magnétique
MAG : Myelin associated glycoprotein
MBP : Protéine basale de la myéline
MOG : Myelin oligodendrocyte glycoprotein
NOD : Non obese diabétique
PES : Potentiels évoqués sensitifs
PIDC : Polyradiculonévrite inflammatoire démyélinisant chronique
PLP : Myelin proteolipid protein
PNS : Peripheral Nerve Society
S1P : Sphingosine 1 phosphate
S1PR1 : Récepteur à la sphingosine 1 phosphate de type 1
SEP : Sclérose en plaques
SNC : Système nerveux central
SNP : Système nerveux périphérique
TNF : Tumor necrosis factor
VIH : Virus de l'immunodéficience humaine

INTRODUCTION

INTRODUCTION

I. Les pathologies inflammatoires démyélinisantes du système nerveux et leurs modèles animaux

La myéline est une structure lipoprotéique formée par des extensions de la membrane plasmique des oligodendrocytes pour le système nerveux central (SNC) et des cellules de Schwann pour le système nerveux périphérique (SNP). Un oligodendrocyte myélinise plusieurs axones tandis qu'une cellule de Schwann myélinise un seul axone.

La myéline joue un rôle d'isolant électrique permettant une propagation rapide de l'influx nerveux le long de l'axone car elle permet une conduction rapide dite saltatoire de la dépolarisation membranaire neuronale, au niveau des nœuds de Ranvier.

La composante protéique de la myéline lui est spécifique, et les protéines du SNC diffèrent de celles du SNP soit par leur nature, soit par leurs proportions (1) (**Figure 1**).

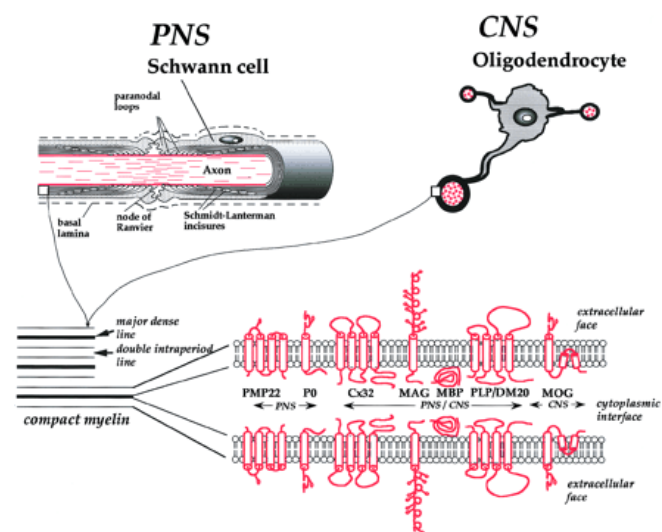


Figure 1 : Les cellules responsables de la myélinisation, la structure de la myéline et sa composition protéique dans le SNC et SNP (Baumann N. et al., 2001) (2).

En raison du rôle important de cette myéline, ses altérations peuvent être responsables de pathologies sévères, tant au niveau du SNC que du SNP. Pour pouvoir progresser dans la connaissance de l'immunopathogenèse de ces maladies, ainsi que pour trouver de nouvelles voies thérapeutiques, il est important de posséder des modèles animaux fiables et reproductibles.

A. Pathologies inflammatoires du système nerveux central

A. La sclérose en plaques

La sclérose en plaques (SEP) est décrite pour la première fois par le neurologue français Charcot. Il s'agit de l'une des maladies neurologiques du SNC les plus fréquentes avec une prévalence plus élevée dans les latitudes nord et chez les femmes avec un ratio de 2 femmes pour 1 homme. L'âge moyen de début de la maladie est d'environ 30 ans et la SEP est ainsi une cause majeure d'invalidité neurologique non traumatique chez les sujets jeunes. Il existe trois formes évolutives de SEP : récurrente-rémittente, secondairement progressive, progressive primaire. Les symptômes sont variés et fonction du niveau de l'atteinte neurologique (3).

La SEP est une maladie inflammatoire démyélinisante du SNC touchant le cerveau et la moelle épinière, le tronc cérébral et les nerfs optiques. Les sites de démyélinisation sont caractérisés par une infiltration de lymphocytes T CD4⁺ de type Th1 et Th17 (sécrétion de cytokines inflammatoires : IFN- γ , IL-2, IL-17, TNF- α), de macrophages exprimant le CMH de classe II et de lymphocytes T CD8⁺. L'hypothèse physiopathologique retenue actuellement est une origine autoimmune de la maladie. La démyélinisation serait secondaire au processus inflammatoire. Celui-ci passerait par une activation des lymphocytes T CD4⁺ en périphérie suite à une réaction avec des antigènes ayant une antigénicité croisée avec un ou plusieurs

épitopes de la myéline. Les autoantigènes potentiels seraient les protéines de la myéline du SNC (PLP, MBP, MOG). Ces lymphocytes peuvent ensuite passer la barrière hémato-encéphalique (BHE) et accéder au SNC. Après réactivation ils sont responsables d'une réaction inflammatoire puis par différents mécanismes, d'une démyélinisation. Il existe actuellement différents traitements immunomodulateurs ou immunosuppresseurs dont trois sont issus des études faites sur le modèle animal de la SEP (4,5).

B. L'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE)

L'EAE est le principal modèle animal de SEP. Il existe différents modes d'induction tous basés sur le principe que les protéines de la myéline seraient les autoantigènes potentiellement susceptibles d'induire la réponse immunitaire pathogène. Les différentes protéines décrites comme encéphalitogènes sont la MBP, le PLP, la MOG ou des peptides de ces protéines. L'EAE peut être induite soit par injection des différentes protéines ou peptides issus de leurs séquences soit par injection de lymphocytes T CD4⁺ pré-activés contre les épitopes de ces mêmes protéines. Les différents types d'EAE induites sont soit monophasique aiguë, soit rémittente-récurrente. Ces différents modèles d'EAE ont permis la compréhension des mécanismes inflammatoires et auto-immuns de la SEP et ont permis la mise en place de nombreuses stratégies thérapeutiques (6–9).

B. Pathologies inflammatoires du système nerveux périphérique

A. Le syndrome de Guillain-Barré

Le syndrome de Guillain-Barré (GBS) est décrit la première fois en 1916 par les neurologues français Guillain, Barré et Strohl. C'est une pathologie rare avec une prévalence de 0,4 à 4 cas

pour 100000 habitants dans le monde. Les hommes sont légèrement plus touchés avec un sexe ratio de 1,5 pour 1. Il s'agit d'une pathologie inflammatoire démyélinisante du SNP responsable de déficits sensitivomoteurs des membres ; les atteintes faciale, bulbaire et respiratoire constituent un signe de gravité. L'évolution naturelle est aigüe et monophasique avec une phase d'apparition et d'aggravation progressive des symptômes, une phase de plateau plus ou moins longue et une phase de récupération. Son traitement consiste en des échanges plasmatiques et/ou des perfusions d'immunoglobulines polyvalentes intraveineuses (10–12).

Le GBS comprend plusieurs sous types différents caractérisés cliniquement, électrophysiologiquement et physiopathologiquement :

a) La polyradiculonévrite inflammatoire démyélinisante aigüe (AIDP)

C'est la forme dite « classique » et la plus fréquente en Europe (90 %). L'AIDP est caractérisée par une démyélinisation périphérique associée à une infiltration multifocale de cellules mononucléaires. Il existe une participation de l'immunité cellulaire et humorale. Le mécanisme auto-immun est en partie similaire à celui de la SEP avec réaction croisée d'un antigène avec des épitopes des protéines de la myéline, souvent secondaire à des agents infectieux à tropisme pulmonaire ou digestif (13,14).

b) Les formes axonales

L'AMAN (Acute Motor Axonal Neuropathy) est la forme la plus fréquente en Asie (30-60 %). L'AMAN et AMSAN (Acute Motor Sensory Axonal Neuropathy) sont caractérisées par

une dégénérescence axonale. L'atteinte est secondaire à un dépôt d'anticorps dirigés contre les gangliosides de la membrane de l'axone (anticorps anti-GM1 et anti-GD1) au niveau des nœuds de Ranvier. L'intervention secondaire du complément est responsable d'une dégénérescence wallérienne avec blocage de conduction ; s'y associe une infiltration de macrophages responsable de la dégénérescence axonale. La réaction croisée responsable de l'atteinte auto-immune est souvent secondaire à un agent infectieux et en particulier le *Campylobacter jejuni* pour l'AMAN (11,15).

c) **Le syndrome de Miller-Fisher**

Le syndrome de Miller-Fischer est caractérisé par une atteinte clinique spécifique associant ophtalmoplégie, ataxie et aréflexie ostéotendineuse. Le mécanisme physiopathologique est proche de celui de l'AMAN avec l'existence d'anticorps anti-ganglioside de type anti-GQ1b chez 90 % des patients, secondaires à une réaction croisée post-infectieuse avec les oligosaccharides bactériens. L'atteinte prédomine au niveau des jonctions neuromusculaires riches en GQ1b (16).

B. **La polyradiculonévrite inflammatoire démyélinisante chronique**

a) **Epidémiologie**

La polyradiculonévrite inflammatoire démyélinisante chronique (PIDC) peut être considérée comme la forme chronique du GBS. Sa prévalence est estimée entre 2 et 9 cas pour 100 000 habitants ; son incidence est de 0,15 à 1,6 pour 10 000 habitants par an. Le sex-ratio est de 1,5, c'est-à-dire qu'il y a une légère prédominance masculine. L'âge de début est variable, en moyenne entre 45 et 50 ans. On considère actuellement que les PIDC représentent environ 5 % de toutes les neuropathies. Ces écarts dans les estimations épidémiologiques peuvent être

expliqués par les biais méthodologiques de certaines études et l'utilisation de critères diagnostiques différents (17).

b) **Physiopathologie**

L'appartenance des PIDC au groupe des neuropathies auto-immunes repose sur de nombreux arguments.

Au plan histologique, il a été montré la présence de lymphocytes T dans l'endonèvre de biopsies nerveuses de patients atteints, de même qu'un infiltrat de cellules macrophagiques responsables d'une phagocytose des débris myéliniques (18).

Au plan immunologique, d'autres études ont montré que les poussées de PIDC étaient accompagnées d'une élévation des taux sériques de certaines cytokines comme le facteur de nécrose tumorale (TNF α [*Tumor Necrosis Factor α*]) ou l'interleukine 2 (IL-2). Une altération de la barrière sang/nerf et de l'exposition des antigènes neuronaux suite à une dérégulation de certains médiateurs chimiques, comme les chémokines et les molécules d'adhésion, pourrait être l'un des mécanismes expliquant la pathologie et provoquer la réaction auto-immune, comme cela a été montré au niveau du système nerveux central dans la sclérose en plaques. La nature de ces antigènes reste à ce jour indéterminée. L'hypothèse d'une analogie antigénique entre une protéine de la myéline et un agent infectieux est la meilleure proposée. Elle n'a pas encore été validée dans les PIDC, bien qu'il soit fréquemment rapporté un épisode infectieux précédant le développement de la pathologie.

De nombreux auto-anticorps ont été recherchés. Les anticorps antigangliosides, ayant une activité dirigée contre des antigènes myéliniques, sont parfois associés aux PIDC. Il s'agit d'anticorps dirigés contre des glycolipides membranaires (GM1, GM2, GD1a, GD1b, GT1a, GT1b, GQ1b). Ces anticorps ne sont cependant pas spécifiques.

D'autres cibles auto-antigéniques potentielles seraient des protéines de la myéline du SNP (P0, P2) (19).

Enfin, la bonne sensibilité des PIDC aux traitements immunosuppresseurs (corticoïdes) et immunomodulateurs (échanges plasmatiques, immunoglobulines polyvalentes) constitue un autre argument en faveur d'un mécanisme dysimmunitaire (17).

c) Diagnostic positif

Le diagnostic de PIDC n'est pas toujours aisé. Il repose sur des critères à la fois cliniques, électrophysiologiques, biologiques, voire histologiques pour les formes atypiques. Les premiers critères proposés par un comité ad hoc (1991) étaient relativement restrictifs (20). Plusieurs équipes et réunions d'experts ont élaboré des critères plus sensibles (21–23).

(1) Aspects cliniques

Habituellement l'installation des symptômes se fait sur 8 semaines au moins, à la différence des polyradiculonévrites aiguës, pour lesquelles le paroxysme des signes est atteint de façon bien plus rapide en moins de 4 semaines. Entre 4 et 8 semaines, il s'agirait de formes subaiguës dont la présentation serait tout de même plus proche de celle des formes chroniques.

Les manifestations cliniques sont relativement variées et variables. Dans la plupart des cas, les symptômes associent, une atteinte motrice avec un déficit plutôt proximal aux membres inférieurs, une aréflexie ostéotendineuse diffuse et des signes sensitifs : paresthésies, dysesthésie, hypoesthésie, ataxie proprioceptive. Une atteinte des nerfs crâniens, bien que moins fréquente, peut parfois être associée à ce tableau (paralysie faciale, troubles oculomoteurs).

Atteinte motrice : dans la PIDC classique, le déficit moteur est souvent prédominant. Il est en général symétrique, plus marqué aux membres inférieurs et à prédominance proximale (non longueur dépendant). Si l'atteinte est plutôt distale, ce sont les autres arguments cliniques associées (évolution subaiguë, atteinte simultanée des 4 membres, ataxie, aréflexie diffuse) qui peuvent permettre de faire le diagnostic différentiel avec une neuropathie axonale longueur-dépendante. Il existe des formes motrices pures retrouvées dans 10 à 20 % des cas selon les séries Une amyotrophie est rarement retrouvée en début d'évolution de la maladie, elle est liée à la perte axonale secondaire à la démyélinisation est apparait plus tardivement. (17,24).

Atteinte sensitive : l'aréflexie diffuse, les paresthésies distales et l'ataxie proprioceptive sont les principaux troubles sensitifs retrouvés, secondaires à une atteinte des fibres de gros calibre. Il existe des symptômes sensitifs moins typiques avec des présentations douloureuses pseudo radiculaire ou une aréflexie isolée (25). L'atteinte proprioceptive peut être responsable d'un tremblement distal des extrémités des membres supérieurs. L'atteinte des fibres de petit calibre qui peut être responsable de troubles dysautonomiques, relativement fréquente dans le syndrome de Guillain-Barré, est très rare dans la PIDC. Les formes sensitives pures existent également et ne seraient pas exceptionnelles (24,26). Ces formes sensitives se rapprochent cliniquement des neuropathies (ou ganglionopathies) sensitives. Le diagnostic différentiel, important en raison d'un pronostic et d'une prise en charge différente, se fait principalement par l'électromyographie.

Atteinte des nerfs crâniens : L'atteinte crânienne est beaucoup moins fréquente, estimée entre 15 et 30 % selon les séries, et elle touche de façon prédominante le nerf facial et les nerfs oculomoteurs (24). Dans certains cas il s'agit de l'atteinte initiale révélant la PIDC (27).

Atteinte centrale associée : la myéline du système nerveux central est rarement atteinte mais rapportée. Il est principalement décrit des névrites optiques rétrobulbaires. Parfois il s'agit de

lésion de découverte fortuite à l'IRM cérébrale, asymptomatiques (lien direct ? association fortuite avec une pathologie inflammatoire du système nerveux central ?).

(2) Evolution et pronostic

On retrouve deux modes évolutifs différents dans la PIDC : une forme à rechutes et une forme progressive (24). Au moment des premières manifestations clinique et du diagnostic initial, il n'existe pas de facteur prédictif qui puisse préjuger de l'évolution et du pronostic.

Il semble que les formes plutôt subaiguës seraient plus fréquentes si l'âge est plus jeune, avec une atteinte clinique principalement motrice et une évolution rémittente. Le pronostic serait également meilleur. A un âge plus avancé, l'évolution seraient plus fréquemment progressive et insidieuse, plutôt moins sensible aux thérapeutiques actuelles (17,24,26). La gravité de l'atteinte initiale serait également en partie prédictive du pronostic, surtout s'il existe des séquelles motrices.

À la phase d'état, l'état clinique des patients est très variable. Dans les formes à prédominances sensitives notamment, les symptômes peuvent être très limités. A l'autre extrême, il existe de rares patients avec un état grabataire suite à une atteinte sévères, souvent motrice. La mortalité est faible, évalué à 3 %. Des régressions spontanées sont décrites mais rares.

La plupart des patients traités retrouvent une autonomie suite aux traitements immuno-modulateurs ou immunosuppresseurs, cependant le bénéfice n'est en général que transitoire. Il peut persister des symptômes moins spécifiques et de façon plus chronique comme des douleurs neuropathiques et une asthénie. Une rémission complète n'est obtenue que chez 10 à 15 % des patients après traitement.

d) Explorations complémentaires

(1) Electrophysiologie

L'examen électroneuromyographique est un examen clé du diagnostic et est nécessaire afin de valider le diagnostic clinique. Son intérêt est de pouvoir mettre en évidence le processus de démyélinisation ainsi que sa sévérité, en partie évaluée par la perte axonale secondaire.

Les critères de démyélinisation sont évalués par l'étude de la conduction motrice. Différentes anomalies peuvent être recherchées :

- le ralentissement des vitesses de conduction tronculaire,
- l'allongement des latences distales et proximales (ondes F),
- la présence de blocs de conduction : se recherche en comparant l'amplitude de la réponse évoquée motrice après stimulations proximale et distale. Il se définit par une diminution de l'amplitude de la réponse motrice évoquée proximale d'au moins 30 % avec une augmentation de la durée inférieure à 15 % par rapport à la stimulation distale.
- La présence d'une dispersion temporelle : augmentation de la durée de la réponse proximale supérieure à 15 % comparée à la réponse motrice distale.

La PIDC n'est pas le seul type de neuropathie où il existe une atteinte démyélinisante. Ces anomalies peuvent se voir dans d'autres neuropathies dysimmunitaires ou dans certaines neuropathies héréditaires (Charcot-Marie-Tooth). Concernant les autres neuropathies dysimmunitaires, la présentation clinique et certaines spécificités électromyographiques permettent de les différencier. On retrouve par exemple :

- la neuropathie motrice multifocale avec blocs de conduction et le syndrome de Lewis et Sumner dans lesquels l'examen électrophysiologique retrouve de façon

prédominante des blocs de conduction alors que dans la PIDC toutes les anomalies évocatrices de démyélinisation peuvent coexister.

- la neuropathie à anticorps anti-MAG (*Myelin-Associated Glycoprotein*) où la démyélinisation prédomine nettement en distalité du nerf alors que dans la PIDC les anomalies prédominent dans la partie proximale (28). Certains outils, comme le MFR (*Modified F Ratio*) et le TLI (*Terminal Latence Index*), permettent d'étudier respectivement la topographie proximale et distale des anomalies démyélinisantes.

Différents groupes d'experts ont mis au point des critères diagnostiques électrophysiologiques comme ceux du comité ad hoc de l'AAN (20) ou du groupe de travail conjoint de l'EFNS (*European Federation of Neurological Societies*) et de la PNS (*Peripheral Nerve Society*) (23). Ces critères, initialement très spécifiques ont progressivement été modifiés afin d'en améliorer la sensibilité.

Les critères utilisés actuellement sont ceux proposés par le groupe de travail conjoint de l'EFNS et de la PNS (23) (**Tableau 1**).

(2) Analyse du liquide céphalo-rachidien

L'analyse du liquide céphalorachidien après réalisation d'une ponction lombaire permet de mettre en évidence une dissociation albumino-cytologique (hyperprotéinorachie sans réaction cellulaire) en faveur du diagnostic, présente dans 80 à 90 % des séries (24).

L'existence d'une réaction cellulaire doit orienter vers des diagnostics différentiels, notamment infectieux (maladie de Lyme, virus de l'immunodéficience humaine (VIH), hépatites B et C) ou néoplasiques par infiltration nerveuse (lymphome).

Tableau 1 : Critères électrodiagnostiques consensuels des PIDC, d'après l'EFNS et la PNS (Joint Task Force of the EFNS and the PNS, 2010) (23).

PIDC certaine : au moins 1 des critères suivants

- Allongement ≥ 50 % de la latence motrice distale au-dessus de la LSN dans 2 nerfs (à l'exclusion du médian au poignet en cas de syndrome du canal carpien) ;
- Réduction ≥ 30 % de la VCM en dessous de la LIN dans 2 nerfs ;
- Allongement de la latence de l'onde F ≥ 30 % au-dessus de la LSN dans 2 nerfs (≥ 50 % de la LSN si amplitude distale du PGAM < 80 % de la LIN) ;
- Absence d'onde F dans 2 nerfs si ces nerfs ont une amplitude distale du PGAM ≥ 20 % de la LIN + ≥ 1 autre paramètre de démyélinisation* dans ≥ 1 autre nerf ;
- Bloc de conduction partiel : diminution ≥ 50 % de l'amplitude du PGAM proximal par rapport au PGAM distal, si PGAM distal ≥ 20 % de la LIN, dans 2 nerfs, ou dans 1 nerf + ≥ 1 autre paramètre de démyélinisation* dans ≥ 1 autre nerf ;
- Dispersion temporelle (> 30 % d'augmentation de durée du PGAM proximal par rapport au PGAM distal) dans ≥ 2 nerfs ;
- Durée du PGAM distal (intervalle entre le début du pic négatif et son retour à la ligne de base) dans ≥ 1 nerf (médian $\geq 6,6$ ms, ulnaire $\geq 6,7$ ms, péronier $\geq 7,6$ ms, tibial $\geq 8,8$ ms) + ≥ 1 autre paramètre de démyélinisation* dans ≥ 1 autre nerf.

PIDC probable

- Réduction d'amplitude ≥ 30 % du PGAM proximal par rapport au PGAM distal, à l'exclusion du nerf tibial, si le PGAM est ≥ 20 % de la LIN, dans 2 nerfs, ou dans 1 nerf + ≥ 1 autre paramètre de démyélinisation* dans ≥ 1 autre nerf.

PIDC possible

- Mêmes conditions que pour la PIDC certaine, mais seulement dans 1 nerf.
- Pour appliquer ces critères, les nerfs médian, ulnaire (stimulé sous le coude), péronier (stimulé sous le col du péroné) et tibial sont testés d'un côté. Si les critères ne sont pas réunis, les mêmes nerfs sont testés de l'autre côté et/ou les nerfs médian et ulnaire sont stimulés bilatéralement au creux axillaire et au point d'Erb. On ne tient pas compte d'un bloc de conduction du nerf ulnaire au passage du coude. Une diminution d'amplitude d'au moins 50 % entre le poignet et le point d'Erb est requise pour un bloc de conduction probable. La température cutanée doit être maintenue à 33 °C à la paume de la main et à 30 °C à la malléole externe (règles de bonne pratique).

Abréviations : LIN : limite inférieure de la normale ; LSN : limite supérieure de la normale ; PGAM : potentiel global d'action moteur ; PIDC : polyradiculoneuropathie inflammatoire démyélinisante chronique ; VCM : vitesse de conduction motrice.

** N'importe quel nerf répondant à tous les critères.*

(3) Autre examens complémentaires

L'IRM des plexus et des racines nerveuses peut aussi être utile lorsque les lésions démyélinisantes sont très proximales et inaccessibles à l'électrophysiologie conventionnelle. Elle peut alors mettre en évidence dans 30 à 40 % des cas une hypertrophie ou une prise de contraste anormale de la partie proximale des racines nerveuses.

De même, l'analyse des potentiels évoqués sensitifs (PES) peut permettre de mettre en évidence des anomalies proximale non accessibles en électromyographie.

Au plan biologique, il n'y a pas de marqueur spécifique. Des anticorps anti-gangliosides peuvent être retrouvé mais sans qu'aucun profil spécifique ne se détache (17).

(4) Intérêt de la biopsie nerveuse

La biopsie nerveuse permet dans certain cas de confirmer la présence de lésions de démyélinisation que les autres explorations n'auraient pas permis de mettre en évidence. Elle permet également certains diagnostics différentiels de la PIDC (lymphome, amylose, sarcoïdose).

L'examen de la biopsie est réalisé en microscopie optique voir en microscopie électronique et nécessite une expertise spécialisée. De plus, la biopsie nerveuse est réalisée au niveau d'un nerf sensitif, avec de potentielles séquelles cliniques. Cette analyse des fibres purement sensitives et à un seul endroit distal du système nerveux périphérique pose problème dans le cadre de la PIDC qui est une pathologie segmentaire, multifocale et à prédominance motrice. L'analyse de cette biopsie peut ainsi ne pas être représentative de la pathologie en général et de faux négatifs sont possibles.

Pour toutes ces raisons, cet examens est actuellement rarement réalisé et réservé à des cas complexes et atypiques (17,25).

e) **Maladies associées et formes frontières**

(1) **Maladies générales associées**

La PIDC est dans la majorité des cas de forme idiopathique, isolée. Il existe cependant des formes particulières qui peuvent s'associer ou être secondaire à d'autres pathologies avec un lien de causalité direct difficile à prouver. Ces formes sont cliniquement et électrophysiologiquement comparables aux formes idiopathiques. Il faut y penser devant des atypies à l'interrogatoire (antécédents particuliers notamment) ou devant des résultats anormaux retrouvés en général lors du bilan initial. La sévérité de la perte axonale ainsi que la résistance aux traitements immunomodulateurs sont également des éléments orientant.

Voici quelques exemples de ces formes dites secondaires ou associées :

- Etiologies infectieuses : la maladie de Lyme, le VIH et les hépatites chroniques peuvent être associées ou se révéler sous la forme d'une PIDC. Dans ce cas il existe souvent une hypercellularité dans le liquide céphalo-rachidien. Les sérologies infectieuses doivent faire partie du bilan initial.
- Diabète : le diabète peut donner tous les types de neuropathies. Le diabète peut à lui même être responsable d'une hyperprotéinorachie qui doit donc être interpréter différemment dans ce contexte. Certaines données de la littérature vont dans le sens d'un risque accru de développer une PIDC chez les patients diabétiques mais celles-ci sont controversées.
- Maladies systémiques auto-immunes : elles sont à rechercher dans le bilan initial (lupus, sarcoïdose, syndrome de Gougerot- Sjögren, ...).

- Gammopathies monoclonales : la fréquence des gammopathies monoclonales au cours des PIDC varie de 10 à 20 % selon les séries. Dans la majorité des cas il s'agit d'une gammopathie monoclonale de signification indéterminée. La présentation clinique, le pronostic et la prise en charge des PIDC associées aux gammopathies monoclonales de signification indéterminée sont les mêmes que pour les PIDC sans gammopathie monoclonale. Il faut cependant savoir évoquer certaines étiologies particulières :
 - un myélome multiple en cas d'immunoglobuline G (IgG) ou d'immunoglobuline A (IgA).
 - un syndrome POEMS (*Polyneuropathy, Organomegaly, Endocrinopathy, Monoclonal protein and Skin changes*) en présence d'œdèmes, de modifications cutanées, d'une impuissance et de douleurs osseuses. Un bilan radiologique, un myélogramme et un dosage sérique du VEGF sont nécessaires. Il s'agit généralement également d'une IgG ou d'une IgA avec une chaîne légère qui est presque toujours de type lambda.
 - en cas d'immunoglobuline M (IgM), il faudra savoir évoquer une maladie de Waldenström. Il faudra également rechercher une activité spécifique de cette IgM contre un glycolipide du nerf (anti-MAG, anti-GQ1b).
 - une neuropathie amyloïde en cas de dysautonomie, d'une altération de l'état général.
 - un lymphome en cas d'altération de l'état général avec adénopathies et atteinte des paires crâniennes. L'analyse du liquide céphalo-rachidien peut retrouver des lymphocytes pathologiques..

(2) Formes frontières

Les formes frontières correspondent aux autres formes de neuropathies démyélinisantes dysimmunitaires chroniques (**Tableau 2**).

Le syndrome de Lewis et Sumner

La première description par Lewis et Sumner en 1982 vient d'une série de 40 patients atteints de PIDC dont 5 présentaient une clinique atypique avec un déficit sensitif et moteur asymétrique, de systématisation tronculaire. Au bilan électrophysiologique il existait des blocs de conduction moteurs persistants (30).

Il peut être distingué des PIDC classique par l'atteinte multitronculaire. La présence d'une atteinte sensitive permet de le distinguer des neuropathies motrices multifocales à bloc de conduction.

Le syndrome CANOMAD

Le syndrome CANOMAD (*Chronic Ataxic Neuropathy, Ophthalmoplegia, IgM paraprotein, cold Agglutinins and Disialosyl antibodies*) est une cause de neuropathie sensitive très rare. Il associe, dans la forme la plus complète, une neuropathie sensitive, une ophtalmoplégie, une IgM avec activité anticorps antidisialosyl et une agglutinine froide (31).

Formes axonales

Les formes axonales de polyradiculonévrites, qu'elles soient aiguës ou chroniques, sont débattues et rares. En dehors de la polyradiculonévrite aiguë axonale (AMAN, décrite plus haut), aucun autre cadre nosologique ne permet de regrouper ces neuropathies. Le diagnostic peut être évoqué un tableau clinique évocateur mais avec au plan électrophysiologique, une perte axonale sans mise en évidence de démyélinisation, bien que des blocs de conduction très distaux non accessibles à l'exploration électrophysiologique ne puissent être éliminés. La réponse au traitement immunomodulateur peut être un argument pour une origine dysimmunitaire.

Tableau 2 : PIDC et formes frontières			
PIDC	SLS	NMM	Neuropathie à anti-MAG
Sensitivo-moteur	Sensitivo-moteur	Moteur	Sensitif
Symétrique	Asymétrique	Asymétrique	Symétrique
Ataxie	Absence d'ataxie	Absence d'ataxie	Ataxie tardive
Aréflexie généralisée	Aréflexie focale	Réflexes présents	Aréflexie achilléenne, voire généralisée
Évolution progressive ou par poussées	Évolution par poussées	Évolution par poussées	Évolution progressive
Protéïnorachie > 1 g/l	Protéïnorachie < 1 g/l	Protéïnorachie normale	Protéïnorachie < 1 g/l
Démyélinisation diffuse à prédominance proximale	Bloc de conduction	Bloc de conduction	Démyélinisation à prédominance distale
Avec ou sans anticorps antigangliosides	Absence d'auto-anticorps	Anticorps anti-GM1	Anticorps anti-MAG
Immunoglobulines Échanges plasmatiques Corticoïdes	Immunoglobulines	Immunoglobulines	Immunoglobulines Rituximab ?
<i>Abréviations : MAG : Myelin-Associated Glycoprotein ; NMM : neuropathie motrice multifocale ; PIDC : polyradiculoneuropathies inflammatoires démyélinisantes chroniques ; SLS : syndrome de Lewis et Sumner.</i>			

f) Traitements

Seulement trois traitements ont démontré leur efficacité dans la littérature : les immunoglobulines polyvalentes intraveineuses (IGIV), les corticoïdes et les échanges plasmatiques (EP). Les autres traitements utilisés, plutôt en deuxième intention comme les immunosuppresseurs, n'ont pas prouvé leur efficacité dans des études prospectives.

(1) Immunoglobulines humaines polyvalentes

Les IGIV ont démontré leur efficacité dans toutes les études contrôlées contre placebo (34). Les IGIV ont une efficacité rapide dès la première semaine après le traitement dans la majorité des cas (60 %) mais l'effet est transitoire avec nécessité de cures d'entretien dont l'intervalle, variant de 3 à 12 semaines voir plus, est à adapter en fonction du rythme des rechutes pour chaque patient. La dose varie de 1 à 2 g/kg sur 2 à 5 jours. Il y a peu d'effets

secondaires : de façon fréquente il existe des céphalées et de la fièvre pendant la cure. L'insuffisance rénale aiguë reste le principal risque, souvent réversible dans les 10 jours. Une hydratation satisfaisante permet d'éviter cette complication rare.

(2) Corticoïdes

la première série de patients présentant un tableau chronique de polyradiculonévrite fut rapporté par Dyck et al. En 1975 (18). L'efficacité de la corticothérapie a été mise en évidence par la même équipe par la seule étude contrôlée et randomisée à ce jour en comparant 19 patients traités à 16 patients témoins (35). Les autres études évaluant depuis ce traitement furent des études en ouvert qui ont permis de confirmer ce résultat. Le traitement est généralement débuté à la posologie de 1 mg/kg/j, puis diminuer progressivement en fonction de l'efficacité et de la tolérance jusqu'à la dose minimale efficace. Les principaux risques sont les effets secondaires de l'utilisation au long cours de ce type de traitement (ostéoporose, prise de poids, diabète cortico-induit,...).

(3) Echanges plasmatiques

Deux études contrôlées ont démontré l'efficacité des EP (36). Les EP sont réalisés en 5 à 6 séances sur 2 semaines, parfois complétés de séances d'entretien plus espacées pendant le mois suivant, à adapter en fonction de la réponse de chaque patient. Les limites de ce traitement sont, d'une part, son coût élevé et, d'autre part, la nécessité d'avoir recours à des centres spécialisés. Il n'a pas été montré pour le moment de différence significative entre l'efficacité des EP et des IGIV en traitement d'induction.

(4) Traitements de deuxième intention

Aucun autre traitement n'a démontré son efficacité dans une étude contrôlée, certaines études ouvertes auraient montré des résultats encourageants. Les traitements immunosuppresseurs sont cependant tout de même utilisés en deuxième intention sur la base des mécanismes physiopathologiques de la PIDC. Citons principalement comme traitements parfois utilisés : l'azathioprine, le méthotrexate, le mycophénolate mofétil, le cyclophosphamide, le rituximab.

C. Les modèles animaux de polyradiculonévrites

a) Modèle animal de l'AIDP : la névrite auto-immune expérimentale (EAN)

Il existe de nombreux modèles d'EAN développés chez différentes espèces animales et induits selon des protocoles différents :

- EAN dite « classique », induite chez le rat Lewis par immunisation active suite à l'injection avec de la myéline purifiée du SNP, les protéines P0 ou P2 ou de leurs peptides neuritogènes P0(180-199) et P2(57-81), en présence d'adjuvant complet de Freund (ACF) (37,38).
- Une forme moins sévère d'EAN peut être induite chez le rat Lewis par immunisation avec la protéine PMP22 (39).

D'autres modèles existent mais sont moins utilisés car peu reproductibles :

- L'EAN peut également être induite par immunisation passive chez le rat Lewis suite à l'injection de lymphocytes T activés contre la protéine P0 ou P2 ou leurs peptides neuritogènes P0(180-199) et P2(61-70) (40).
- Une forme d'EAN a pu être induite chez la souris C57BL/6 par injection du peptide P0(180-199) avec de la toxine pertussique (41). Mais ce modèle produit une EAN peu sévère et peu reproductible.

- Une forme sévère d'EAN a été induite chez la souris SJL par immunisation active avec de la myéline du SNP associée à une injection de toxine pertussique et d'IL-12 (42).

Le meilleur modèle de PIDC le plus reproductible et le plus utilisé et donc le modèle d'EAN « classique » induit par le peptide P0.

b) Modèle animal de l'AMAN

Il n'existe actuellement pas de modèle murin pour les formes axonales de GBS. Un modèle a été développé chez le lapin par immunisation avec un mélange de gangliosides de cerveau de bœuf (43,44) et a permis de montrer l'importance des anticorps anti-gangliosides dans la physiopathologie de l'AMAN. Ce modèle reste cependant difficilement utilisable.

c) Modèle animal de la PIDC

Il n'existe actuellement pas de réel modèle de PIDC. Plusieurs tentatives ont été réalisées pour induire une EAN chronique ou rémittente pouvant mimer la PIDC :

- Une forme chronique rémittente d'EAN a été induite par transfert répétitif de cellules T autoréactives contre la protéine P2 (45).
- Un modèle d'EAN biphasique fut décrit chez les rats « Dark Agouti » par immunisation par la myéline avec de l'ACF (46).
- Il a été observé chez la souris non obèse diabétique (NOD) déficiente en molécule costimulatrice CD86 (B7-2), le développement spontané d'une polyneuropathie périphérique mimant la progression la PIDC. Ce modèle est caractérisé par une

démyélinisation et une infiltration de cellules mononucléaires (cellules dendritiques, lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺) (47).

Ces différents modèles sont cependant peu reproductibles et d'utilisation difficile.

II. Intérêt des peptides palmitoylés

La S-palmitoylation ou thiopalmitoylation est une modification post-traductionnelle des protéines. Elle consiste en l'addition d'une chaîne palmitique, chaîne saturée à 16 carbones, sur une cystéine *via* une liaison thioester. Les principaux rôles de la palmitoylation des protéines sont la contribution à leur association à la membrane cellulaire et un rôle dans le trafic des protéines.

Le PLP, protéine majeure de la myéline du SNC, possède 6 sites de S-palmitoylation (48) et est une cible auto-antigénique suspectée dans la SEP. Le laboratoire s'est particulièrement intéressé au modèle d'EAE (modèle animal de la SEP) induit par l'immunisation de souris SJL avec la protéine PLP. L'EAE induite par l'injection du peptide encéphalitogène PLP(139-151) associé à de l'ACF est une EAE de forme rémittente. Le laboratoire a montré que le même protocole expérimental mais avec injection du peptide palmitoylé S-Palm-PLP(139-151), comme il existe dans la protéine native, induit un modèle d'EAE plus sévère et plus chronique (49).

La S-palmitoylation semble donc jouer un rôle dans le développement et la chronicité des maladies inflammatoires démyélinisantes (49,50). Dans le but d'obtenir un modèle chronique d'EAN, le laboratoire a étudié les propriétés immunogéniques et neuritogéniques de la forme S-palmitoylée du peptide neuritogène dominant P0(180-199) de la protéine P0, protéine majeure du système nerveux périphérique (**Figure 2**). Ce travail montrait que le peptide S-Palm-P0(180-199) était capable d'induire une atteinte chronique et à rechute des nerfs

périphériques chez le rat Lewis, alors que le peptide P0(180-199) non palmitoylé induit une EAN classique monophasique (51).

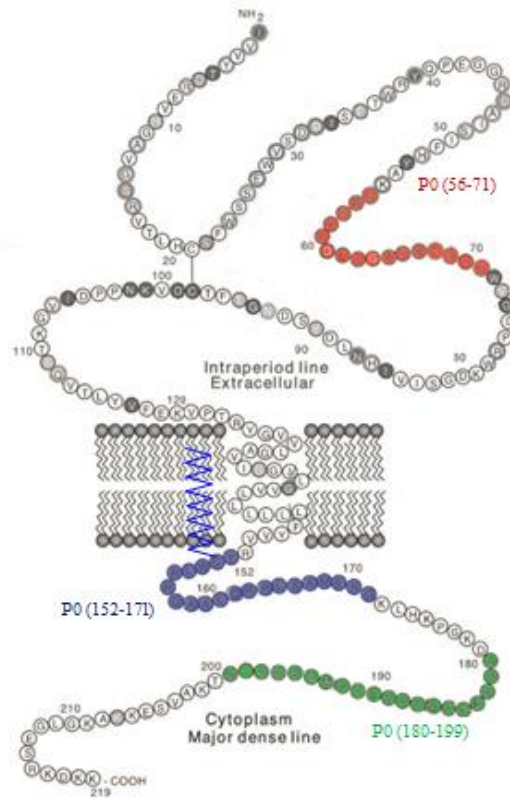


Figure 2 : Modèle d'insertion de la protéine P0 dans la membrane myélinique. En rouge, bleu et vert, les principaux peptides neuritogènes de la protéine P0 (modifié selon Shy ME, 2004) (52).

III. Le Fingolimod

A. Généralités

Le fingolimod (FTY720) est dérivé d'une molécule immunosuppressive, la myoricine, issue d'une plante appelée *Isaria sinclairii* et utilisée dans la médecine traditionnelle chinoise pour

ses propriétés toniques. Le fingolimod, est commercialisé en France depuis 2013 sous le nom de Gilenya®, il s'agissait alors du premier traitement de fond de la SEP administré par voie orale.

Le mécanisme d'action tout d'abord inconnu a été élucidé grâce à la mise en évidence d'une similitude structurelle entre le fingolimod et la S1P, phospholipide naturellement produit au niveau intracellulaire (53) (**Figure 3**). Il s'agit du premier médicament d'une nouvelle classe appelée les modulateurs des récepteurs de la sphingosine-1-phosphate (S1P).

Le fingolimod est le chlorhydrate de 2-amino-2[2-(4-octylphényl)éthyl]propane-1,3-diol. Il est métabolisé par la sphingosine kinase en fingolimod phosphorylé capable de moduler les récepteurs de la sphingosine-1-phosphate.

La S1P est un médiateur lipidique sécrété au niveau intracellulaire puis libéré dans le sang où il pourra réguler de nombreuses fonctions cellulaires et notamment immunitaires. Ce médiateur contrôle ainsi la prolifération, le maintien et la circulation des lymphocytes T et B. Il agit en se liant à des récepteurs spécifiques couplés à des protéines G et notamment au type 1 appelé S1PR1. Il est chargé de réguler la libération des lymphocytes hors des organes lymphoïdes secondaires ou du thymus. Après leur activation, les cellules immunitaires différenciées vont réguler de manière positive l'expression des récepteurs S1PR1 afin de favoriser leur libération dans le sang.

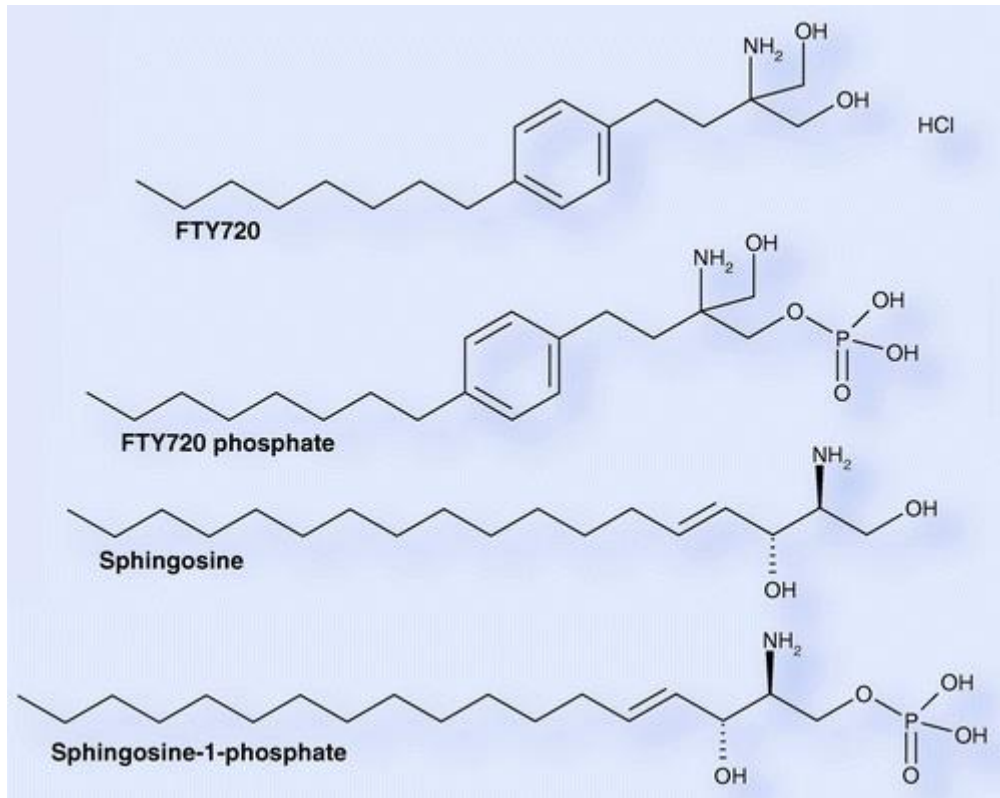


Figure 3 : Similitudes structurelles entre le fingolimod et la sphingosine (modifié d'après Horga et al., 2008) (53)

B. Mécanisme d'action

Une fois phosphorylé, le fingolimod possède une forte affinité pour les sous-unités des récepteurs S1PR1 à la S1P présents sur les lymphocytes. Il agit comme un antagoniste fonctionnel. En effet, dès lors qu'il est fixé aux récepteurs, le fingolimod induit leur internalisation et leur dégradation au sein de la cellule. Il favorise alors la séquestration des lymphocytes activés dans les ganglions lymphatiques et le thymus et empêche leur libération plasmatique et donc leur pénétration dans le SNC, où ils exercent habituellement leur toxicité. Il en résulte une diminution de l'infiltration des lymphocytes pathogènes et notamment des lymphocytes Th17 proinflammatoires.

En agissant ainsi, le fingolimod ne provoque pas de déplétion des cellules immunitaires mais simplement une redistribution. En cas de besoin, ces lymphocytes pourront rapidement être recrutés. Avec une administration quotidienne continue, le taux de lymphocytes diminue significativement en seulement 2 semaines pour atteindre un taux minimal d'environ 500 cellules/microlitre soit 30 % de la valeur initiale.

De plus, il semble que le fingolimod serait également capable de traverser la BHE pour se fixer sur les récepteurs à la S1P des cellules neuronales afin de moduler leur activité directement au sein du SNC. En effet, au niveau cérébral, la S1P semble avoir un rôle de second messager intracellulaire dans la cascade des réactions immunitaires en influençant la prolifération cellulaire, la morphologie et la migration. Ce mécanisme d'action parallèle distingue le fingolimod des autres traitements ciblant essentiellement les cellules immunitaires (53,54).

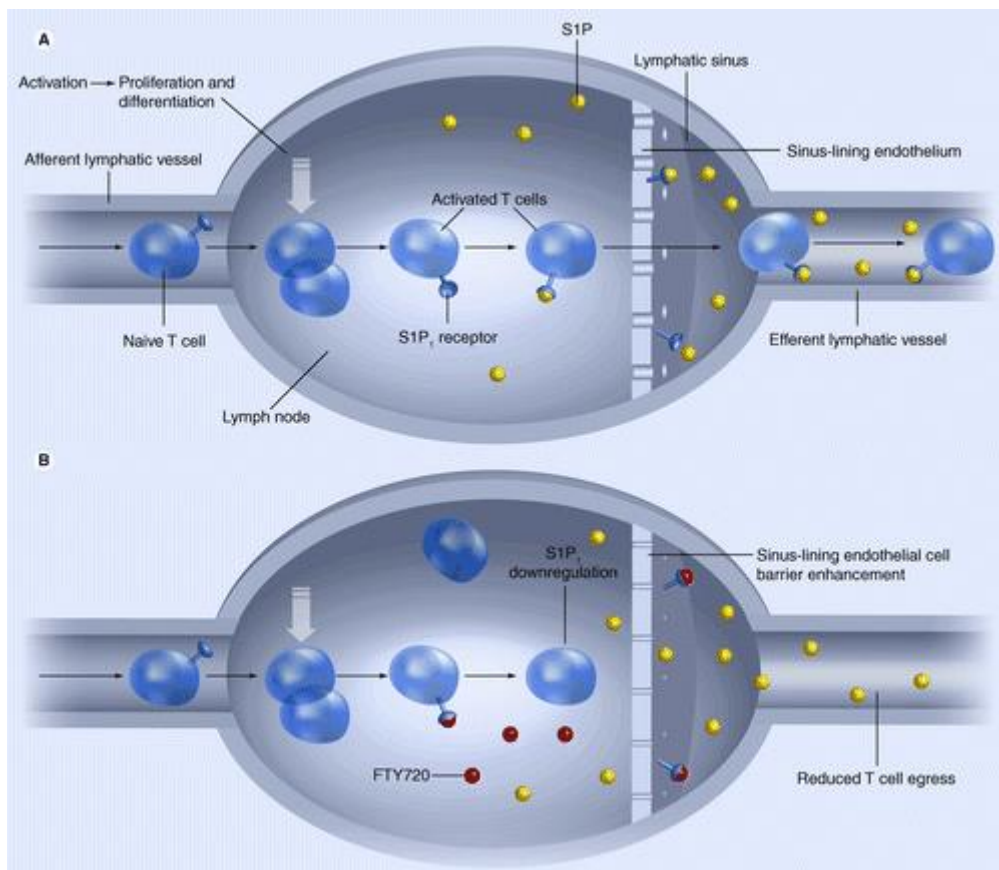


Figure 4 : Mécanisme d'action du fingolimod (modifié d'après Horga et al., 2008) (53)

C. Utilisation thérapeutique actuelle

Gilenya® est indiqué en monothérapie comme traitement de fond des formes très actives de sclérose en plaques (SEP) rémittente-récurrente pour les groupes de patients suivants (55) :

- Patients présentant une forme très active de la maladie malgré au moins un traitement de fond de la sclérose en plaques. Ces patients peuvent être définis comme n'ayant pas répondu à un traitement complet et bien conduit par au moins un traitement de fond de la sclérose en plaques (habituellement d'une durée d'au moins un an). Les patients doivent avoir présenté au moins 1 poussée au cours de l'année précédente alors qu'ils étaient sous traitement et doivent présenter au moins 9 lésions hyperintenses en T2 à l'IRM cérébrale ou au moins 1 lésion rehaussée après injection de gadolinium. Un « non répondeur » peut également être défini comme un patient dont le taux de poussées n'a pas changé ou a augmenté par rapport à l'année précédente, ou qui continue à présenter des poussées sévères.

Ou

- Patients présentant une sclérose en plaques rémittente-récurrente sévère et d'évolution rapide, définie par 2 poussées invalidantes ou plus au cours d'une année associées à une ou plusieurs lésion(s) rehaussée(s) après injection de gadolinium sur l'IRM cérébrale ou une augmentation significative de la charge lésionnelle en T2 par rapport à une IRM antérieure récente.

D. Rationnel de l'utilisation du Fingolimod dans la PIDC

La SEP et la PIDC partagent des mécanismes physiopathologiques communs. En effet, ces deux pathologie sont des maladies auto-immunes, avec rôle prépondérant de l'immunité cellulaire et notamment des lymphocytes T activés, responsables d'une démyélinisation.

De plus, des essais chez l'animal sur le modèle d'EAN ont montré une amélioration clinique chez les animaux traités ainsi qu'une diminution de l'infiltration lymphocytaire T, B, des macrophages et des cellules IL17⁺ dans les lésions induites par l'EAN. Un effet neuroprotecteur en luttant contre l'excitotoxicité glutamatergique a également été décrit (56,57).

Un essai thérapeutique est actuellement en cours chez l'homme afin d'évaluer l'efficacité et la sécurité du Fingolimod (dose de 0.5 mg à 1.25 mg par jour) dans la PIDC (protocole FORCIDP) (58).

IV. Objectifs du travail de thèse

Le premier objectif de ce travail était de valider et de caractériser un modèle animal de polyradiculonévrite inflammatoire démyélinisante chronique, car de premiers résultats encourageants avaient été retrouvés précédemment au laboratoire après immunisation de rats Lewis males avec le peptide S-palm P0(180-199). Pour cela, nous avons reproduit le modèle sur une plus grande cohorte et l'avons caractérisé au plan clinique, histologique, électrophysiologique et immunologique.

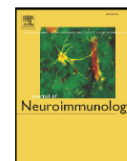
Le deuxième objectif était, à partir de ce modèle fiable et reproductible, de trouver de nouvelles stratégies thérapeutiques efficaces. Pour ce travail, nous nous sommes particulièrement intéressés à l'effet de Fingolimod (FTY720), molécule alors également en essais dans la PIDC humaine. Il s'agit d'un analogue structural de la sphingosine et est un médicament modulateur des récepteurs de la sphingosine-1-phosphate, utilisé depuis peu dans

le traitement de la sclérose en plaques pour ses propriétés immunosuppressives et immunomodulatrices particulières. Une évaluation de son effet dans la PIDC nous a donc semblé intéressante.

ARTICLE 1

Characterization of a new rat model for chronic inflammatory demyelinating polyneuropathies.

Brun S, Beaino W, **Kremer L**, Taleb O, Mensah-Nyagan AG, Lam CD, Greer JM, de Seze J, Trifilieff E. Journal of Neuroimmunology, 2015 Jan 15;278:1-10



Characterization of a new rat model for chronic inflammatory demyelinating polyneuropathies



Susana Brun^{a,1}, Wissam Beaino^{b,1,2}, Laurent Kremer^a, Omar Taleb^a, Ayikoe Guy Mensah-Nyagan^a, Chanh D. Lam^a, Judith M. Greer^c, Jérôme de Seze^a, Elisabeth Trifilieff^{a,*}

^a Biopathologie de la Myéline, Neuroprotection et Stratégies Thérapeutiques, INSERM U1119, Université de Strasbourg, Fédération de Médecine Translationnelle de Strasbourg, France

^b Laboratoire d'Imagerie et de Neurosciences Cognitives (LINC), Université de Strasbourg, CNRS, France

^c The University of Queensland, UQ Centre for Clinical Research, Brisbane, Australia

ARTICLE INFO

Article history:

Received 26 September 2014

Received in revised form 18 November 2014

Accepted 26 November 2014

Available online xxxx

Keywords:

Animal model

Thiopalmitylated P0 peptide

Chronic EAN

CIDP

Electrophysiology

Sciatic nerve immunohistochemistry

Immunology

ABSTRACT

Our objective was to develop a chronic model of EAN which could be used as a tool to test treatment strategies for CIDP. Lewis rats injected with S-palmitylated P0(180–199) peptide developed a chronic, sometimes relapsing–remitting type of disease. Our model fulfills electrophysiological criteria of demyelination with axonal degeneration, confirmed by immunohistopathology. The late phase of the chronic disease was characterized by accumulation of IL-17⁺ cells and macrophages in sciatic nerves and by high serum IL-17 levels. In conclusion, we have developed a reliable and reproducible animal model resembling CIDP that can now be used for translational drug studies.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Guillain-Barré syndrome (GBS) and chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy (CIDP) are autoimmune-mediated inflammatory diseases of the peripheral nervous system (PNS). They are thought to involve both cellular and humoral immunity that can be directed against specific components of the myelin sheath and/or the axon (Hughes et al., 2006; Vucic et al., 2009). GBS comprises several distinct subtypes with specific clinical, electrophysiological, and pathological features, namely: acute inflammatory demyelinating polyneuropathy (AIDP), the most frequent form in Europe and North America; acute motor axonal neuropathy (AMAN), the most prevalent form in China and Japan; acute sensory motor axonal neuropathy (ASMAN); and Miller Fisher syndrome (MFS). CIDP can present with a chronic progressive or relapsing–remitting course, and can be either a sensory or motor polyradiculoneuropathy causing weakness of proximal and distal muscles. It is the most common chronic autoimmune neuropathy, and is

pathologically characterized by focal inflammatory demyelination followed by axonal degeneration (Vallat et al., 2010; Van den Bergh and Rajabally, 2013).

Most of the present knowledge about mechanisms involved in the pathogenesis of immune-mediated demyelination and putative autoantigens in GBS has been obtained through studies in the experimental autoimmune neuritis (EAN) animal model (Mäurer and Gold, 2002; Meyer zu Hörste et al., 2007), which involves active immunization of Lewis rats with peripheral myelin homogenates, myelin proteins, or peptides derived from those proteins; however this monophasic model really only mimics AIDP. Animal models of axonal subtypes have been generated by immunizing rabbits with gangliosides: they support the idea that antigangliosides antibodies cause axonal GBS (Yuki et al., 2001). This rabbit model has also been useful for the pathophysiological understanding of these subtypes of GBS, but is difficult to use to study treatment strategies. Up to now, very few mouse EAN models have been characterized (Xia et al., 2010), mainly because most mouse strains are resistant to EAN induction (Meyer zu Hörste et al., 2007).

CIDP is more difficult to mimic in animal models and in spite of active research in the field, no animal model for CIDP has reached common use (Salomon et al., 2001; Meyer zu Hörste et al., 2007; Soliven, 2012). A relevant chronic EAN model closely resembling CIDP (as shown by electrophysiologic and histologic data), has been described in rabbits following immunization with purified bovine PNS myelin

* Corresponding author at: INSERM U1119, Université de Strasbourg, Faculté de Médecine, 4 rue Kirschleger, 67085 Strasbourg, France.

E-mail address: trif@unistra.fr (E. Trifilieff).

¹ These authors contributed equally to this work.

² Current address: Department of Radiology, Molecular Imaging Laboratory (MIL), University of Pittsburgh, PA, USA.

(Harvey et al., 1987), but rabbits are less convenient to use in preclinical studies. More recently, spontaneous autoimmune polyneuropathy (SAP) in B7-2-deficient non-obese diabetic (NOD) mice, which has some similarities to the human disease and represents an alternative model of CDP, has been characterized: in this model, the mice are protected from diabetes, and all the females exhibit limb paralysis with histologic and electrophysiologic evidence of severe demyelination in the peripheral nerves without spontaneous recovery (Salomon et al., 2001). Although the SAP model has provided some important information about potential immunopathogenic mechanisms of CDP (Soliven, 2012; Ubogu et al., 2012), one drawback for its use in translational therapy strategies studies is its late onset (20 weeks) and slow progression. Thus, there is a need for new animal models of CDP in order to obtain further insights into the immunopathogenic mechanisms and to allow testing of new immunotherapeutic strategies for human CDP.

Previously we reported that thiopalmitoylation (S-palmitoylation i.e., the covalent attachment of palmitic acid via a thioester linkage to a cysteine residue in the polypeptide backbone) of peptides from the PNS myelin P0 protein enhanced their neurotogenic properties and active immunization of Lewis rats with thiopalmitoylated P0(180–199) peptide generated a relapsing–remitting type of disease in some animals (Beaino and Trifilieff, 2010).

In the present study we confirm that thiopalmitoylated P0(180–199) (S-palm P0) can induce a chronic and relapsing–remitting disease resembling CDP, and we describe the clinical, histological, electrophysiological, and immunological features of this new chronic rat model in comparison to the classical monophasic EAN induced with P0(180–199), and discuss its possible relevance to human CDP.

2. Materials and methods

2.1. Peptide synthesis

Peptide P0(180–199) (ACKRGRQTPVLYAMLDHSRS) was manually synthesized by solid phase-synthesis using the Fmoc/tBu strategy. To obtain S-palm P0 peptide [AC(palm) KRGRQTPVLYAMLDHSRS], thiopalmitoylation of residue Cys at position 181 was performed on the resin bound peptide after selective deprotection of the Cys(Mmt) side chain, as we have previously described (Beaino and Trifilieff, 2010). After cleavage from the resin, the crude peptides were lyophilized and purified by reverse phase HPLC. The purity of the peptides was assessed by analytical HPLC and their identities were confirmed by MALDI-TOF mass spectrometry.

2.2. Animals

Male Lewis rats (Charles River, L'Arbresle, France), 7–8 weeks old and weighing 230–250 g were used in the present study. All experiments were approved by the animal experimentation ethical committee of Université de Strasbourg, France.

2.3. Induction of EAN and assessment of clinical signs

Rats were anesthetized i.p. with ketamine chlorhydrate (37 µg/g)/xylazine (Rompun) (5.5 µg/g). Rats were then immunized with peptide P0(180–199) (n = 16) and S-palm P0(180–199) (n = 24), by s.c. injection at the base of the tail of 200 µL of an emulsion containing 200 µg of peptide and 0.5 mg of *Mycobacterium tuberculosis* (strain H37 RA, Difco, Detroit, Michigan, USA) emulsified in 100 µL saline and 100 µL incomplete Freund adjuvant (IFA) (Sigma-Aldrich, St. Quentin Fallavier, France). Two non-injected rats were used as negative controls and complete Freund adjuvant (CFA) injected rats (n = 8) were used as sham control. Body weights and clinical scores were assessed daily from day 0 until 74 days post-immunization (dpi). Severity of paresis was graded as follows: 0 = no illness; 1 = flaccid tail; 2 = moderate paraparesis;

3 = severe paraparesis; 4 = tetraparesis; 5 = death; intermediate scores of 0.5 increments were given to rats with intermediate signs.

2.4. Electrophysiological studies

Rats were anesthetized as described above, and the sensory nerve action potential (SNAP) was recorded on the caudal nerve using two needle electrodes (ALPINE-bioMed, NATUS France) inserted at the tail base, with the stimulating electrodes placed about 50 mm distally. Sciatic nerve motor conduction was assessed by examining the amplitude and the latency of the evoked compound muscle action potentials (CMAP). A stimulating needle electrode was inserted at the hip of the animal (proximal) or at the knee (distal) and two recording needle electrodes (Alpine-bioMed, Natus France) were inserted in the gastrocnemius muscle. Recordings were obtained on a differential amplifier DAM8 (WPI, London, UK) with a filter setting of 10 Hz to 10 kHz. The stimulus waveform (square shape stimuli, 0.1 ms duration) was generated with Clampex acquisition software (P-clamp8 software package, Axon Instruments, LA, US) and the signal was acquired through a Digidata 1224 (Axon Instruments, LA, US).

2.5. Immunohistochemical studies

Rats were deeply anesthetized with Ketamine/Rompun and perfused intracardially with 4 °C, 4% paraformaldehyde (PFA) in PBS. Left and right sciatic nerves, spinal nerve roots, brains and spinal cord were quickly removed and post-fixed overnight at 4 °C in Bouin (left sciatic nerve), periodate lysine-paraformaldehyde (PLP) (right sciatic nerve) or in 4% PFA (for the other organs) and then preserved in 4% PFA. Sciatic nerves and spinal nerve roots were cut in three segments and embedded in paraffin, serially sectioned (5 µm) and mounted on gelatin-covered slides.

After dewaxing, cross sections were heated at 80 °C for 10 min in citrate buffer. Endogenous peroxidase was inhibited with 0.02% H₂O₂ in water for 10 min. Non-specific binding sites were blocked with 5% fetal calf serum (Gibco Invitrogen, Camarillo, CA, USA) in PBS for 30 min and then with the following monoclonal antibodies: anti-MBP (1:50; produced in house) for CNS and PNS myelin; anti-P0 (1:4000; from Dr. Archelos, University of Würzburg, Germany) for PNS myelin; SMI-311 (1:1000; Abcam, Paris, France) for neurofilaments; ED1 (1:400; Serotec, Oxford, UK) for activated macrophages; CD3-clone G4.18 (1:100 on PLP-fixed sciatic nerve; BD Biosciences, Le pont de Claix, France) for T-cells; and anti-interleukin-17 (IL-17; 1:100; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA). Antibody binding to tissue sections was visualized with biotinylated anti-mouse IgG (1:200; Vectastain®, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) and Avidin–Biotin–complex (ABC-peroxidase kit; Vectastain®, Vector Laboratories), followed by development with DAB substrate (Vector® DAB SK-4100, Vector Laboratories) for IL-17, and VIP substrate (Vector® VIP SK-4600, Vector Laboratories) for other antibodies.

Slides were viewed using a Nikon Eclipse E600® optical microscope connected to a Nikon® Digital Sight DS-F1 digital camera. Images were processed using Nikon NIS Elements® software supplied with the camera. Macrophage counting was performed on 3 rats per group and 3 cross-sections per rat in a region of interest of 330 × 430 µm per slide labeled with ED1 antibody. Results are given as mean values per mm². Myelinated fibers were divided in two groups according to their normal size distribution in control sciatic nerve (i.e. small fibers with a diameter < 6.5 µm and large fibers with a diameter > 6.5 µm) and counted as described above on MBP-labeled slides.

Fluorescent immunohistochemistry was performed on 5 µm cross-sections of sciatic nerve embedded in paraffin. After dewaxing, non-specific binding sites were blocked with 5% horse serum (Vector Laboratories) in PBS for 30 min at RT. Sections were then incubated for 1 h at RT with monoclonal anti-P0 (1:4000; from Dr Archelos) and rabbit anti-neurofilament 200 antibody (1:200; from Sigma-Aldrich). Antibody

binding to tissue sections was visualized with Cy3-conjugated donkey anti-mouse IgG or Alexa Fluor 488-conjugated donkey anti-rabbit IgG (1:200 from Jackson ImmunoResearch, Baltimore, USA). Coverslips were mounted in Aquapolymount medium. Immunofluorescence staining was monitored with an Olympus BX60 fluorescent microscope equipped with a 60 \times oil immersion lens, and images were captured with the digital camera DP7V.

2.6. Isolation of serum and lymph node cells

Rats immunized with P0(180–199), S-palm P0(180–199) peptide or CFA were sacrificed after being deeply anesthetized, at 18, 40 and 60 dpi ($n = 4$ /dpi). Blood was collected by heart puncture, allowed to clot, centrifuged, and serum was collected and stored at -70°C . At the same time points, inguinal lymph nodes were removed and prepared separately from individual rats. Lymph node cells (LNC) suspensions were prepared by grinding through a wire mesh. LNC were then washed twice and resuspended in complete RPMI 1640 medium (with glutamine) supplemented with 10% fetal bovine serum, 100 U/ml penicillin/streptomycin, 10 mM HEPES (all from Lonza, Verviers, Belgium) and 50 μM 2-mercaptoethanol.

2.7. Proliferation assay

LNC (2×10^5 per well) were cultured in triplicates in flat-bottom 96-well plates (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) in the presence or absence of 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ P0(180–199). The non-relevant peptide PLP (139–151) (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and Con A (2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) were used as negative and positive controls, respectively. After 72 h of culture, supernatants were harvested and stored frozen at -70°C for cytokine analysis (see below) and proliferation was measured using incorporation of 5'-Bromo-2'-deoxy-uridine (BrdU) into replicating DNA followed by quantitative detection using a Cell Proliferation ELISA, BrdU (Colorimetric) kit (Roche, Mannheim, Germany) as per the manufacturer's instruction. The results are expressed as OD at 450 nm.

2.8. Cytokine determination

The concentrations of cytokines were measured in duplicate in undiluted LNC culture supernatants and sera using commercial ELISA kits specific for rat IFN- γ , IL-4 or IL-10 (all from R&D Systems, Abingdon, UK) or for rat IL-17 (eBioscience, San Diego, CA, USA), as per the manufacturers' instructions. Results are expressed as pg/mL.

2.9. Antibody ELISA

Sera were tested for the presence of anti-P0(180–199) antibodies using ELISA. Peptide was coated onto 96-well plates at 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in 0.05 M carbonate-bicarbonate buffer solution (pH 9.6, 100 $\mu\text{L}/\text{well}$) and incubated overnight at 4°C . Plates were then washed with PBS and blocked with 1% bovine serum albumin in PBS for 1 h at 37°C . After washing, sera (100 $\mu\text{L}/\text{well}$) diluted at 1/5000 were added in duplicate and incubated for 2 h at 37°C . After washing, plates were incubated with goat anti-rat IgG coupled to peroxidase (1:2000, Sigma-Aldrich) for 2 h at 37°C . After extensive washing, each well was incubated with 75 μL of TMB at room temperature until color development. The reaction was stopped by addition of 1 M H_2SO_4 (25 $\mu\text{L}/\text{well}$). Results were expressed in OD at 450 nm.

2.10. Statistical analysis

All values are expressed as mean \pm SEM. Data were analyzed using GraphPad Prism 6 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA). Selection of the appropriate statistical tests was based on the variance and underlying distribution of data. Global effects between groups were assessed using ANOVA with Bonferroni correction for multiple comparisons.

Differences between two groups were compared using 2-sample unpaired Student's t test. A probability of $p < 0.05$ was considered significant.

3. Results

3.1. S-palm P0(180–199) peptide induces a chronic or relapsing course of disease

All rats injected with P0(180–199) in CFA ($n = 11$) developed a classical monophasic EAN with onset at 11.5 ± 0.5 dpi, a maximal clinical score of 3 ± 0.1 , and a duration of clinical signs of 18.3 ± 0.6 days; no relapses were observed in the observation period (up to 74 dpi). In contrast, 100% of the rats injected with S-palm P0(180–199) in CFA ($n = 12$) developed a chronic type of disease with an onset at 11.5 ± 0.5 dpi, a maximal score of 3.7 ± 0.1 at day 17 (Fig. 1A). Following the disease peak in the S-palm P0(180–199) group, some animals ($n = 5$) did not recover, but showed chronic clinical signs up until day 74 (Fig. 1B), whereas the remaining animals ($n = 7$) recovered completely by 28.5 ± 0.7 dpi, but then all relapsed (beginning at 38 dpi) and showed mild neurological deficits up until day 74 (Fig. 1C). The same pattern of results has been replicated in a second series of animals (data not shown).

3.2. Electrophysiological characterization

SNAPs were measured on four rats immunized with P0(180–199) (EAN group) and four rats immunized with S-palm P0(180–199) (chronic group) at 3, 18, 43 and 57 dpi. As shown in Fig. 2A, for EAN rats there was a transient decrease of sensory nerve conduction velocity (SNCV) at 18 dpi (42 ± 3.6 m/s) compared to 3 dpi (60.0 ± 1.3 m/s) followed by a complete recovery at 43 dpi (54 ± 2.3 m/s). In contrast, a significant reduction of SNCV was also observed at 18 dpi for the chronic group (37 ± 0.5 m/s), but no recovery was observed at 43 or 57 dpi (36 ± 0.6 m/s and 34 ± 0.9 m/s). These results strongly suggest that a demyelination of sensory fibers persisted in chronic rats compared to EAN rats.

CMAP amplitudes and latencies were also measured at 3, 18, 43 and 57 dpi. The maximal CMAP amplitudes in the EAN group at all timepoints did not differ significantly from 3 dpi, although there was a high degree of variability at day 43 (26.7 ± 17.6 mV) (Fig. 2B). In contrast, the CMAP amplitude in the chronic group was significantly and strongly reduced at 18 dpi (1.0 ± 0.9 mV), increased up to 30.6 ± 6 mV at 43 dpi and significantly reduced again at 57 dpi (10.2 ± 4.5 mV). These data are indicative of an axonal degeneration/regeneration. No significant changes were observed in the CMAP latencies for the EAN rats, while an increase in latencies was observed for the chronic rats at 57 dpi (2.1 ± 0.3 ms compared to 1.3 ± 0.1 ms at 3 dpi), suggesting the presence of demyelination of motor axons in chronic rats (Fig. 2C).

The distal and proximal CMAP maximal amplitudes were also compared in five chronic rats at 57 dpi. In three rats the distal CMAP amplitudes values were much higher compared to the proximal ones (32.2 , 35.4 and 12.5 mV vs 0.5 , 3.1 and 0.9 mV respectively), strongly suggesting the presence of a conduction block mechanism between the two sites of stimulation at the hip and the knee (Fig. 2D).

3.3. Immunohistological characterization

Examination of the sciatic nerves (Fig. 3) and spinal nerve roots (not shown) of P0(180–199) and S-palm P0(180–199) immunized animals (EAN and chronic group respectively) at 18, 31 and 74 dpi revealed a marked reduction in the number of myelinated fibers at 18 dpi (Fig. 3A, D) and 31 dpi (Fig. 3B, E) followed by regeneration at 74 dpi in both groups (Fig. 3C, F). Notably, the majority of regenerated myelinated fibers in the chronic group at 74 dpi were of smaller diameter than those in the EAN group (Fig. 3G).

4

S. Brun et al. / Journal of Neuroimmunology 278 (2015) 1–10

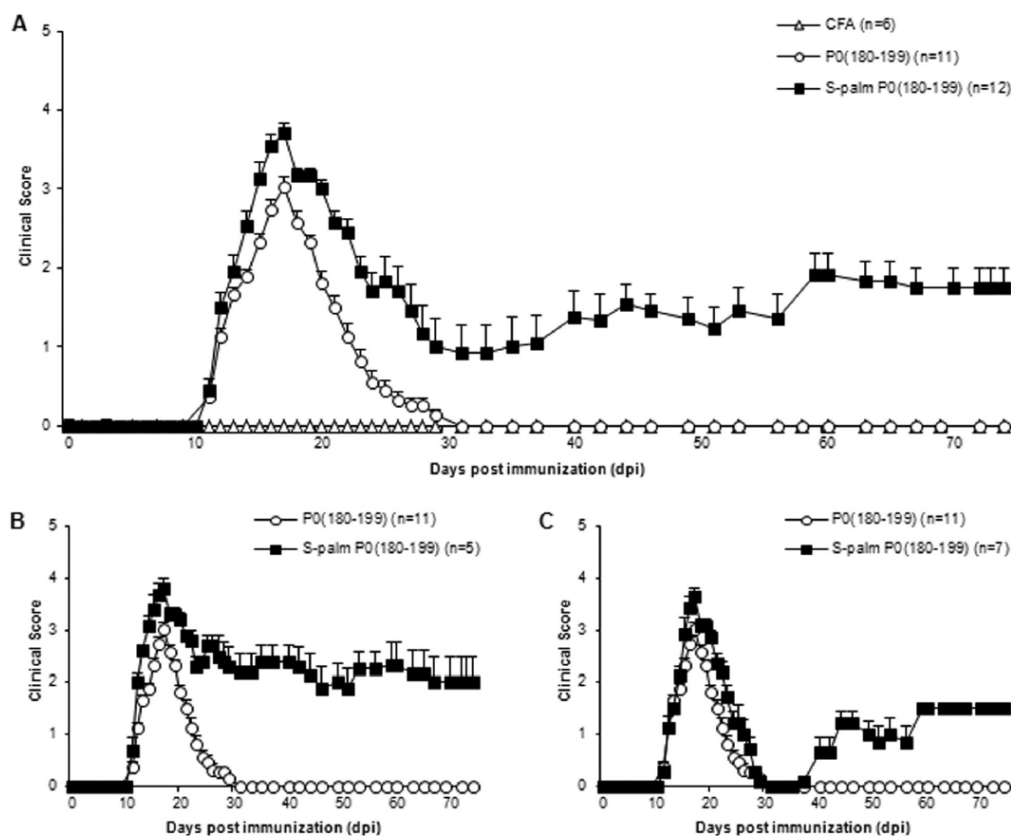


Fig. 1. (A) Clinical course of EAN in Lewis rats immunized with P0(180–199)/CFA (○), S-palm P0(180–199)/CFA (■) or CFA as control (△). (B) Clinical course of 5 out of 12 rats immunized with S-palm P0(180–199) developing a non-remitting chronic type of disease. (C) Clinical course of 7 out of 12 rats immunized with S-palm P0(180–199) developing a relapsing-remitting type of disease. Mean values and SEM are indicated.

We then employed fluorescent immunohistochemical staining of neurofilaments (NF 200 Antibody, intact axons, green), myelin P0 protein (P0-antibody, myelin sheath, red) to investigate the integrity of myelinated fibers in the sciatic nerve of EAN and chronic groups (Fig. 4). A reduction of the number of myelinated fibers at 18 dpi was confirmed in both groups (Fig. 4D, E, F and Fig. 4M, N, O), along with the presence of myelin debris and a few thinly myelinated axons (arrow); demyelinated axons were hardly detected. At 31 dpi in the EAN group an increase in the number of myelinated fibers and small diameter non-myelinated regenerated axons was observed (Fig. 4G, H, I). The same pattern was observed for the chronic group, but with more myelinated fibers of small diameter (Fig. 4P, Q, R). Furthermore, compared to control animals and the EAN group at 74 dpi, the sciatic nerves of rats in the chronic group showed the presence of numerous clustered myelinated axons of small diameter, and very few myelinated fibers of normal diameter (Fig. 4S, T, U).

Histopathological evaluation at 18 dpi showed marked infiltrates of T lymphocytes and macrophages (Fig. 5A, B and E, F) in the sciatic nerves of both groups of rats. However in contrast to the EAN model, where most of the infiltrated cells had disappeared at 74 dpi (Fig. 5C, G), T lymphocytes (Fig. 5D) and particularly macrophages (Fig. 5H, I) persisted in the chronic model until 74 dpi. No significant changes were found in the brains and spinal cords of any of the rats immunized

with P0(180–199) peptide or S-palm P0(180–199) (not shown) indicating that the diseases induced are PNS-specific.

Recently, Th17 cells, producing the cytokine IL-17, have been shown to play an important role in the pathology of various autoimmune diseases (Bettelli et al., 2008). We therefore stained for IL-17-producing cells in the sciatic nerves and spinal nerve roots at 74 dpi. More IL-17⁺ cells were seen in the spinal nerve roots (Fig. 6A, B) than in the sciatic nerve (not shown), with a greater accumulation of these cells in the chronic group.

3.4. LNC proliferative responses of rats immunized with S-palm and non-palm P0(180–199)

LNC from rats immunized 18, 43, 57 days previously with P0(180–199) or with S-palm P0(180–199) were stimulated with antigen in vitro for 3 days and then BrdU uptake was analyzed to assess cell proliferation (Fig. 7). LNC proliferation was significantly increased at 18 dpi in both groups of rats when stimulated with P0(180–199) (but not no antigen or PLP, not shown) compared to control animals immunized only with CFA. At 43 dpi there were no differences in the proliferative response of LNC of rats injected with P0(180–199), which were in the recovery phase, and rats injected with the S-palm peptide which were still in a chronic phase, compared to CFA injected

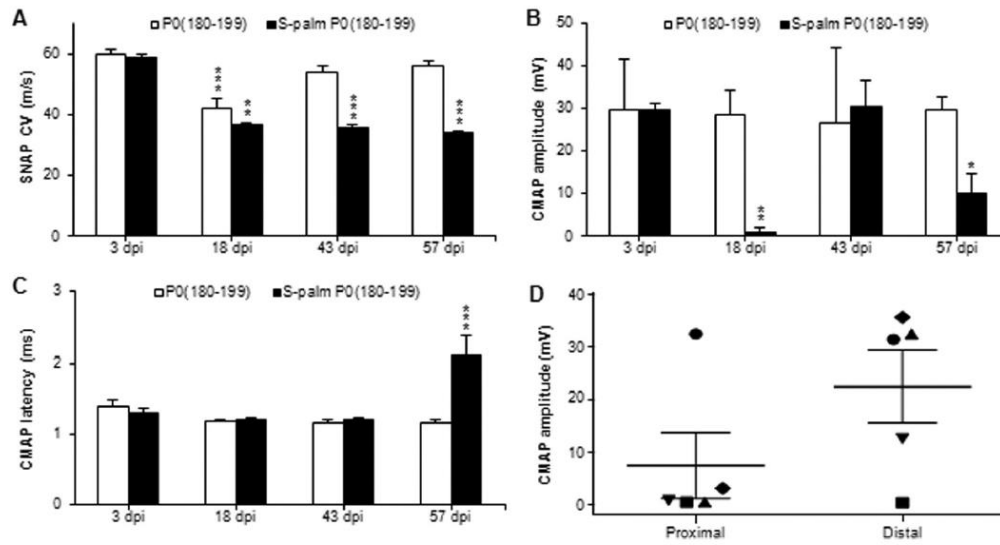


Fig. 2. Electrophysiological changes during the chronic type of disease induced by S-palm P0(180–199) compared to EAN induced by P0(180–199) at 18, 43 and 57 dpi. Values at 3 dpi are used as control. (A) Sensory nerve conduction velocities (SNAP CV) of the caudal nerve suggesting demyelination in chronic rats. (B) CMAP amplitudes obtained after proximal stimulation of the sciatic nerve indicating axonal degeneration/regeneration in chronic rats. (C) Sciatic motor nerve distal CMAP latencies indicative of a demyelination in motor nerves of chronic rats at 57 dpi. (D) Distal and proximal maximal CMAP amplitudes of five individualize chronic rats at 57 dpi. The high distal values measured in three rats suggest the presence of a conduction block. Mean values and SEM are indicated ($n = 4$). P values refer to comparison with control values at 3 dpi ($*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$).

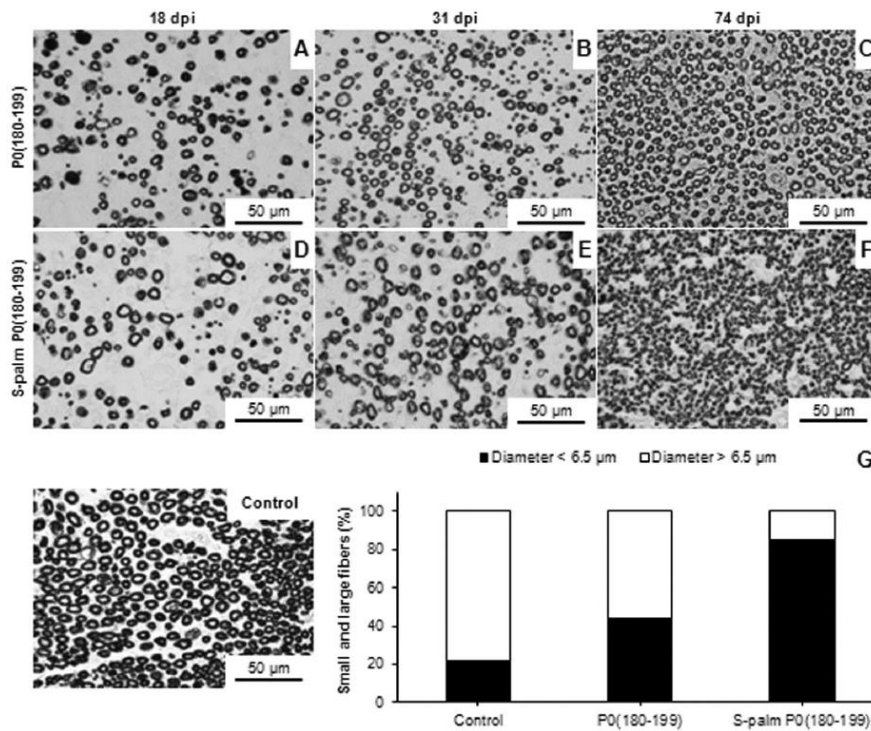


Fig. 3. Immunohistochemical evidence of reduction in the numbers of myelinated fibers, followed by regeneration in the sciatic nerve of EAN ($n = 3$) and chronic ($n = 6$) rats. Cross sections of sciatic nerves of EAN (A–C) and chronic rats (D–F) were labeled with anti-MBP at 18, 31 and 74 dpi. (G) At 74 dpi the majority of remyelinated fibers in chronic rats were of smaller diameter compared to EAN and control rats.

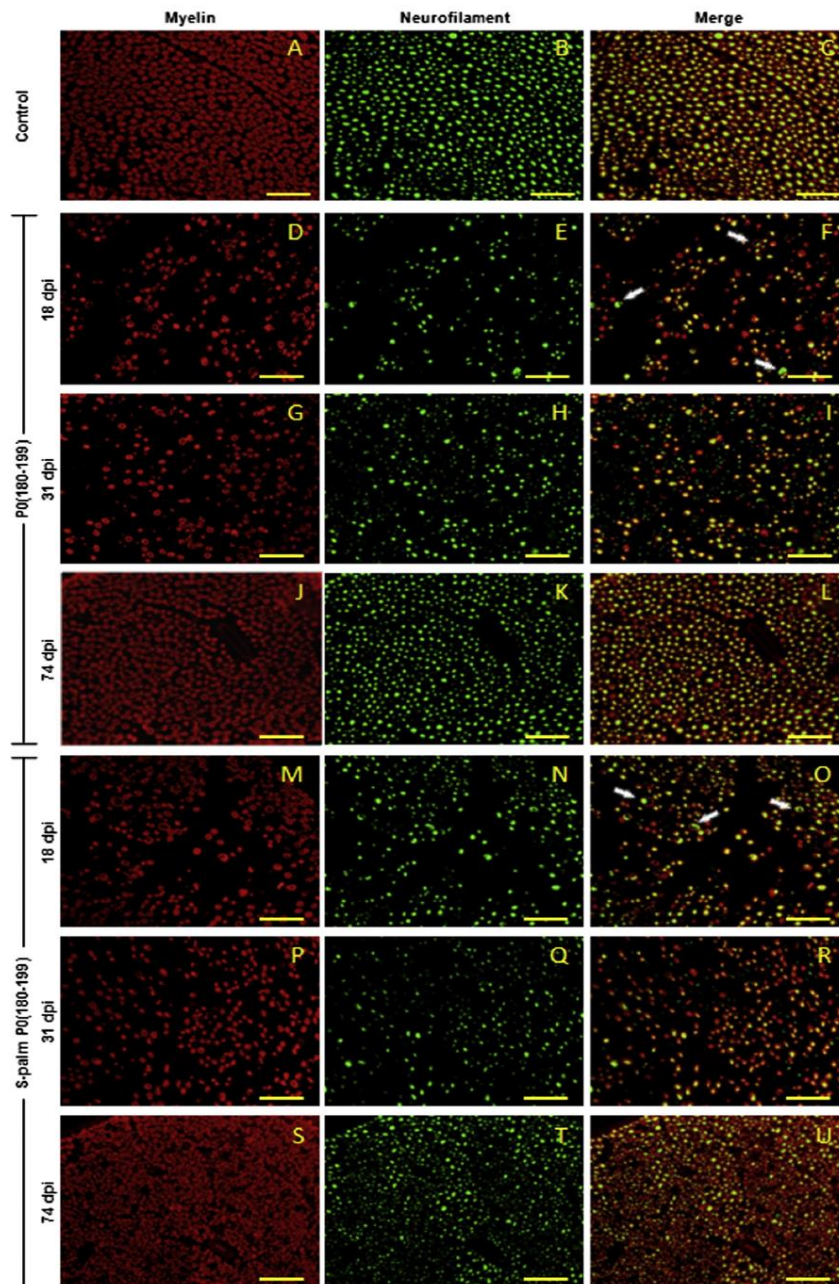


Fig. 4. Representative images of sections stained for P0 protein (anti-P0, myelin sheath, red), and neurofilaments (anti-NF 200, intact axons, green) from control (A, B and C), EAN (D–L) and chronic-EAN (M–U) sciatic nerves at 18, 31 and 74 dpi. White arrows indicate axons surrounded by thin myelin at 18 dpi. Small diameter, non-myelinated regenerating axons are visible at 31 dpi. Scale bar = 50 μ m. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

animals. Proliferation at 57 dpi for S-palm peptide immunized rats, but not for P0(180–199) immunized rats, was significantly different from the controls (Fig. 7A). No antigen or non-relevant PLP peptide were used as negative controls and ConA as a positive control (Fig. 7B).

3.5. Cytokine production induced by immunization with S-palm and non-palm P0(180–199)

To evaluate the effect of S-palm P0(180–199) compared to P0(180–199) on the production of cytokines, we measured levels of 4 key

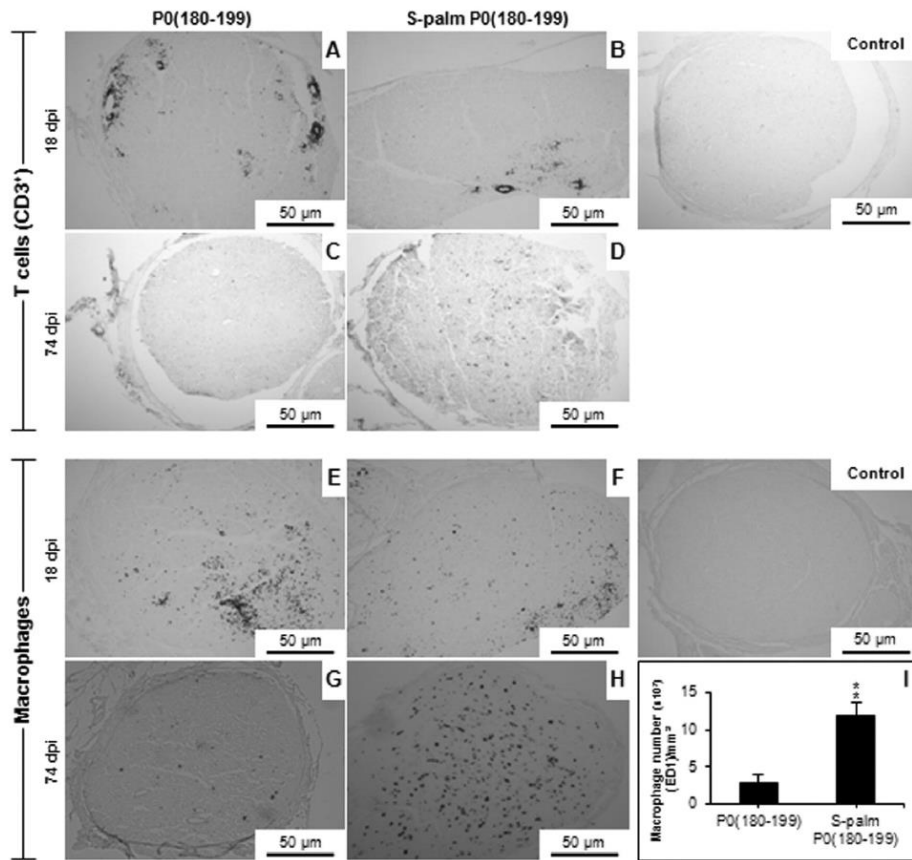


Fig. 5. T cells and macrophages infiltration in the sciatic nerve of EAN ($n = 3$) and chronic ($n = 6$) rats at 18 and 74 dpi. Large infiltrations of T cells (A, B) and macrophages (E, F) around the blood vessels were observed for both groups of rats at 18 dpi. At 74 dpi, a considerable decrease of T cells and macrophages in EAN rats (C, G) and few remaining T cells in chronic rats (D) were observed. In contrast a large number of macrophages distributed throughout the section were present in chronic rat sciatic nerves (H). (I) Macrophage number per mm² at 74 dpi in EAN and chronic rats (mean values and SEM are indicated).

cytokines (IFN- γ , IL-4, IL-10 and IL-17) at different timepoints. Culture supernatants were collected from in vitro cultures of LNC from rats that has been immunized with S-palm or non-palm peptide and stimulated with P0(180–199). At 18 dpi, LNC of P0(180–199)-immunized rats showed increased production of IFN- γ and IL-10, but IL-4 was hardly detected. In contrast, LNC from S-palm P0(180–199)-immunized rats showed elevated levels of all 3 of these cytokines. At 43 dpi, levels of

IFN- γ decreased significantly in both groups, whereas IL-4 levels increased in LNC from P0(180–199)-immunized rats and decreased in LNC from S-palm P0(180–199)-immunized rats, and IL-10 levels remained almost constant. At 57 dpi, production of IFN- γ , IL-4 and IL-10 was not detected in either group (Fig. 8A).

IL-17 levels in LNC from P0(180–199)-immunized rats were increased at 18 dpi, decreased significantly at 43 dpi, and were not detectable at

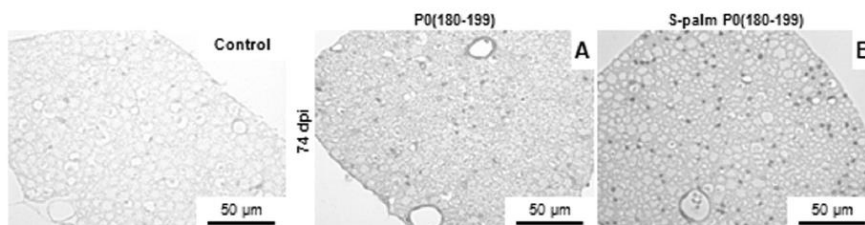


Fig. 6. IL-17⁺ cells in the spinal nerve roots of EAN ($n = 3$) and chronic ($n = 6$) rats at 74 dpi. In spinal nerve roots of EAN rats, single-IL-17⁺ cells were observed occasionally (A), while numerous IL-17⁺ cells were present all over the surface of chronic rat spinal nerve roots (B).

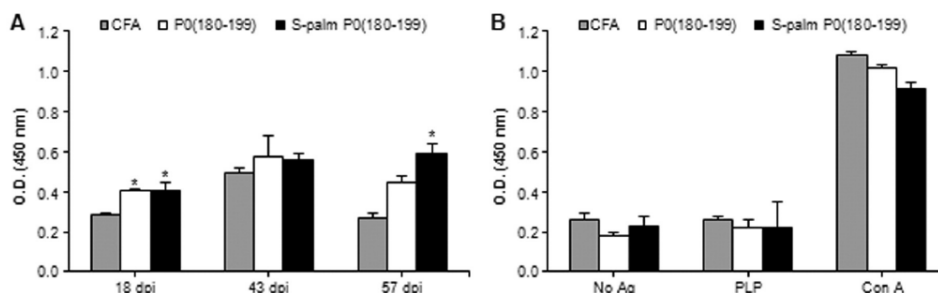


Fig. 7. Assessment of proliferation of antigen-primed LNC with cell proliferation ELISA, BrdU assay. LN were removed from rats immunized with P0(180–199) or S-palm P0(180–199) at 18, 43 and 57 dpi. (A) LNC were cultured and stimulated with P0(180–199) (50 μ g/ml) (3 days). Mean values of OD at 450 nm and SEM are indicated ($n = 4$). P values refer to comparison with P0(180–199)-primed LNC of rats immunized with CFA only ($*p < 0.05$). (B) ConA was used as a positive control and no antigen or PLP(139–151), a non-relevant peptide, as negative controls. Control values at 18, 43 and 57 dpi were similar.

57 dpi, whereas LNC from S-palm P0(180–199)-immunized rats showed an increase at 18 and 43 dpi. At 57 dpi, a production of IL-17 could still be observed, although the level was significantly reduced compared to the level at 18 dpi (Fig. 8B).

IL-17 levels were also measured in the sera from rats collected at 18, 31, 43 and 57 dpi (Fig. 9). For P0(180–199)-immunized rats, IL-17 levels were significantly elevated only in the 18 dpi sample. In contrast, sera from S-palm P0(180–199)-immunized rats IL-17 levels were significantly elevated at all timepoints.

3.6. Antibody responses induced by immunization with S-palm and non-palm P0(180–199)

The ability of S-palm and non-palm P0(180–199) to induce P0(180–199)-specific IgG antibody responses at 18, 31, 43 and 57 dpi was investigated. All samples from both groups produced similar levels of antibodies at 18, 31 and 43 dpi. However, by 57 dpi, the level of antibodies had decreased in rats immunized with P0(180–199), but remained high in serum from rats immunized with S-palm P0(180–199) (Fig. 10).

4. Discussion

Herein we describe a new model of chronic EAN that can be easily and reliably induced by active immunization of 7–8 week male Lewis rats with S-palmitoylated P0(180–199) peptide in the presence of CFA, with selective involvement of the PNS. In contrast to the classical acute monophasic EAN induced by P0(180–199), 100% of rats immunized with S-palm P0(180–199) develop an ongoing neuropathy, either chronic or relapsing; in this, the model resembles the human disease CIDP (Vallat et al., 2010). Furthermore immunohistochemical and electrophysiological features indicate that this new model is an inflammatory, predominantly demyelinating neuropathy, with axonal degeneration and cumulative axonal diameter reduction over time. This study confirms that S-palmitoylation of peptides may provide a simple means to increase the chronicity of inflammatory demyelinating diseases, likely through the induction of a strong Th type of response, as we have shown in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) with PLP encephalitogenic peptides (Greer et al., 2001; Pfender et al., 2008). Therefore S-palm P0 reliably causes more severe disease than does P0 alone.

In CIDP, nerve conduction studies are an excellent diagnostic tool, and electrophysiological measures provide the most objective measure of PNS demyelination (Van den Bergh and Rajabally, 2013). Our model fulfills criteria for demyelination: reduced sensory nerve conduction velocity, prolonged motor latencies and partial motor nerve conduction

block (Van den Bergh PYK, 2004). Though a demyelinating neuropathy, CIDP is associated with a concomitant axonal loss attributed to the primary demyelinating process (Köller et al., 2005), and electrophysiological signs of axonal loss can be determined in CIDP patients (Harbo et al., 2008). In our chronic model, significant axonal degeneration was shown by decreased CMAP amplitudes at different timepoints. Axonal degeneration followed by regeneration was also revealed by histological analyses resulting in numerous clustered axons of small diameter at 74 dpi.

Histopathological evaluation for inflammation showed that T lymphocytes and particularly macrophages persist in the chronic model until 74 dpi, in contrast to the classical EAN model. In CIDP the prominent lymphoid cells in the lesion are macrophages which actively contribute to the demyelination process (Vital et al., 2000); macrophage clustering in sural nerve biopsy of CIDP patients has been described as a possible diagnostic marker (Sommer et al., 2005). Recently it has been suggested that supportive histologic AAN criteria are helpful in diagnosis of CIDP (Kulkarni et al., 2010).

The immunopathogenesis of CIDP remains poorly understood, but it has recently been suggested that Th17 may be an important determinant in the evolution of CIDP (Chi et al., 2010), and Zhang et al. showed that IL-17⁺ cells accumulation in EAN sciatic nerves temporally correlated with severity of neurological signs (Zhang et al., 2009). It was therefore important to investigate the presence of Th17 cells and IL-17 cytokine in our new model. Using immunohistochemistry, we could show that the late phase of disease (74 dpi) was characterized by an accumulation of Th17 cells in spinal nerve roots in chronic EAN but not in EAN rats. Furthermore serum levels of IL-17 were significantly higher in chronic rats compared to EAN rats at all stages of the disease, and a significant level of IL-17 was also detected at 57 dpi in the LNC supernatant. Our results suggest that elevated levels of Th17 cells and IL-17 might be an important determinant in the chronicity of our new chronic-EAN model.

To evaluate the Th1/Th2 balance in the modulation of the disease in monophasic EAN and chronic-EAN rats we measured, in the LNC supernatant, the production of the inflammatory cytokine IFN- γ and the anti-inflammatory cytokines IL-4 and IL-10. Interestingly, production of IL-4 was significantly elevated in the acute phase in chronic animals compared to EAN rats (18 dpi); this may reflect the host's effort to prevent Th1 cells from destroying the peripheral nerves, as suggested by Horiuchi et al., who showed significantly higher IL-4⁺/IFN- γ cell percentages in CIDP patients (Horiuchi et al., 2001). In the recovery phase in monophasic EAN rats (43 dpi), there was a high level of IL-4 produced. In contrast, at 43 dpi, the level of IL-4 produced by chronic animals was extremely low, indicating that this IL-4 decrease may also

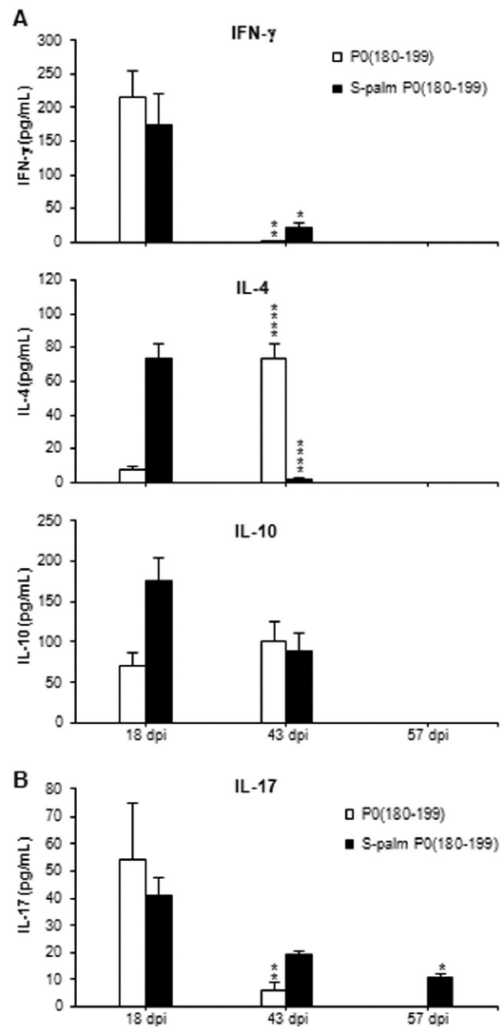


Fig. 8. Levels of cytokines (IFN- γ , IL-4, IL-10 and IL-17) produced by LNC from rats immunized with P0(180–199) or S-palm P0(180–199) at 18, 43 and 57 dpi, following in vitro stimulation with P0(180–199) (50 μ g/ml). Mean values and SEM are indicated ($n = 4$). P values refer to comparison with cytokine levels at 18 dpi (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.0001$). IFN- γ , IL-4 and IL-10 were not detected at 57 dpi. No cytokines were detectable when LNC were stimulated in absence of antigen.

contribute to disease development and chronicity, but further studies are needed to better correlate cytokine expression and evolution of the disease. At the moment, little is known about the roles of cytokines in the evolution of CIDP and research in this field is still in its infancy (Madaia et al., 2009; Rentzos et al., 2012).

Pathophysiological mechanisms implicated in CIDP are believed to involve not only cellular but also humoral immunity. Although no pathogenic antibody has been so far identified in CIDP, it was shown that sera and antibodies from patients with CIDP can induce peripheral demyelination in host animals (Yan et al., 2000). The importance of autoreactive antibodies in CIDP is further emphasized by the success

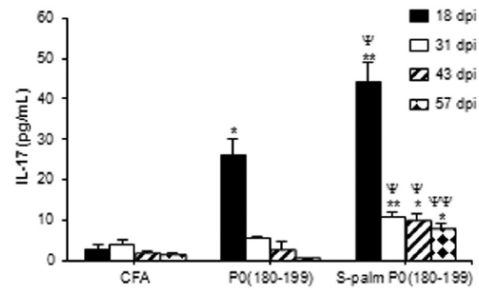


Fig. 9. IL-17 levels in serum from rats immunized with CFA (control), P0(180–199) or S-palm P0(180–199) at 18, 31, 43 and 57 dpi. Mean values and SEM are indicated ($n = 4$). P values refer to IL-17 levels compared to control rats at the same dpi (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$). ΨP values refer to IL-17 levels in rats injected with S-palm P0(180–199) compared to P0(180–199) injected rats at the same dpi (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

of immunoglobulin-depleting therapeutic strategies in human (IVIg, plasma exchange) (Van den Bergh and Rajabally, 2013). We therefore studied in EAN and chronic rats the presence of antibodies against peptide P0(180–199), the inducing antigen. High levels of antibodies were found in chronic rats and EAN rats, but the antibody reactivity remained high in the chronic group for the duration of the disease, whereas it started to decline in the EAN group by day 57. These results confirm our previous findings showing that thiopalmitoylation of peptides can also enhance greater Ab responses (Greer et al., 2001), but further studies are needed to clarify the role of these antibodies in the persistence of chronicity in our model.

In conclusion, the chronic-EAN model we have developed is a reliable and reproducible model that may prove useful for the study of new immunotherapeutic strategies and for translational drug studies for chronic human autoimmune-mediated inflammatory diseases of the PNS, and particularly CIDP, for which, there is a need of new targeted immunotherapies (Dalakas, 2011).

Authorship

S.B. and W.B. contributed equally to this work.

Potential conflicts of interest

Nothing to report.

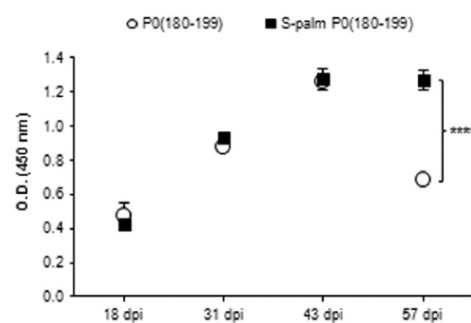


Fig. 10. Peptide P0(180–199)-specific IgG Ab responses in rats immunized with P0(180–199) (○) and S-palm P0(180–199) (■) at 18, 31, 43 and 57 dpi. Mean values and SEM are indicated ($n = 4$). **** $p < 0.0001$ for the comparison of Ab responses at 57 dpi. IgG Abs were not detected in pre- or in CFA immunized rats.

Acknowledgement

We gratefully acknowledge the support of AFMTéléthon (MNM2 2010, MNM1 2013) for this study.

References

- Beaino, W., Trifilieff, E., 2010. Thiopalmitoylated peptides from the peripheral nervous system myelin P0 protein: synthesis, characterization, and neurotogenic properties. *Bioconjug. Chem.* 21, 1439–1447.
- Bettelli, E., et al., 2008. Induction and effector functions of T(H)17 cells. *Nature* 453, 1051–1057.
- Chi, L.J., et al., 2010. Distribution of Th17 cells and Th1 cells in peripheral blood and cerebrospinal fluid in chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. *J. Peripher. Nerv. Syst.* 15, 345–356.
- Dalakas, M.C., 2011. Advances in the diagnosis, pathogenesis and treatment of CIDP. *Nat. Rev. Neurol.* 507–517.
- Greer, J.M., et al., 2001. Thiopalmitoylation of myelin proteolipid protein epitopes enhances immunogenicity and encephalitogenicity. *J. Immunol.* 166, 6907–6913.
- Harbo, T., et al., 2008. Length-dependant weakness and electrophysiological signs of secondary axonal loss in chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. *Muscle Nerve* 38, 1036–1045.
- Harvey, G.K., et al., 1987. Chronic experimental allergic neuritis. An electrophysiological and histological study in the rabbit. *J. Neurol. Sci.* 81, 215–225.
- Horiuchi, I., et al., 2001. Th2 shift in mononeuritis multiplex and increase of TH2 cells in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy: an intracellular cytokine analysis. *J. Neurol. Sci.* 193, 49–52.
- Hughes, R.A.C., et al., 2006. Pathogenesis of chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. *J. Peripher. Nerv. Syst.* 11, 30–46.
- Köller, H., et al., 2005. Chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *N. Engl. J. Med.* 352, 1343–1356.
- Kulkarni, G., et al., 2010. Sural nerve biopsy in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy: are supportive pathologic criteria useful in diagnosis? *Neurol. India* 58, 542–548.
- Madia, F., et al., 2009. pSTAT1, pSTAT3, and T-bet as markers of disease activity in chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. *J. Peripher. Nerv. Syst.* 14, 107–117.
- Mäurer, M., Gold, R., 2002. Animal models of immune-mediated neuropathies. *Curr. Opin. Neurol.* 15, 617–619.
- Meyer zu Hörste, G., et al., 2007. From bench to bedside – experimental rationale for immune-specific therapies in the inflamed peripheral nerve. *Nat. Clin. Pract. Neurol.* 3, 198–211.
- Pfender, N.A., et al., 2008. Route of uptake of palmitoylated encephalitogenic peptides of myelin proteolipid protein by antigen-presenting cells: importance of the type of bond between lipid chain and peptide and relevance to autoimmunity. *J. Immunol.* 180, 1398–1404.
- Rentzos, M., et al., 2012. Proinflammatory cytokines in serum and cerebrospinal fluid of CIDP patients. *Neurol. Res.* 34, 842–846.
- Salomon, B., et al., 2001. Development of spontaneous autoimmune peripheral neuropathy in B7-2-deficient NOD mice. *J. Exp. Med.* 194, 677–684.
- Soliven, B., 2012. Autoimmune neuropathies: insights from animal models. *J. Peripher. Nerv. Syst.* 17 (SI), 28–33.
- Sommer, C., et al., 2005. Macrophages clustering as a diagnostic marker in sural nerve biopsies of patient with CIDP. *Neurology* 65, 1924–1929.
- Ubogu, E.E., et al., 2012. Behavioral, electrophysiological, and histopathological characterization of a severe murine chronic demyelinating polyneuritis model. *J. Peripher. Nerv. Syst.* 17, 53–61.
- Vallat, J.-M., et al., 2010. Chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy: diagnostic and therapeutic challenges for a treatable condition. *Lancet Neurol.* 9, 402–412.
- Van den Bergh PYK, P.F., 2004. Electrodiagnostic criteria for acute and chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. *Muscle Nerve* 29, 565–574.
- Van den Bergh, P.Y.K., Rajabally, Y.A., 2013. Chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. *Presse Med.* 42, e203–e215.
- Vital, C., et al., 2000. Chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy: immunopathological and ultrastructural study of peripheral nerve biopsy in 42 cases. *Ultrastruct. Pathol.* 363–369.
- Vucic, S., et al., 2009. Guillain-Barré syndrome: an update. *J. Clin. Neurosci.* 16, 733–741.
- Xia, R.H., et al., 2010. Clinical, electrophysiological and pathologic correlations in severe murine experimental autoimmune neuritis model of Guillain-Barré syndrome. *J. Neuroimmunol.* 219, 54–63.
- Yan, W., et al., 2000. Passive transfer of demyelination by serum or IgG from chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy patients. *Ann. Neurol.* 47, 765–775.
- Yuki, N., et al., 2001. Animal model of axonal Guillain-Barre syndrome induced by sensitization with GM1 ganglioside. *Ann. Neurol.* 49, 172–170.
- Zhang, Z.-Y., et al., 2009. FTY720 attenuates lesional interleukin-17⁺ cell accumulation in rat experimental autoimmune neuritis. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 35, 487–495.

ARTICLE 2

Chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy: A new animal model for new therapeutic targets.

de Seze J, Kremer L, Alves do Rego C, Taleb O, Lam CD, Beiano W, Mensah-Nyagan AG, Trifilieff E, Brun S. *Revue Neurologique*, 2016 Dec;172(12):767-769



ELSEVIER

Available online at

ScienceDirect

www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France

EM|consulte

www.em-consulte.com



8th meeting of the Société Francophone du Nerf Périphérique

Chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy: A new animal model for new therapeutic targets

J. de Sèze^{*}, L. Kremer, C. Alves do Rego, O. Taleb, D. Lam, W. Beiano, G. Mensah-Nyagan, E. Trifilieff, S. Brun

Biopathologie de la myéline, neuroprotection et stratégies thérapeutiques, UMRS, Inserm U1119, université de Strasbourg, fédération de médecine translationnelle de Strasbourg (FMTS), faculté de médecine, 11, rue Humann, 67000 Strasbourg, France

INFO ARTICLE

Article history:

Received 1st March 2016

Received in revised form

6 May 2016

Accepted 24 May 2016

Available online xxx

Keywords:

CIDP

Animal models

Treatment

Autoimmune

ABSTRACT

Animal models are fundamental to advance knowledge of disease pathogenesis and to test/develop new therapeutic strategies. Most of the current knowledge about the pathogenic mechanisms underpinning autoimmune demyelination processes implicating autoantigens has been obtained using the Experimental Autoimmune Neuritis (EAN) animal model. The most widely used EAN model is obtained by active immunization of Lewis rats using a peptide, P0 (180–199), issuing from the major peripheral nervous system myelin protein. But this model mimics only the classical monophasic acute form of demyelinating polyradiculoneuropathy, i.e. Guillain-Barré syndrome (GBS). We developed a new model by immunizing Lewis rats using the same immunodominant neuritogenic peptide P0 (180–199) but this time with its S-palmitoyl derivative, S-palm P0 (180–199). All of the animals immunized with the S-palm P0 (180–199) peptide developed a chronic relapsing-remitting form of the disease corresponding to the electrophysiological criteria of demyelination (slow sensory nerve conduction velocity, prolonged motor nerve latency, partial motor nerve conduction blocks) with axon degeneration. These findings were confirmed by immunohistopathology study and thus, appear to mimic human chronic inflammatory demyelinating polyradiculopathy (CIDP). This new model opens up new avenues of research for testing new anti-inflammatory and neuroprotective therapeutic strategies.

© 2016 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Guillain-Barré syndrome (GBS) and chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy (CIDP) are two autoimmune inflammatory diseases of the peripheral nervous system (PNS) characterized by a reaction directed against

certain proteins of the myelin sheath. GBS is an acute monophasic disease with different subtypes each with specific electrophysiological and histopathological characteristics. CIDP can be considered as the chronic form of GBS. It is

^{*} Corresponding author at: Service de neurologie, hôpital Hautepierre, 1, avenue Molière, 67098 Strasbourg cedex, France.

E-mail address: jerome.de.seze@chru-strasbourg.fr (J. de Sèze).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.neurol.2016.05.006>

0035-3787/© 2016 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

characterized by a demyelination process affecting the PNS for a period of at least eight weeks, then becoming a chronic, progressive or relapsing-remitting disease. CIDP is a rare disease with an estimated prevalence of 1–7/100,000. It can be observed at all ages but preferentially in the 40–60 year age group. CIDP leads to motor and sensory disorders (numbness, paresthesia...) [1]. Although it is known to be a basically cell-mediated autoimmune disease, the precise pathogenic mechanisms producing CIDP remain unknown. Nerve biopsy material has however revealed the presence of macrophages and T-lymphocytes secreting pro-inflammatory cytokines that could be potentially involved in the demyelination process. It has also been noted that certain patients with CIDP carry antibodies directed against myelin proteins (especially protein P0). Injections of these antibodies can induce demyelination in the Lewis rat but the antigen target responsible for the immune response remains, to date, unidentified [2,3].

1. Animal model of GBS and CIDP

Animal models provide important information for advancing our knowledge of disease pathogenesis and for testing/developing new therapeutic strategies. Most of the current knowledge about the pathogenic mechanisms underpinning autoimmune demyelination processes implicating autoantigens has been obtained using the Experimental Autoimmune Neuritis (EAN) animal model. The most widely used EAN model is obtained by active immunization of Lewis rats using a peptide, P0 (180–199), issuing from the major PNS myelin protein. But this model mimics only the classical monophasic acute form of demyelinating polyradiculoneuropathy, i.e. GBS also called acute inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy (AIDP).

Until now, animal models of CIDP have been unable to reliably mimic the chronic or recurrent form of the disease. A few years ago, we worked with an animal model of multiple sclerosis (Experimental Autoimmune Encephalomyelitis, EAE) and demonstrated that palmitoylation of immunogenic myelin proteolipoprotein antigens could amplify the disease and turn it into a chronic condition [4,5].

We attempted to apply this same strategy to the previously known EAN model in order to develop a new animal model of CIDP, EAN-chronic, that would be easy to use and reproducible. This animal model was developed in the Lewis rat by active immunization using the immune-dominant P0 (180–199) neuritogenic protein, but this time with an S-palmitoyl derivative, S-palm P0 (180–199) [5–7]. S-palmitoylation is a post-translation modification consisting in thioesterization of a 16-C saturated palmitic chain onto a protein cysteine moiety. All of the animals immunized with the S-palm P0 (180–199) protein develop symptoms mimicking a chronic or relapsing-remitting disease exhibiting the electrophysiological criteria for demyelination (slow sensory nerve conduction velocity, prolonged motor nerve latency and partial motor nerve conduction blocks) with axon degeneration. These findings were confirmed by immunohistopathology study and appear to closely mimic human CIDP [1].

At the same time, it was recently demonstrated that interleukin-17 (IL-17) plays a major role in certain autoimmune

diseases, notably multiple sclerosis and GBS [8]. The histology findings in our CIDP model have demonstrated that in its active phase (d74), the disease is characterized by the accumulation of macrophages and IL-17+ cells in the sciatic nerve and in the cauda equina. The serum level of IL-17 is also increased in the chronic model compared with the acute EAN model (induced with the non-palmitoyl P0 (180–199) peptide). Finally, lymphocyte-T infiltrates have been found in the sciatic nerves and cauda equina of both models, but persistently, through the entire duration of the disease, in the chronic model. These data are quite in line with the study by Vital et al. [9] who suggested that macrophages participate in the demyelination process, although the precise pathophysiological mechanisms operating in CIDP remain unknown. Based on this, we have developed a reliable and reproducible preclinical animal mode of CIDP that can now be used for the development of therapeutic strategies.

We have thus started testing different compounds with this animal model. Polyvalent immunoglobulins can control the disease, as is observed in the EAN model and in humans. Fingolimod, also tested in phase three clinical trials, appears to avoid progression to the chronic phase of the disease (manuscript in progression) when administered at symptom onset in our model (as has also been demonstrated in the EAN model).

Other compounds are currently under investigation in our laboratory. Altered peptide ligands, derivatives of the palmitoyl P0 peptide, appear to be effective, both for prevention and for cure. We are also testing Lupuzor[®], another immunogenic peptide issued from immunology research in Strasbourg and tested in phase III lupus trials. The preliminary results have been very promising, inciting us to test this strategy in humans (manuscript in preparation).

Finally, we are trying to create an axonal GBS model by palmitoylation of another P0 cysteine. This form called acute motor axonal neuropathy (AMAN) corresponds to the most common presentation of GBS in Asia, particularly Japan; the prognosis of AMAN is very unfavorable. Development of this particular form of GBS could allow us to test the neuroprotective compounds now being developed in our laboratory. Since the implication of P0 has not been proven, it would be interesting to create animal models with new antigenic targets such as the proteins contactin, caspr, or NF155, for which recent data appear to demonstrate a pathophysiological link with CIDP [10].

2. Conclusion

The development of new animal models for chronic autoimmune neuropathies would allow a better understanding of the pathophysiology of these recently individualized diseases and thus favor the development of new anti-inflammatory and neuroprotective therapeutic strategies.

Disclosure of interest

This work was supported by Novartis and the French laboratory of biotechnology.

REFERENCES

- [1] Vallat JM, Sommer C, Magy L. Chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy: diagnostic and therapeutic challenges for a treatable condition. *Lancet Neurol* 2010;9:402–12.
- [2] Hughes RA, Allen D, Makowska A, Gregson NA. Pathogenesis of chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. *J Peripher Nerv Syst* 2006;11:30–46.
- [3] Linington C, Lassmann H, Ozawa K, Kosin S, Mongan L. Cell adhesion molecules of the immunoglobulin supergene family as tissue-specific autoantigens: induction of experimental allergic neuritis (EAN) by P0 protein-specific T cell lines. *Eur J Immunol* 1992;22:1813–7.
- [4] Greer JM, Denis B, Sobel RA, Trifilieff E. Thiopalmitoylation of myelin proteolipid protein epitopes enhances immunogenicity and encephalitogenicity. *J Immunol* 2001;166:6907–13.
- [5] Pfender NA, Grosch S, Roussel G, Koch M, Trifilieff E, Greer JM. Route of uptake of palmitoylated encephalitogenic peptides of myelin proteolipid protein by antigen-presenting cells: importance of the type of bond between lipid chain and peptide and relevance to autoimmunity. *J Immunol* 2008;180:1398–404.
- [6] Beaino W, Trifilieff E. Thiopalmitoylated peptides from the peripheral nervous system myelin P0 protein: synthesis, characterization and neuritogenic properties. *Bioconjug Chem* 2010;21:1439–47.
- [7] Brun S, Beaino W, Kremer L, Taleb O, Mensah-Nyagan AG, Lam CD, et al. Characterization of a new rat model for chronic inflammatory demyelinating polyneuropathies. *J Neuroimmunol* 2015;278:1–10.
- [8] Wang X, Ma C, Wu J, Zhu J. Roles of T helper 17 cells and interleukin-17 in neuroautoimmune diseases with emphasis on multiple sclerosis and Guillain-Barré syndrome as well as their animal models. *J Neurosci Res* 2013;91:871–81.
- [9] Vital C, Vital A, Laguény A, Ferrer X, Fontan D, Barat M, et al. Chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy: immunopathological and ultrastructural study of peripheral nerve biopsy in 42 cases. *Ultrastruct Pathol* 2000;24:363–9.
- [10] Zimmer R, Scherbarth HR, Rillo OL, Gomez-Reino JJ, Muller S. Lupuzor/P140 peptide in patients with systemic lupus erythematosus: a randomised, double-blind, placebo-controlled phase IIb clinical trial. *Ann Rheum Dis* 2013;72:1830–5.

ARTICLE 3

FTY720 (Fingolimod) controls the disease severity and attenuates sciatic nerves damages in rats with chronic experimental autoimmune neuritis

Laurent Kremer, Omar Taleb, Nelly Boehm, Ayikoe Guy Mensah-Nyagan, Elisabeth Trifilieff, Jérôme de Seze, Susana Brun (*soumis dans Journal of Neuroinflammation*)

**FTY720 (FINGOLIMOD) CONTROLS THE DISEASE SEVERITY AND
ATTENUATES SCIATIC NERVES DAMAGES IN RATS WITH
CHRONIC EXPERIMENTAL AUTOIMMUNE NEURITIS**

Laurent Kremer^{1,2,3}, Omar Taleb^{1,2}, Nelly Boehm^{2,4}, Ayikoe Guy Mensah-Nyagan^{1,2},
Elisabeth Trifilieff^{1,2}, Jérôme de Seze^{1,2,3}, Susana Brun^{1,2}

¹ INSERM UMR_S U1119 Biopathology of Myelin, Neuroprotection and Therapeutic Strategies, University of Strasbourg, Strasbourg, France

² Fédération de Médecine Translationnelle de Strasbourg (FMTS), France

³ Department of Neurology, University Hospital of Strasbourg, Strasbourg, France.

⁴ Faculty of Medicine, Institute of Histology, University of Strasbourg, Strasbourg, France.

Laurent KREMER, MD: laurentdaniel.kremer@chru-strasbourg.fr

Omar TALEB, PhD: omar@unistra.fr

Nelly Boehm, MD, PhD: boehm@unistra.fr

Ayikoe Guy MENSAH-NYAGAN, PhD: gmensah@unistra.fr

Elisabeth Trifilieff, PhD: elisabeth.trif@noos.fr

Jérôme DE SEZE, MD, PhD: jerome.de.seze@chru-strasbourg.fr

Susana BRUN, PhD: susana.brun@unistra.fr

Correspondance to: Susana Brun, PhD, Biopathologie de la Myéline, Neuroprotection et Stratégies Thérapeutiques, INSERM U1119/Université de Strasbourg. Faculté de Médecine, 11 rue Humann, 67085, Strasbourg, France. E-mail: susana.brun@unistra.fr

ABSTRACT

Background: Chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy (CIDP) is an autoimmune-mediated inflammatory disease of the peripheral nervous system (PNS) characterized by a response directed against certain myelin proteins and for which therapies are limited. Previous studies have suggested a beneficial role of FTY720 (fingolimod), a sphingosine 1 phosphate (S1P) receptor agonist, known to deplete lymphocytes from the peripheral blood by sequestering them into lymph nodes, in the treatment of experimental autoimmune neuritis (EAN). Therefore, we investigated whether FTY720 is also beneficial in recently developed rat model mimicking human CIDP, the chronic-EAN (c-EAN).

Methods: c-EAN was induced in Lewis rats by immunization with palm-P0(180-199) peptide. Rats were treated with FTY720 (1 mg/kg) intraperitoneally once daily from the onset of clinical signs for 18 days and clinical signs were assessed daily until 60 days post-immunization (dpi). Electrophysiological and histological features were examined at different time-points. We also evaluated the serum levels of different pro and anti-inflammatory cytokines by ELISA or flow cytometry at 18, 40 and 60 dpi.

Results: Our data demonstrate that FTY720 can decrease the severity and suppress the chronicity of the disease in c-EAN rats. Interestingly, therapeutic FTY720 treatment reverse electrophysiological and histological anomalies suggesting that a demyelination was restored following, inhibit macrophage and IL-17⁺ cells infiltration in PNS and significantly reduce circulating pro-inflammatory cytokines.

Conclusions: Here we show the benefic effects of FTY720 on c-EAN, a new animal model mimicking human CIDP. FTY720 treatment shown to be an effective immunomodulatory agent by improving the disease course, attenuating the demyelination and axonal degeneration and decreasing the number of infiltrating inflammatory cells into peripheral nerves. These data confirm the interest of testing fingolimod or molecules targeting S1P in human peripheral neuropathies.

Keywords: Chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathie, c-EAN, FTY720, inflammatory neuropathies

Background

Chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy (CIDP) is considered as an autoimmune-mediated disease affecting the peripheral nerves. It is thought to involve both cellular and humoral immunity that can be directed against specific components of the myelin sheath and/or the axon. The disease course is usually separated into chronic, progressive or relapsing–remitting forms, and can be either a sensory or motor polyradiculoneuropathy causing a symmetric, proximal or distal muscle weakness which develops over more than two months. It is the most common chronic autoimmune neuropathy, and is pathologically characterized by focal inflammatory demyelination followed by axonal degeneration (1-5).

Currently there are only three validated treatments in CIDP. The treatment options consist of a suppression of autoimmune responses by intravenous immunoglobulins, plasma ex-change or corticosteroids that have proven their efficacy and are used in the short and long terms. However, some difficulties need to be considered: even if about two-thirds of patients respond to one of the three therapies, there is a small percentage of patients do not respond to any therapy; the serious long-term side effects of corticosteroids; the availability, cost, safety and adverse events related to administration routes (4, 6-12). Therefore, it will be necessary to establish more effective therapeutic strategies for chronic inflammatory polyneuropathies.

We recently develop a new model of chronic experimental autoimmune neuritis (c-EAN) that can be easily and reliably induced by active immunization of Lewis rats with the P0(180-199) peptide palmitoylated (palm P0(180-199)) at cysteine 181 (13, 14), with selective involvement of the PNS. In contrast to the classical acute monophasic EAN induced by P0(180–199) and mimicking Guillain-Barré syndrome, 100% of rats immunized with S-palmP0(180–199) develop an ongoing neuropathy, either chronic or relapsing that fulfills electrophysiological criteria of demyelination with axonal degeneration, confirmed by immunohistopathology. Interestingly, the late phase of the chronic disease is characterized by accumulation of IL-17⁺ cells, macrophages and T cells in sciatic nerves and by high IL-17 levels in the serum. The chronic-EAN model bears considerable similarities to those of CIDP (1) supporting the use of this model for translational drug studies.

Fingolimod (FTY720) is a synthetic analog of sphingosine 1 phosphate (S1P) which had a high bind affinity to S1P receptors, particularly to S1P₁ and S1P₃₋₅ (15, 16). Indeed, FTY720

undergoes phosphorylation *in vivo* by sphingosine kinase 2 (17) for converting to its active form, FTY720-phosphate. This form acts through S1P receptor signaling pathway regulating a variety of immunological processes like the egress of lymphocytes from secondary lymphoid organs thereby causing a reduced lymphoid cell count in peripheral blood (16, 18-20). Due to its effect to deplete peripheral lymphocytes, Fingolimod provided therapeutic benefits in animal models of multiple sclerosis and in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis by reducing the infiltration of lymphocytes into the central nervous system and so, less neuroinflammation (21-23). In three phase 3 clinical trial, oral Fingolimod significantly reduced patients relapse rate, MRI lesion activity and decreased risk of disability progression when compared to placebo group (TRANSFORMS, FREEDOMS I, FREEDOMS II) (24-26). Thereby, Fingolimod is now used as the first oral immunomodulator that became approved for relapsing remitting multiple sclerosis treatment in 2010.

The therapeutic effect of FTY720 has also already highlighted in EAN animal models. It had shown to be an effective immunomodulatory agent by ameliorating the disease course, decreasing the number of infiltrating macrophages, T cells and the accumulation of IL-17⁺ cells into peripheral nerves from EAN rats (27, 28). The prophylactic effect of orally administered fingolimod was studied in EAN rats and demonstrated an at least indirect neuroprotective effect in the peripheral nervous system (reduced expression of myloid precursor protein and of Schwann cell apoptosis) (29). The benefic therapeutic effect of orally administered fingolimod was also studied in a mouse model of spontaneous autoimmune polyneuropathy (30). The efficacy, safety and tolerability of oral fingolimod have already been tested in the FORCIDP randomized controlled trial but lack of efficacy have led to study discontinuation (31). However, several methodological concerns may be addressed to this protocol especially the delay for a complete efficacy of Fingolimod. Because several hypotheses could explain these results, we decided to investigate the effect of therapeutically administered FTY720 in our c-EAN rat model that shares many clinical, electrophysiological and histological features with human CIDP.

Methods

Peptide synthesis

P0(180-199) peptide [ACKRGRQTPVLYAMLDHSRS], palmitoylated P0(180-199) peptide [AC(palm)KRGRQTPVLYAMLDHSRS], obtained by thiopalmitoylation of residue cysteine at position 181, was synthesized in our laboratory as we have previously described (13).

Animals

Male Lewis rats (Charles River, L'Arbresle, France), 7–8 weeks old and weighing 210–230 g were used in the present study. All experiments were approved by the animal experimentation ethical committee of University of de Strasbourg, France.

Induction of disease and assessment of clinical scores

The procedures were as described previously (14, 32). Rats were anesthetized intraperitoneally with ketamine chlorhydrate (37µg/g)/xylazine (Rompun) (5.5µg/g). To induce c-EAN, rats were immunized with palm-P0(180–199), by subcutaneous injection at the base of the tail of 200 µL of an emulsion containing 200 µg of peptide and 0.5mg of *Mycobacterium tuberculosis* (strain H37 RA, Difco, Detroit, Michigan, USA) emulsified in 100 µL saline and 100 µL incomplete Freund's adjuvant (IFA) (Sigma-Aldrich, St. Quentin Fallavier, France). For comparison, the classical acute EAN model was induced in Lewis rats by immunization with P0(180-199) peptide and rats immunized with complete Freund's adjuvant (CFA) alone were used as negative controls. Body weights and clinical scores were assessed daily from day 0 until 60 days post-immunization (dpi). Severity of paresis was graded as follows: 0, no illness; 1, flaccid tail; 2, moderate paraparesis; 3, severe paraparesis; 4, tetraparesis; 5, death; intermediate scores of 0.5 increments were given to rats with intermediate signs.

Treatment with FTY720

FTY720 (Cayman chemical, Ann Arbor, Michigan, USA) was dissolved in EtOH/saline (1:10). c-EAN rats were treated with freshly prepared FTY720 or with vehicle (EtOH/saline (1:10)). 1 mg/kg FTY720 in 1 ml EtOH/saline (1:10) (vehicle) were intraperitoneally injected once daily 2 days after the disease onset and stopped at 31 dpi. This dosage was applied because it has been shown to ameliorate EAN in rats.

Electrophysiological studies

Electrophysiology studies were performed at 13 (as baseline), 18, 40 and 60 dpi on treated and non-treated animals using the same method already described for the characterization of the c-EAN model (14). Briefly, rats were anesthetized as described above, and the sensory

nerve action potential (SNAP) was recorded on the caudal nerve using two needle electrodes (ALPINE-bioMed, NATUS France) inserted at the base of the tail, with the stimulating electrodes placed about 50 mm distally. Sciatic nerve motor conduction was assessed by examining the amplitude and the latency of the evoked compound muscle action potentials (CMAP). A stimulating needle electrode was inserted at the hip of the animal (proximal) or at the knee (distal) and two recording needle electrodes (Alpine-bioMed, Natus France) were inserted in the gastrocnemius muscle. Recordings were obtained on a differential amplifier DAM8 (WPI, London, UK) with a filter setting of 10 Hz to 10 kHz. The stimulus waveform (square shape stimuli, 0.1 ms duration) was generated with Clampex acquisition software (P-clamp8 software package, Axon Instruments, LA, US) and the signal was acquired through a Digidata 1224 (Axon Instruments, LA, US).

Histological studies

To evaluate pathological changes and inflammatory cell infiltration in the PNS, control rats and FTY720 or vehicle treated rats were sacrificed at 18 and 60 dpi. Rats were deeply anesthetized with Ketamine/Rompun, proximal sections of sciatic nerves (4 rats/group) were then collected and fixed overnight with 2.5% of glutaraldehyde in cacodylate buffer, post-fixed 2 h in 1% of osmium tetroxide, embedded in epon resin and polymerized at 60°C for 48 h. Semi-thin transverse sections of 0.5 µm thickness were cut on a ultra-microtome, stained with toluidine blue and observed by light microscopy. Sciatic nerves and spinal nerve roots (5 rats/group) were also dissected out, fixed in Hollande-Bouin's solution, embedded in paraffin and serially sectioned (5 µm). After dewaxing, cross sections were heated at 80°C for 10 min in citrate buffer. Endogenous peroxidase was inhibited with 0.02% H₂O₂ in water for 10 min. Non-specific binding sites were blocked with 5% fetal calf serum (Gibco Invitrogen, Camarillo, CA, USA) in phosphate-buffered saline (PBS) for 30 min and then with the following monoclonal antibodies: anti-myelin basic protein (MBP) (1:200; produced in house) for myelin; anti-neurofilaments (1:1000; clone SMI-31; Abcam) for phosphorylated neurofilaments H; anti-CD68 (1:400; clone ED1; Serotec, Oxford, UK) for macrophages and anti-interleukin-17 (IL-17; 1:100; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA). Antibody binding to tissue sections was visualized with biotinylated anti-mouse IgG (1:200; Vectastain®, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) and Avidin–Biotin-complex (ABC-peroxidase kit; Vectastain®, Vector Laboratories), followed by development with 3,3'-diaminobenzidine (DAB) substrate (Vector® DAB SK-4100, Vector Laboratories) for IL-17, and VIP substrate (Vector® VIP SK-4600, Vector Laboratories) for other antibodies. Slides were viewed using a Nikon Eclipse E600® optical microscope connected to a Nikon® Digital

Sight DS-Fi1 digital camera. Images were processed using Nikon NIS Elements® software supplied with the camera. Macrophage and IL-17⁺ cells counting were performed on 5 cross-sections per rat in a region of interest of 330 × 430 µm per slide. Counting was performed by two observers blind to the therapy received, using ImageJ software. Results are given as mean values per mm².

Cytokine secretion

Sera from control, FTY720 or vehicle treated rats were collected at 18, 40 and 60 dpi. The concentration of IL-17 cytokine was measured in duplicate in undiluted sera using commercial ELISA kits specific for rat IL-17 (eBioscience, San Diego, CA, USA), as per the manufacturers' instructions. Results were expressed as pg/mL relative to a standard curve (limit for positivity 2 pg/mL). The concentration of IFN γ , TNF, IL-4 and IL-10 was measured in undiluted sera using a cytometric bead array kit (Rat Flex Set, BD Pharmingen) according to the manufacturer's instructions. Cytokine concentrations were presented as pg/mL relative to a standard curve. The theoretical limits of detection were 6.8 pg/mL IFN γ , 27.7 pg/mL TNF, 3.4 pg/mL IL-4 and 19.4 pg/mL IL-10.

Antibody measurements

Sera from FTY720 or vehicle treated rats were also tested at 18, 40 and 60 dpi for the presence of anti-P0(180-199) antibodies using ELISA. P0(180-199) peptide was coated onto 96-well plates at 20 µg/mL in 0.05 M carbonate-bicarbonate buffer solution (pH 9.6, 100 µL/well) and incubated overnight at 4°C. Plates were then washed with PBS and blocked with 1% bovine serum albumin in PBS for 1 h at 37°C. After washing, sera (100 µL/well) diluted at 1/5000 were added in duplicate and incubated for 2 h at 37°C. After washing, plates were incubated with goat anti-rat IgG coupled to peroxidase (1:2000, SIGMA-Aldrich) for 2 h at 37°C. After extensive washing, each well was incubated with 75 µL of 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine at room temperature until color development. The reaction was stopped by addition of 1 M H₂SO₄ (25 µL/well). Results were expressed in OD at 450 nm.

Statistical analysis

Results are presented as mean ± standard error of the mean (SEM). Data were analyzed using GraphPad Prism 6 (GraphPad Software Inc.). Statistical analyses were determined by ANOVA followed by the Bonferroni correction method. Significance levels were set at $p < 0.05$.

Results

Therapeutic FTY720 treatment decreases the disease severity in c-EAN rats and abolishes the pathology chronicity

To examine the effect of FTY720 on c-EAN rats, animals were intraperitoneally treated with FTY720 (1 mg/kg) once daily for 18 days from day 12 post-immunization. All c-EAN rats treated with vehicle (EtOH/saline; 1:10) developed a chronic type of disease with an onset at 10.5 ± 0.5 dpi, a maximal clinical score of 2.7 ± 0.1 at 18 dpi without recovery and exhibited chronic clinical signs up to 60 dpi. In contrast, FTY720 therapeutic treatment not only decreased the maximal clinical scores of the chronic-EAN rats compared to vehicle treatment (1.8 ± 0.2 at 16 dpi) but also abolishes the chronicity of the disease. Differences between vehicle and FTY720 group were statistically significant from 18 up to 60 dpi (Figure 1). The classical acute EAN model, induced with P0(180-199), was used for comparison. FTY720 treatment decreased the maximal clinical scores compared to vehicle treatment and allowed faster recovery of the EAN rats (Supplementary figure 1). Similar results have already been demonstrated by Schleusener (2009) (27).

The evolution of body weight during the disease course is showed in supplementary figure 2. A maximal weight loss that corresponds to the maximal clinical scores of the disease followed by weight gain is observed in c-EAN (A) and EAN (B) treated with vehicle. FTY720 did not attenuate the loss of body weight in c-EAN rats (SF2A). In contrast, in the classical acute EAN group, FTY720 treatment induced an apparent less important weight loss at maximal clinical score but the difference in the weight changes failed to reach statistical significance.

Beneficial response from FTY720 treatment in electrophysiological changes

To prove the potential therapeutic effects of FTY720 against demyelination and axonal degeneration we performed electrophysiological measurements on four c-EAN rats treated with vehicle and five c-EAN rats treated with FTY720 at 13 dpi (as baseline), at 18 dpi (the maximum disease course), at 40 dpi (the middle of the disease) and at 60 dpi (the late chronic phase of the disease). As shown in Figure 2A, the sensory nerve conduction velocity (SNCV) for c-EAN rats treated with vehicle was significantly and strongly decreased at 18 dpi (37 ± 0.4 m/s) compared to 13 dpi (66 ± 2 m/s) and not recovery was observed at 40 or 60 dpi (36 ± 1.7 m/s and 43 ± 1.8 m/s). In contrast, although a significant reduction of SNCV was also observed at 18 dpi for the c-EAN rats treated with FTY720 (39 ± 1 m/s), this was followed by a recovery at 40 and 60 dpi (54.8 ± 3 m/s and 54.7 ± 1.4 m/s). These results suggest that a

demyelination of sensory fibers persisted in c-EAN rats treated with vehicle and this was restored following FTY720 treatment.

CMAP latencies and amplitudes were also measured at 13, 18, 40 and 60 dpi. The CMAP latency in c-EAN rats treated with vehicle or FTY720 at all time-points did not differ significantly from 13 dpi (Figure 2B). The maximal CMAP amplitudes in the c-EAN group treated with vehicle was significantly and strongly reduced at 18 dpi (23.9 ± 2.4 mV) and increased up at 40 and 60 dpi (56.2 ± 5.9 mV and 45.1 ± 11.8 mV) when compared to 13 dpi (57.7 ± 5.8 mV). These data are indicative of an axonal degeneration. In contrast, the CMAP amplitude in the group treated with FTY720 was transiently increased at 18 and 40 dpi (67 ± 4.4 mV and 85 ± 6.9 mV) and it was maintained until 60 dpi (85 ± 3.3 mV) when compared to vehicle treated group (24 ± 2.4 mV, 56 ± 5.9 mV and 45 ± 11.8 mV respectively) (Figure 2C). When compared to 13 dpi (54 ± 3.1 mV), the CMAP amplitude in the group treated with FTY720 was transiently increased only at 40 and 60 dpi. These results are indicative of an axonal regeneration.

The distal and proximal CMAP maximal amplitudes were also measured at 13, 18, 40 and 60 dpi. In the group treated with vehicle, the maximal CMAP amplitude distal/proximal ratio was 37% higher at 18 dpi and 47% at 60 dpi (128 ± 18 mV; 138.5 ± 16 mV respectively) compared to 13 dpi (94 ± 5 mV) suggesting the presence of a conduction block mechanism between the two sites of stimulation at the hip and the knee. No significant changes were observed in the CMAP amplitude distal/proximal ratio for the group treated with FTY720 when compared to 13 dpi (Figure 2D).

FTY720 attenuates demyelination and axonal loss in sciatic nerves from c-EAN rats

To evaluate if therapeutic FTY720 treatment induced morphological changes of myelinated fibers in sciatic nerves from c-EAN rats, histological studies were carried out on sciatic nerve from control (CFA immunized rats), vehicle and FTY720 treated c-EAN rats at 18 and 60 dpi. Semi-thin transverse sections of sciatic nerves demonstrated that clinical disability of c-EAN rats was associated with an extensive demyelination and axonal degeneration at 18 dpi followed by regeneration along with the presence of numerous thinly myelinated axons at 60 dpi when compared to sciatic nerves from control group (in the right) that presents well-defined structure and uniform myelin sheath thickness (figure 3A and B). Treatment of c-EAN rats with FTY720 reduces the extent of demyelination and axonal degeneration at 18 dpi and restores myelinated fibers to an almost normal appearance at 60 dpi.

These results were confirmed by immunohistochemical staining of myelin and neurofilaments of sciatic nerves at 60 dpi (Figure 3C and D). Vehicle treated c-EAN rats are characterized by an apparently reduction in the number of myelinated fibers and the presence of numerous clustered axons of small diameter and very few axons of normal diameter compared to the normal appearance of sciatic nerves from control group. FTY720 treatment resulted in the presence of myelinated fibers of comparable size and appearance to those of control animals.

FTY720 decreases the number of inflammatory cells infiltration in the PNS of c-EAN rats

The infiltration of macrophages was assessed at 60 dpi in sciatic nerves from control, vehicle or FTY720 treated c-EAN rats at 60 dpi (Figure 4A and C). Sciatic nerves from vehicle treated c-EAN rats are characterized by an accumulation of macrophages when compared to control rats. Therapeutic FTY720 treatment of c-EAN animals resulted in a significant decrease of the number of infiltrated macrophages in sciatic nerves compared to vehicle-treated ones.

Th17 cells, producing the cytokine IL-17, have been shown to play an important role in the pathology of various autoimmune diseases. We therefore stained for IL-17-producing cells in the spinal nerve roots from vehicle or FTY720 treated c-EAN rats at 60 dpi (Figure 4B and D). The chronic late phase of disease (60 dpi) is characterized by an accumulation of IL-17⁺ cells in vehicle treated c-EAN rats but not in control animals. Treatment of c-EAN rats with FTY720 significantly decreased the accumulation of infiltrated IL-17⁺ cells in spinal nerve roots when compared to vehicle treatment.

Macrophages or IL-17 cells infiltration in classical EAN rats treated with vehicle or FTY720 at 60 dpi did not differ significantly from control rats (data no shown).

Therapeutic FTY720 treatment reduces the serum levels of IL-17, IFN γ and TNF pro-inflammatory cytokines in c-EAN rats

We also examined whether the benefits of FTY720 on the reduction of inflammatory cells infiltration in PNS and against clinical symptoms of c-EAN goes along with a reduced level of peripheral pro- and anti-inflammatory cytokines. IL-17, IFN γ , TNF, IL-4 and IL-10 levels were measured in the sera from control, vehicle or FTY720 treated c-EAN rats collected at 18, 40 and 60 dpi. FTY720 treatment significantly reduced IL-17 and IFN γ pro-inflammatory cytokine levels in the c-EAN group at any stage of the disease while TNF level was only

reduced at 18 and 60 dpi. There were no significant differences for circulating IL-4 and IL-10 anti-inflammatory cytokines among the three groups (Figure 5).

FTY720 decreases the levels of antibody responses against P0(180-199) antigenic peptide

The ability of palm-P0(180-199) peptide to induce P0(180-199)-specific IgG antibody responses was investigated at 18, 40 and 60 dpi by measuring the level of these antibodies circulating in the serum of control, vehicle and FTY720-treated c-EAN rats. A strong IgG antibody response to P0(180–199) was measured in vehicle-treated c-EAN rats (readily detectable in the samples collected at 18 dpi and increasing with time). FTY720 treatment significantly reduced the antibody reactivity at 60 dpi (Fig. 6). Antibody response to P0(180-199) peptide was hardly detectable in control group.

Discussion

There is currently little validated treatment for human CIDP, the most common chronic autoimmune neuropathy with a prevalence ranging from 1 to 9 cases per 100,000 individuals (33-35). Although the majority of patients can be successfully treated by intravenous immunoglobulin therapy, plasma exchange or corticosteroids, a large number of patients with CIDP are non-responders or become refractory to these treatments, and some are left with permanent disability (1, 4, 33, 36-40). Furthermore, these treatments are only transitory efficient and patients relapse when the drug is stopped. Novel therapeutic options are thus eagerly awaited, that would be with high efficacy and less secondary side effects. To investigate these new therapeutic strategies, the use of reliable and easily reproducible animal models is essential. In this study, we have studied the therapeutic effects of FTY720, a S1P receptor agonist, known to deplete lymphocytes from the peripheral blood by sequestering them into lymph nodes, on rat model mimicking CIDP, the c-EAN, that proven to be useful in investigating new therapeutic strategies (41). The results of our experiments have shown a benefic effect of FTY720 on our c-EAN rat model. FTY720 treatment administrated therapeutically (1mg/kg) by intraperitoneally injections, not only decreases the severity of chronic-EAN and but also abolishes the chronicity of the disease. Similar results have been reported in the literature on a mouse model developing spontaneous autoimmune polyneuropathy but with FTY720 administrated orally (same dose) (30). Another study in the same animal model have since suggested otherwise but these contradictory results could be explained because in the last study, treatment began when demyelination had most likely

further progressed (42). We also used the classical acute EAN model, induced with P0(180-199), for comparison. In this group of animals, FTY720 treatment significantly decreased the maximal clinical scores compared to vehicle treatment and allowed faster recovery of the rats. These results are in agreement with a study realized on an EAN model induced with the synthetic neuritogenic P2(57-81) peptide (27).

Furthermore, therapeutic FTY720 treatment in c-EAN animals resulted in the attenuation of demyelination and axonal degeneration. FTY720 also reduces macrophages infiltration and accumulation of IL-17⁺ cells in PNS at the late phase of the chronic disease. Interestingly, FTY720 reduces the levels of circulating IL-17, IFN γ and TNF pro-inflammatory cytokines and the levels of antibody responses against P0(180-199) antigenic peptide. These results are consistent with the mechanism of action of FTY720. In fact, the most robust action of FTY720 is sequestering lymphocytes in lymph nodes and blocks their trafficking to the target organs (20, 43) inducing a reduction in critical pro-inflammatory mediators in the blood including IL-17, IFN γ and TNF. Indeed, additional mechanisms have been attributed to the effects of FTY720. *In vitro* studies have demonstrated the implication of S1P in Th17 cell development and suggest that FTY720 immunosuppression could be partially attributable to Th17-mediated inflammation (44). It was recently demonstrated that IL-17 plays a major role in certain autoimmune diseases, notably multiple sclerosis and GBS (45). The immunopathogenesis of CIDP remains poorly understood, but it has recently been suggested that Th17 may be an important determinant in the evolution of CIDP (46). It was also shown that IL-17⁺ cells accumulation in EAN sciatic nerves temporally correlated with severity of neurological signs (28). Our results are consistent with the possible involvement of IL-17⁺ cells in the chronicity of the disease. Interestingly, the therapeutic activity of FTY720 in the c-EAN model could be followed by measurement of circulating IL-17 and anti-P0(180-199) antibodies and can therefore be used as biological markers.

The efficacy and safety of 0.5 mg FTY720 administered orally once daily versus placebo in 106 patients with CIDP has been a subject of a clinical study (FORCIDP, ClinicalTrials.gov Identifier (NCT01625182)) and the results of this study have just been published (31). Unfortunately, the study had to be discontinued due to lack of efficacy. These results could be explained by several possibilities but it was suggested that several parts of the study design are not adequate to show the efficacy of the drug, especially the delay for fingolimod efficacy (47). Other synthetic analogues of S1P that have or may have therapeutic effects similar to those of fingolimod, could be tested in immune-mediated peripheral neuropathies such as

CIDP provided that care must be taken to choice of patients and previous treatment, selection the right inclusion criteria, as well as the right primary endpoint.

Conclusion

The experimental data we generated indicate that FTY720 treatment was found to be an effective immunomodulatory agent by improving the disease course and decreasing the demyelination and axonal degeneration. Finally, FTY720 reduces the accumulation of IL-17⁺ cells and infiltrating macrophages in PNS and abnormally elevated soluble pro-inflammatory IL-17, IFN γ and TNF cytokine levels circulating in the serum, factors that characterize c-EAN rats in the late phase of the chronic disease. These findings show that FTY720 displays remarkable beneficial effects both at the biological and clinical levels. Even if fingolimod was evaluated in a clinical trial in patients with CIDP and has proven limited effects compared to placebo (31), showing its efficacy *in vivo*, in our rat model can prove that fingolimod and its analogs could be tested in immune-mediated peripheral neuropathies. It also highlights the potential of molecules targeting S1P, for innovative drug development in autoimmune-mediated demyelinating neuropathies.

List of abbreviations

c-EAN: chronic experimental autoimmune neuritis

CFA: complet Freund's adjuvant

CIDP: chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy

CMAP: compound muscle action potential

DPI: days post-immunization

IFN γ : interferon gamma

IL: interleukin

MBP: myelin basic protein

P0: myelin protein zero

Palm: palmitoylated

PNS: peripheral nervous system

S1P: sphingosine 1 phosphate

SNAP: sensory nerve action potential

TNF: tumor necrosis factor

Declarations

Consent for publication

Not applicable

Availability of data and materials

The datasets used and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Funding

A grant for post-doctoral position has been given by Novartis for a part of this work.

Author contributions

LK performed the laboratory experiments, contributed to study design and interpretation of results and to drafting the text; OT performed the laboratory experiments and participated to the interpretation of results; NB contributed to study design and interpretation of results; AGMN critically read the final version of the paper; ET contributed to study design and interpretation of results; JdS contributed to study design and interpretation of results; SB performed the laboratory experiments, contributed to study design and interpretation of results, preparing the figures and wrote the manuscript. All authors reviewed the manuscript.

Acknowledgements

We gratefully acknowledge Julien Graff for their helpful and efficacious technical assistance in histological studies.

References

1. Vallat JM, Sommer C, Magy L. Chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy: diagnostic and therapeutic challenges for a treatable condition. *Lancet Neurol.* 2010 Apr;9(4):402-12.
2. Van den Bergh PY, Rajabally YA. Chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. *Presse Med.* 2013 Jun;42(6 Pt 2):e203-15.
3. Hughes RA, Allen D, Makowska A, Gregson NA. Pathogenesis of chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. *J Peripher Nerv Syst.* 2006 Mar;11(1):30-46.
4. Dalakas MC. Advances in the diagnosis, pathogenesis and treatment of CIDP. *Nat Rev Neurol.* 2011 Aug 16;7(9):507-17.
5. Koller H, Kieseier BC, Jander S, Hartung HP. Chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *N Engl J Med.* 2005 Mar 31;352(13):1343-56.
6. Allen CD, Ansel KM, Low C, Lesley R, Tamamura H, Fujii N, et al. Germinal center dark and light zone organization is mediated by CXCR4 and CXCR5. *Nat Immunol.* 2004 Sep;5(9):943-52.
7. Hughes RA, Mehndiratta MM. Corticosteroids for chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. *Cochrane Database Syst Rev.* 2015 Jan 5;1:CD002062.
8. Mehndiratta MM, Hughes RA. Plasma exchange for chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. *Cochrane Database Syst Rev.* 2012 Sep 12(9):CD003906.
9. Eftimov F, Winer JB, Vermeulen M, de Haan R, van Schaik IN. Intravenous immunoglobulin for chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. *Cochrane Database Syst Rev.* 2013 Dec 30(12):CD001797.
10. Mahdi-Rogers M, van Doorn PA, Hughes RA. Immunomodulatory treatment other than corticosteroids, immunoglobulin and plasma exchange for chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. *Cochrane Database Syst Rev.* 2013 Jun 14(6):CD003280.
11. Cocito D, Grimaldi S, Paolasso I, Falcone Y, Antonini G, Benedetti L, et al. Immunosuppressive treatment in refractory chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. A nationwide retrospective analysis. *Eur J Neurol.* 2011 Dec;18(12):1417-21.
12. Muller S, Brun S, Rene F, de Seze J, Loeffler JP, Jeltsch-David H. Autophagy in neuroinflammatory diseases. *Autoimmun Rev.* 2017 Aug;16(8):856-74.
13. Beaino W, Trifilieff E. Thiopalmitoylated peptides from the peripheral nervous system myelin p0 protein: synthesis, characterization, and neuritogenic properties. *Bioconjug Chem.* 2010 Aug 18;21(8):1439-47.
14. Brun S, Beaino W, Kremer L, Taleb O, Mensah-Nyagan AG, Lam CD, et al. Characterization of a new rat model for chronic inflammatory demyelinating polyneuropathies. *J Neuroimmunol.* 2015 Jan 15;278:1-10.
15. Brinkmann V, Davis MD, Heise CE, Albert R, Cottens S, Hof R, et al. The immune modulator FTY720 targets sphingosine 1-phosphate receptors. *J Biol Chem.* 2002 Jun 14;277(24):21453-7.
16. Zhang Z, Schluesener HJ. FTY720: a most promising immunosuppressant modulating immune cell functions. *Mini Rev Med Chem.* 2007 Aug;7(8):845-50.
17. Billich A, Bornancin F, Devay P, Mechtcheriakova D, Urtz N, Baumruker T. Phosphorylation of the immunomodulatory drug FTY720 by sphingosine kinases. *J Biol Chem.* 2003 Nov 28;278(48):47408-15.

18. Chiba K, Yanagawa Y, Masubuchi Y, Kataoka H, Kawaguchi T, Ohtsuki M, et al. FTY720, a novel immunosuppressant, induces sequestration of circulating mature lymphocytes by acceleration of lymphocyte homing in rats. I. FTY720 selectively decreases the number of circulating mature lymphocytes by acceleration of lymphocyte homing. *J Immunol.* 1998 May 15;160(10):5037-44.
19. Graler MH, Goetzl EJ. The immunosuppressant FTY720 down-regulates sphingosine 1-phosphate G-protein-coupled receptors. *FASEB J.* 2004 Mar;18(3):551-3.
20. Mandala S, Hajdu R, Bergstrom J, Quackenbush E, Xie J, Milligan J, et al. Alteration of lymphocyte trafficking by sphingosine-1-phosphate receptor agonists. *Science.* 2002 Apr 12;296(5566):346-9.
21. Mehling M, Johnson TA, Antel J, Kappos L, Bar-Or A. Clinical immunology of the sphingosine 1-phosphate receptor modulator fingolimod (FTY720) in multiple sclerosis. *Neurology.* 2011 Feb 22;76(8 Suppl 3):S20-7.
22. Mehling M, Brinkmann V, Antel J, Bar-Or A, Goebels N, Vedrine C, et al. FTY720 therapy exerts differential effects on T cell subsets in multiple sclerosis. *Neurology.* 2008 Oct 14;71(16):1261-7.
23. Kappos L, Antel J, Comi G, Montalban X, O'Connor P, Polman CH, et al. Oral fingolimod (FTY720) for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med.* 2006 Sep 14;355(11):1124-40.
24. Kappos L, Radue EW, O'Connor P, Polman C, Hohlfeld R, Calabresi P, et al. A placebo-controlled trial of oral fingolimod in relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med.* 2010 Feb 4;362(5):387-401.
25. Calabresi PA, Radue EW, Goodin D, Jeffery D, Rammohan KW, Reder AT, et al. Safety and efficacy of fingolimod in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis (FREEDOMS II): a double-blind, randomised, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Neurol.* 2014 Jun;13(6):545-56.
26. Cohen JA, Barkhof F, Comi G, Hartung HP, Khatri BO, Montalban X, et al. Oral fingolimod or intramuscular interferon for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med.* 2010 Feb 4;362(5):402-15.
27. Zhang Z, Zhang ZY, Fauser U, Schluesener HJ. FTY720 ameliorates experimental autoimmune neuritis by inhibition of lymphocyte and monocyte infiltration into peripheral nerves. *Exp Neurol.* 2008 Apr;210(2):681-90.
28. Zhang ZY, Zhang Z, Schluesener HJ. FTY720 attenuates lesional interleukin-17(+) cell accumulation in rat experimental autoimmune neuritis. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2009 Oct;35(5):487-95.
29. Ambrosius B, Pitarokoili K, Schrewe L, Pedreiturria X, Motte J, Gold R. Fingolimod attenuates experimental autoimmune neuritis and contributes to Schwann cell-mediated axonal protection. *J Neuroinflammation.* 2017 Apr 26;14(1):92.
30. Kim HJ, Jung CG, Dukala D, Bae H, Kakazu R, Wollmann R, et al. Fingolimod and related compounds in a spontaneous autoimmune polyneuropathy. *J Neuroimmunol.* 2009 Sep 29;214(1-2):93-100.
31. Hughes R, Dalakas MC, Merkies I, Latov N, Leger JM, Nobile-Orazio E, et al. Oral fingolimod for chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy (FORCIDP Trial): a double-blind, multicentre, randomised controlled trial. *Lancet Neurol.* 2018 Aug;17(8):689-98.
32. Brun S, Schall N, Jeltsch-David H, Seze J, Muller S. Assessing Autophagy in Sciatic Nerves of a Rat Model that Develops Inflammatory Autoimmune Peripheral Neuropathies. *Cells.* 2017 Sep 18;6(3).
33. Ubogu EE. Inflammatory neuropathies: pathology, molecular markers and targets for specific therapeutic intervention. *Acta Neuropathol.* 2015 Oct;130(4):445-68.

34. McLeod JG, Pollard JD, Macaskill P, Mohamed A, Spring P, Khurana V. Prevalence of chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy in New South Wales, Australia. *Ann Neurol*. 1999 Dec;46(6):910-3.
35. Laughlin RS, Dyck PJ, Melton LJ, 3rd, Leibson C, Ransom J. Incidence and prevalence of CIDP and the association of diabetes mellitus. *Neurology*. 2009 Jul 7;73(1):39-45.
36. Dalakas MC. Clinical trials in CIDP and chronic autoimmune demyelinating polyneuropathies. *J Peripher Nerv Syst*. 2012 May;17 Suppl 2:34-9.
37. Schafflick D, Kieseier BC, Wiendl H, Meyer Zu Horste G. Novel pathomechanisms in inflammatory neuropathies. *J Neuroinflammation*. 2017 Nov 28;14(1):232.
38. Bright RJ, Wilkinson J, Coventry BJ. Therapeutic options for chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy: a systematic review. *BMC Neurol*. 2014 Feb 7;14:26.
39. Ripellino P, Fleetwood T, Cantello R, Comi C. Treatment of chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy: from molecular bases to practical considerations. *Autoimmune Dis*. 2014;2014:201657.
40. Nobile-Orazio E, Gallia F, Terenghi F, Bianco M. Comparing treatment options for chronic inflammatory neuropathies and choosing the right treatment plan. *Expert Rev Neurother*. 2017 Aug;17(8):755-65.
41. Brun S, Schall N, Bonam SR, Bigaut K, Mensah-Nyagan AG, de Seze J, et al. An autophagy-targeting peptide to treat chronic inflammatory demyelinating polyneuropathies. *J Autoimmun*. 2018 Aug;92:114-25.
42. Huehnchen P, Boehmerle W, Endres M. Fingolimod therapy is not effective in a mouse model of spontaneous autoimmune peripheral polyneuropathy. *Sci Rep*. 2018 Apr 4;8(1):5648.
43. Brinkmann V, Billich A, Baumruker T, Heining P, Schmouder R, Francis G, et al. Fingolimod (FTY720): discovery and development of an oral drug to treat multiple sclerosis. *Nat Rev Drug Discov*. 2010 Nov;9(11):883-97.
44. Asakura H, Churin Y, Bauer B, Boettcher JP, Bartfeld S, Hashii N, et al. *Helicobacter pylori* HP0518 affects flagellin glycosylation to alter bacterial motility. *Mol Microbiol*. 2010 Dec;78(5):1130-44.
45. Wang X, Ma C, Wu J, Zhu J. Roles of T helper 17 cells and interleukin-17 in neuroautoimmune diseases with emphasis on multiple sclerosis and Guillain-Barre syndrome as well as their animal models. *J Neurosci Res*. 2013 Jul;91(7):871-81.
46. Chi LJ, Xu WH, Zhang ZW, Huang HT, Zhang LM, Zhou J. Distribution of Th17 cells and Th1 cells in peripheral blood and cerebrospinal fluid in chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. *J Peripher Nerv Syst*. 2010 Dec;15(4):345-56.
47. Magy L. Fingolimod and CIDP: insights from negative results. *Lancet Neurol*. 2018 Aug;17(8):655-6.

Figures legend

Figure 1: Effect of FTY720 on the clinical course of c-EAN. Clinical score values were measured in vehicle (○) and FTY720-treated (●) rats. Therapeutic injections of FTY720 or vehicle were administrated intraperitoneally from 12 to 30 days post-immunization (dpi). Mean values, SEM and p values are indicated. $*p < 0.05$; $**p < 0.01$; $***p < 0.001$; $****p < 0.0001$. For vehicle treated group $n=22$ from 0 to 18 days post-immunization (dpi), $n=18$ from 19 to 40 dpi and $n=13$ from 41 to 60 dpi; for FTY720-treated group, $n=26$ from 0 to 18, dpi $n=22$ from 19 to 40 dpi and $n=18$ from 41 to 60 dpi. n , number of rats.

Figure 2: Electrophysiological changes in c-EAN rats treated with FTY720 or vehicle at 18, 40 and 60 dpi. Values at 13 dpi are used as control. A) Sensory nerve action potential (SNAP) conduction velocity of the caudal nerve. B) Sciatic motor nerve distal CMAP latency. C) CMAP amplitudes obtained after proximal stimulation of the sciatic nerve. D) CMAP amplitude ratio of distal values / proximal values. Mean values, SEM and p values are indicated. $*p$ values refer to difference between FTY720-treated group and vehicle treated group at the same dpi ($*p < 0.05$; $**p < 0.01$; $***p < 0.001$; $****p < 0.0001$). $^{\Psi}p$ values refer to difference in vehicle or FTY720-treated group when compared to control values at 13 dpi ($^{\Psi}p < 0.05$; $^{\Psi\Psi}p < 0.01$; $^{\Psi\Psi\Psi}p < 0.001$; $^{\Psi\Psi\Psi\Psi}p < 0.0001$). $^{\Phi}p$ values refer to difference in FTY720 treated group when compared to 18 dpi ($^{\Phi\Phi\Phi}p < 0.001$). $n=5$ rats / group. n , number of rats.

Figure 3: FTY720 attenuates the severity of demyelination in sciatic nerves from c-EAN rats. Representative semi-thin cross-sections of sciatic nerves from control and c-EAN rats treated with FTY720 or vehicle (three groups of rats) and stained with toluidine blue at A) 18 dpi and B) 60 dpi. Representative paraffin cross-sections of sciatic nerves taken from the three groups of rats and labeled with C) anti-MBP antibody for myelin and D) anti-SMI-31 antibody for phosphorylated neurofilament at 60 dpi.

Figure 4: Therapeutic FTY720 treatment inhibits inflammatory cells (macrophages and IL-17⁺ cells) infiltration in sciatic nerves from c-EAN rats. A) Representative cross-sections of sciatic nerves from control and c-EAN rats treated with FTY720 or vehicle (three groups of rats) were labeled with anti-CD68 antibody for macrophages infiltration at 60 dpi. B) Representative cross-sections of sciatic nerves sampled in the three groups of rats were labeled with anti-IL-17 antibody for IL-17⁺ cells infiltration at 60 dpi. C) Macrophages and

D) IL-17⁺ cells number per mm² at 60 dpi in sciatic nerves from control and c-EAN rats treated with FTY720 or vehicle. Mean values, SEM and *p* values are indicated. *****p* < 0.001. n, number of rats.

Figure 5: Effect of FTY720 on serum IL-17, IFN γ , TNF, IL-4 and IL-10 cytokine. Cytokine levels were evaluated at different stages of the disease (18, 40 and 60 dpi) in the serum collected from control rats that received CFA alone or from c-EAN rats that were treated with FTY720 or vehicle. (A) IL-17 level was evaluated by ELISA. (B-E) IFN γ , TNF, IL-4 and IL-10 cytokine levels were measured using cytometric bead array technique. Mean values, SEM and *p* values are indicated. **p* < 0.05; ***p* < 0.01; ****p* < 0.001; *****p* < 0.0001. n, number of rats.

Figure 6: Effect of FTY720 on IgG specific antibody response. IgG antibody responses to P0(180-199) was evaluated at different stages of the disease (18, 40 and 60 dpi) in the serum collected from control rats that received CFA alone or from c-EAN rats that were treated with FTY720 or vehicle. Mean values, SEM and *p* values are indicated. *****p* < 0.0001. n, number of rats.

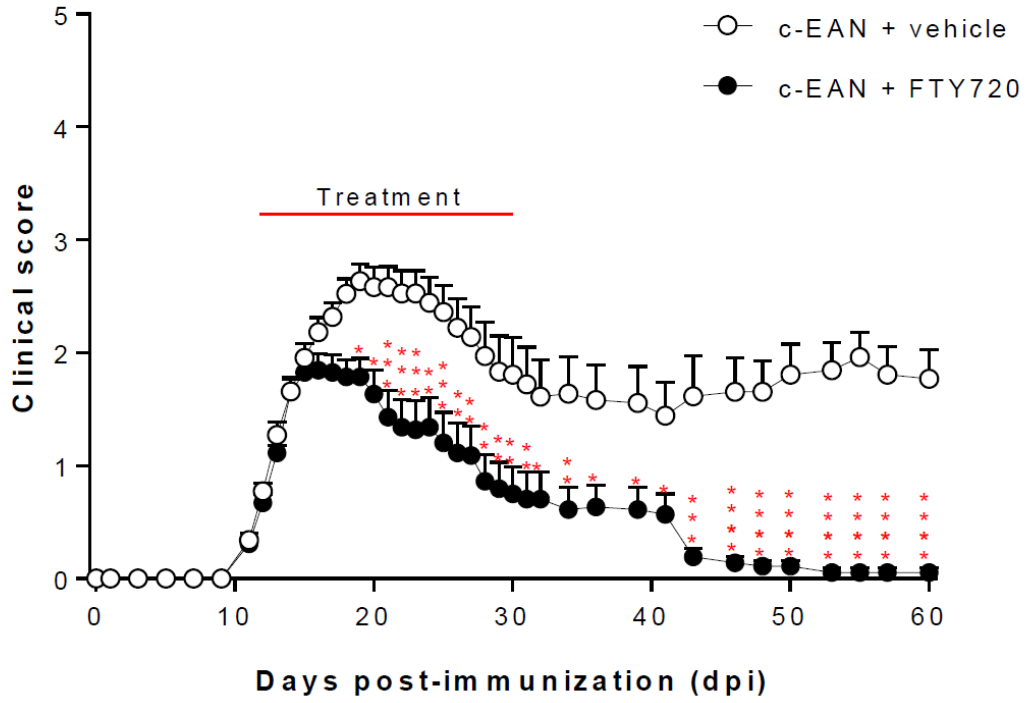


Figure 1

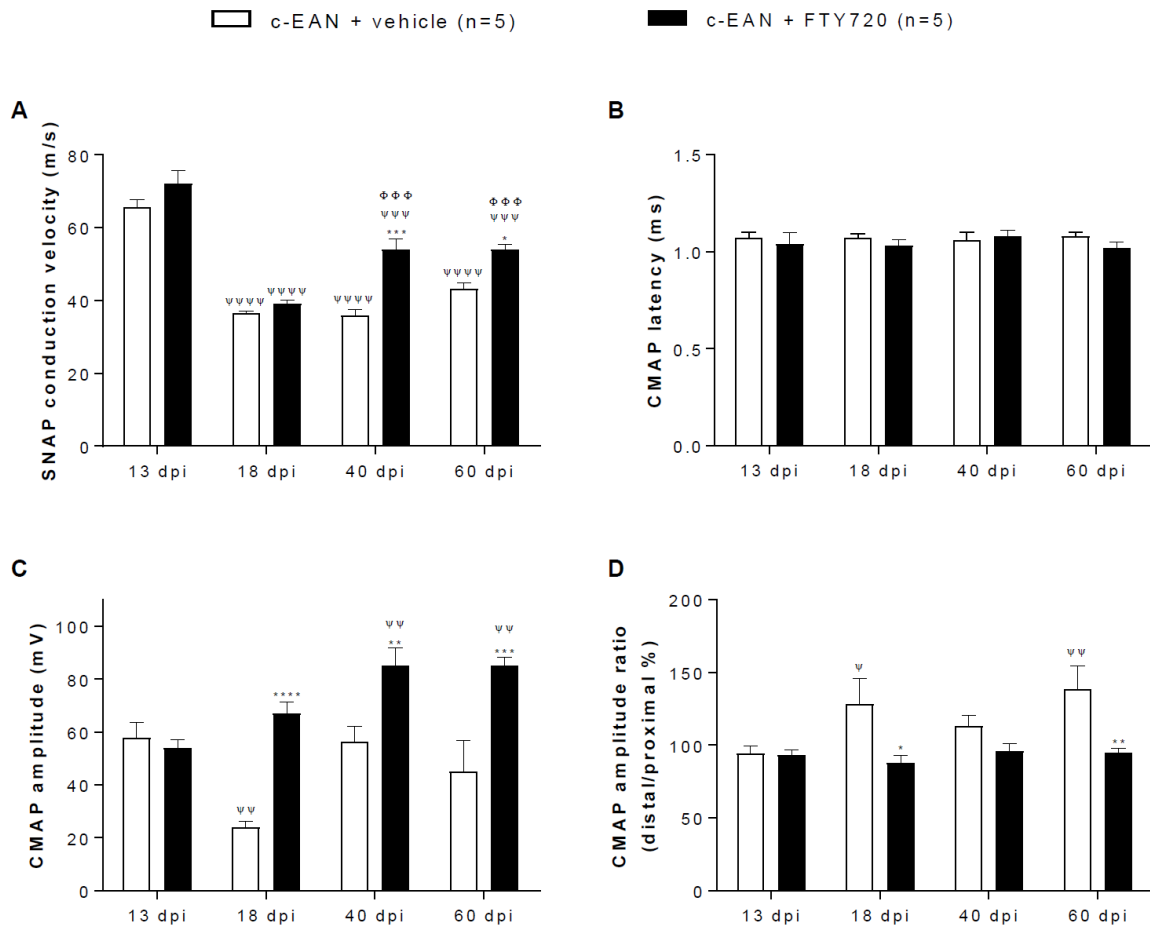
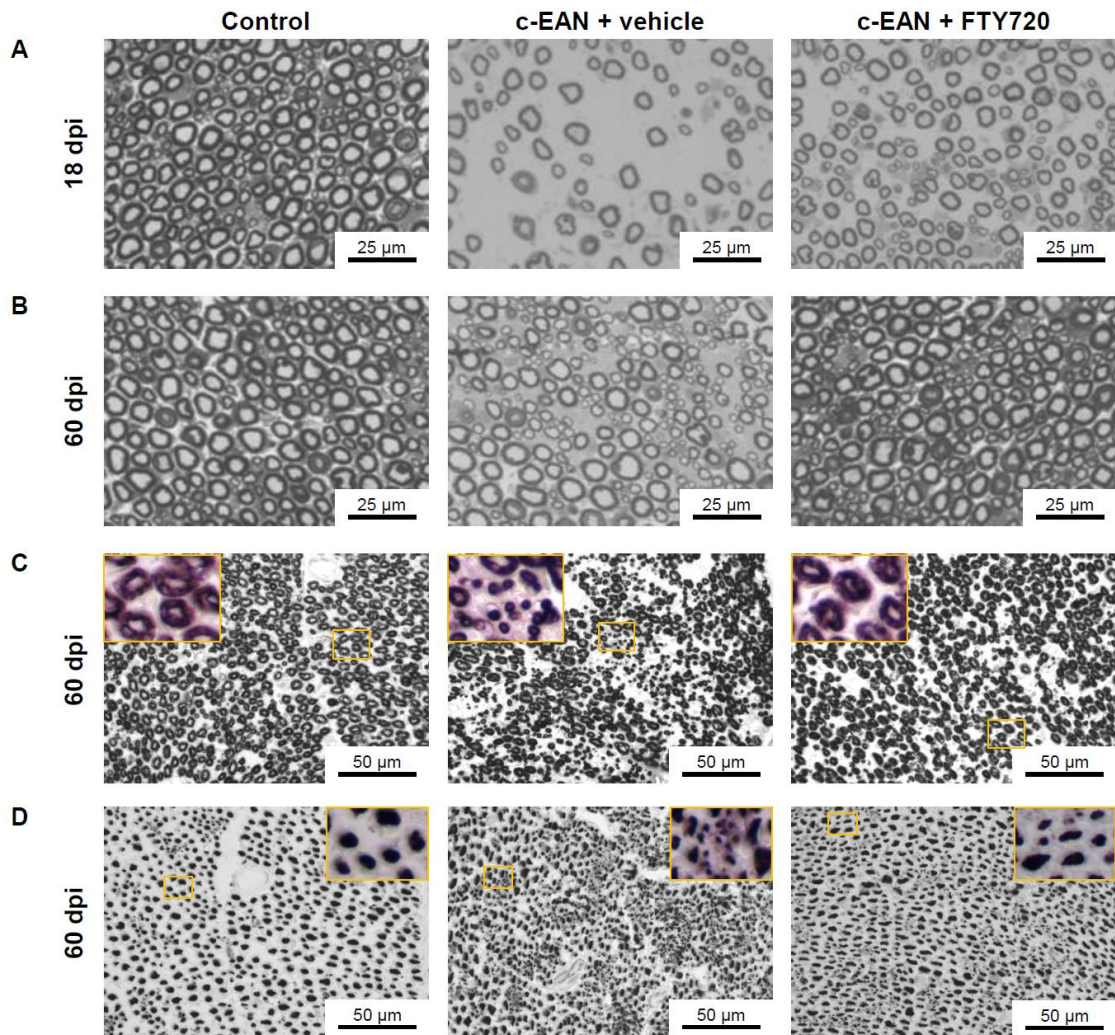
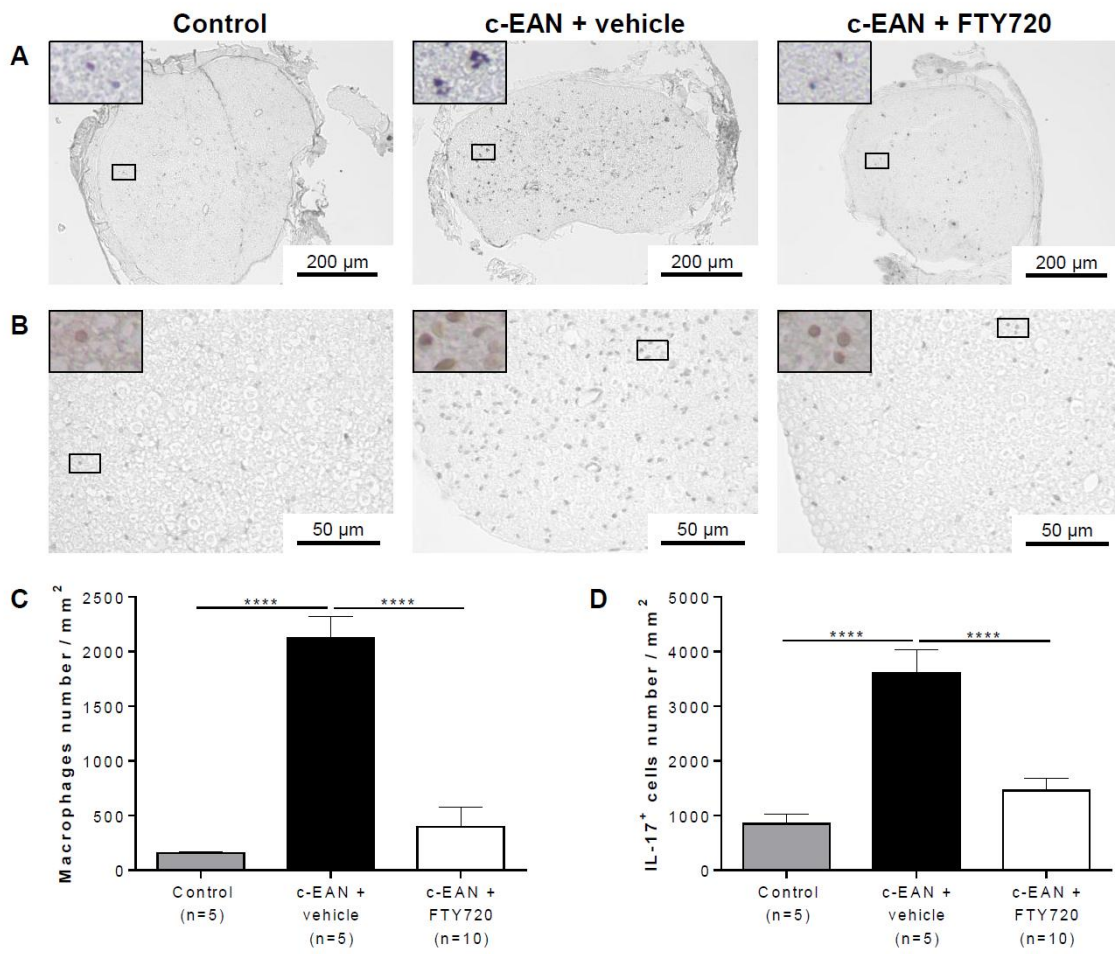
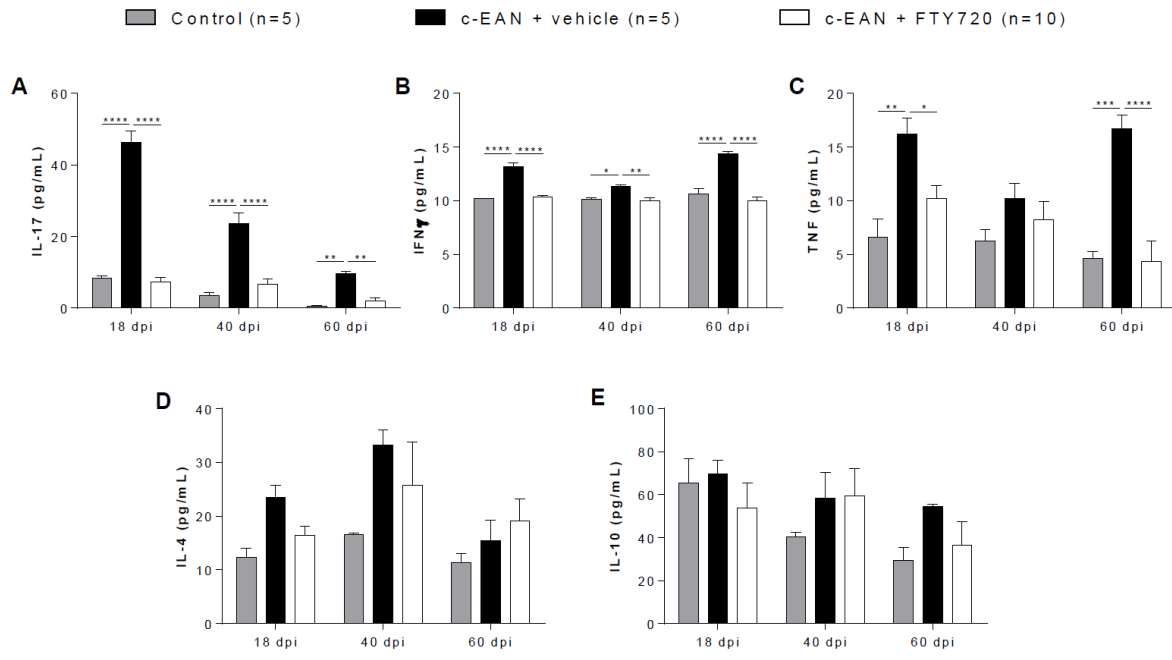
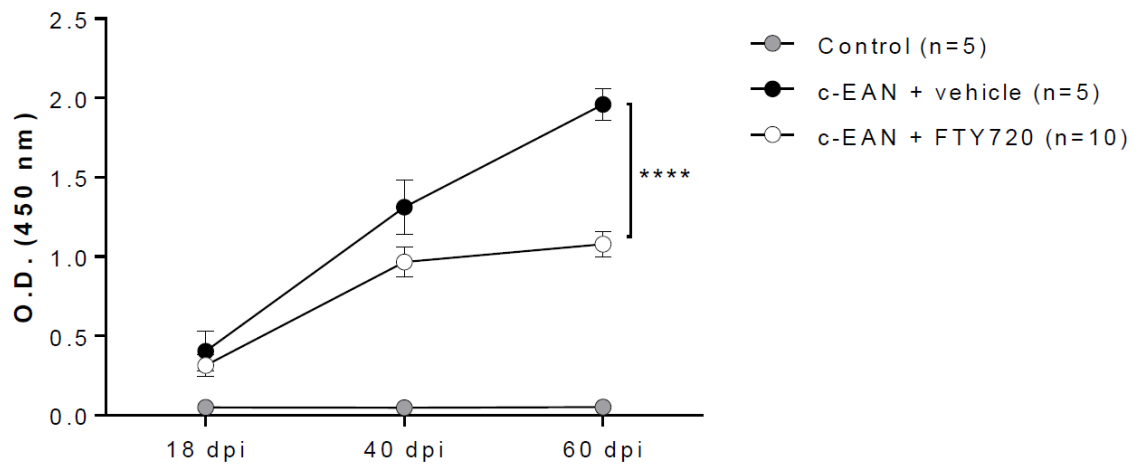


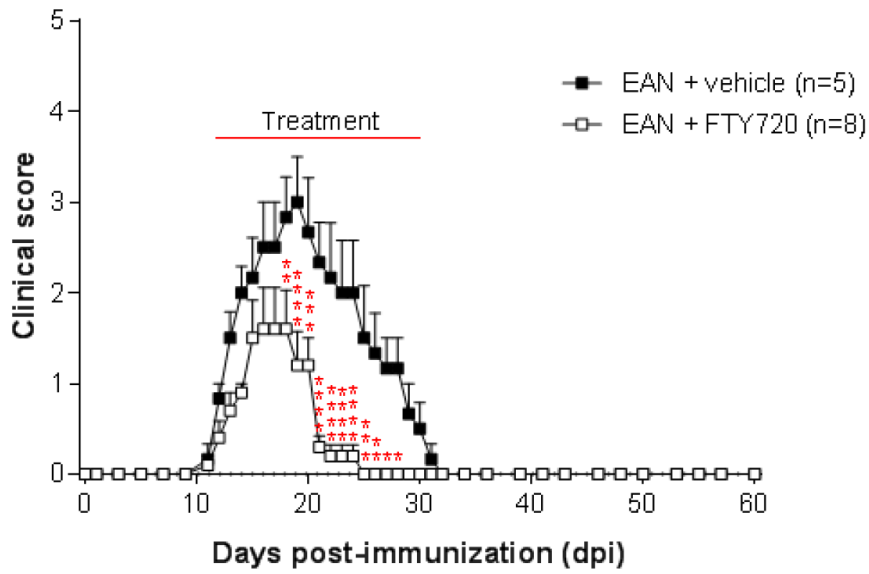
Figure 2

**Figure 3**

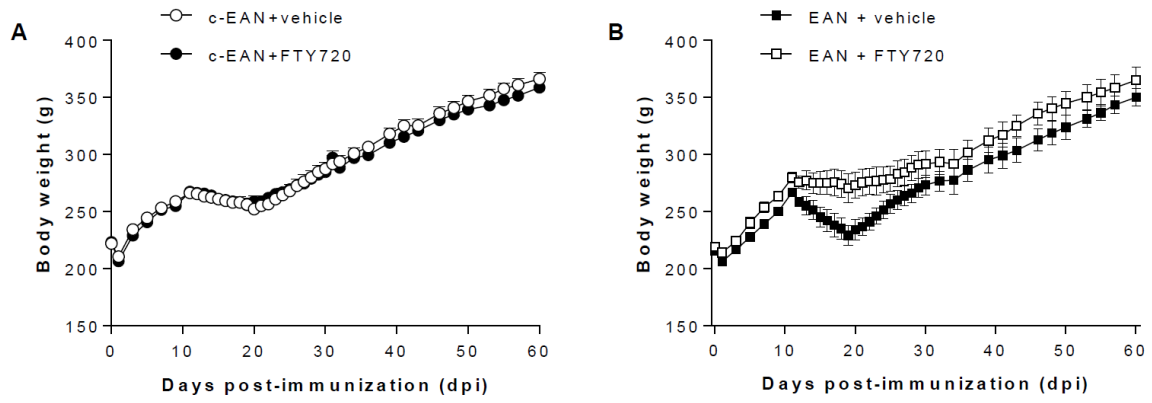
**Figure 4**

**Figure 5**

**Figure 6**



Supplementary Figure 1 : Effect of FTY720 on the clinical course of EAN. Clinical score values were measured in vehicle (■) and FTY720-treated (□) rats. Therapeutic injections of FTY720 or vehicle were administered intraperitoneally from 12 to 30 days post-immunization (dpi). Mean values, SEM and p values are indicated. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$. n, number of rats.



Supplementary Figure 2 : Effect of FTY720 on the body weight of c-EAN and EAN rats. Clinical score values were measured in vehicle (●, ■) and FTY720-treated (○, □) rats. Therapeutic injections of FTY720 or vehicle were administrated intraperitoneally from 12 to 30 days post-immunization (dpi). Mean values and SEM are indicated. n, number of rats.

DISCUSSION

DISCUSSION

I. Validation et caractérisation d'un modèle murin de polyradiculonévrite chronique

Nous avons pu décrire un nouveau modèle d'EAN chronique facilement reproductible, et ce de manière fiable, par immunisation active de rats Lewis males de 7-8 semaines avec le peptide palmitoylé S-palm P0(180-199). Contrairement à l'EAN classique induite par le peptide P0(180-199), 100 % des rats immunisés avec le peptide S-palm P0(180-199) développent une neuropathie, soit chronique, soit à rechute ; mimant la PIDC humaine (17).

De plus, les données immunohistochimiques et électrophysiologiques indiquent que ce modèle est bien une neuropathie inflammatoire à prédominance démyélinisante et avec une dégénérescence axonale.

Ces travaux confirment que la S-palmitoylation des peptides peut majorer la chronicité des maladies inflammatoires démyélinisantes, comme cela déjà été démontré dans un modèle expérimentale d'EAE induit par le peptide PLP (49). De plus le peptide S-palm P0 cause une maladie plus sévère que le peptide P0 seul.

A. Données électrophysiologiques

Dans la PIDC, l'étude électrophysiologique par électromyographie est un excellent outil diagnostique pour objectiver la démyélinisation au niveau du système nerveux périphérique (59). Notre modèle remplit bien les critères de démyélinisation : réduction des vitesses de conduction sensibles, allongement des latences motrices et présence de blocs de conduction moteurs (60). Bien que la PIDC soit une neuropathie démyélinisante, il existe fréquemment

une perte axonale concomitante, secondaire à la démyélinisation (61,62). Cette perte axonale est également retrouvée dans notre modèle comme le montre la baisse des amplitudes de conduction motrice.

B. Données histologiques

Les analyses immunohistologiques montrent qu'il existe bien dans notre modèle une démyélinisation et une diminution de la densité de fibres myélinisées. Nous retrouvons également une perte axonale. Ces résultats sont en concordance avec les données histologiques connues de la PIDC. Des analyses plus fines permettraient de mieux caractériser les lésions histologiques, notamment en utilisant la microscopie électronique.

C. Données immunologiques

1. Infiltrations de cellules inflammatoires

L'évaluation histologique de l'inflammation montre une infiltration de lymphocytes T et de macrophages. Cette infiltration persiste de façon prolongée, jusqu'au 74^{ème} jour, dans le modèle chronique, contrairement à l'EAN classique. Dans la PIDC, il est montré que les principales cellules lymphoïdes présentes dans les lésions sont des macrophages qui contribuent fortement à la démyélinisation (63). Des biopsies nerveuses de patients avec PIDC retrouvent des clusters de macrophages qui pourraient être considérés comme un marqueur diagnostique (64).

2. Implication de l'interleukine 17

La physiopathologie et l'immunopathogénèse de la PIDC reste actuellement mal comprise. Il a cependant été récemment suggéré que les lymphocytes T Th17 pourraient être un déterminant important de l'évolution de la PIDC (65). De plus, il a été montré une accumulation de cellules IL-17⁺ dans les nerfs sciatiques de modèles d'EAN, en corrélation temporelle avec la sévérité des signes neurologiques (66). Suites à ces données, il paraissait important d'évaluer la présence de cellules Th17 et d'IL-17 dans notre modèle. En immunohistochimie, nous avons pu montrer que la phase tardive de la maladie (jour 74) était caractérisée par une accumulation de cellules Th17 dans le modèle d'EAN chronique mais pas chez les rats EAN. De plus, les taux d'IL17 dans le sérum sont significativement plus élevés chez les rats avec EAN chronique que chez les rats EAN tout au long de la maladie. Ces résultats suggèrent que les taux élevés de cellules Th17 et d'interleukine 17 pourraient être un déterminant important de la chronicité dans notre modèle.

3. Balance Th1/Th2

La balance Th1/Th2 a été évaluée en mesurant la production de cytokines pro- (IFN-gamma) et anti-inflammatoires (IL-4 et IL-10) sur le surnageant de cellules de ganglions lymphatiques. Nous avons pu montrer que l'IL-4 était significativement plus élevée dans la phase aiguë des animaux avec EAN chronique par rapport aux rats EAN, cela pourrait refléter un effort pour empêcher les cellules Th1 de détruire les nerfs périphériques. Ce mécanisme a été suggéré dans la PIDC où le ratio de cellules IL-4⁺/IFN-gamma est augmenté (67).

Lors de la phase de récupération des rats EAN, le taux d'IL-4 produite est élevé, alors qu'au même délai (jour 43) les taux d'IL-4 produite pas les animaux chroniques sont très bas, indiquant que l'IL-4 pourrait contribuer au développement de la maladie et à sa

chronicisation. Cependant, d'autres études sont nécessaires pour pouvoir corréler l'expression des cytokines avec l'évolution de la maladie (68,69).

4. Immunité humorale

Outre l'immunité cellulaire, l'immunité humorale est également impliquée dans la physiopathologie de la PIDC. Jusqu'à présent, il n'y a pas d'auto-anticorps pathogène qui ai pu être identifié dans la PIDC classique, mais il a été montré que du sérum de patients avec PIDC pouvait induire une démyélinisation périphérique chez les animaux (70). L'implication d'auto-anticorps dans la PIDC est également démontrée par la réponse thérapeutique aux immunoglobulines polyvalentes et aux échanges plasmatiques (59).

Nous avons donc étudié dans notre modèle la présence d'anticorps anti P0(180-199), l'antigène inducteur. De hauts niveaux d'anticorps ont été retrouvés chez les rats chroniques comme chez les rats EAN. Cependant, chez les rats chroniques, le taux d'anticorps reste élevé tout au long de la maladie alors qu'il diminue rapidement chez les rats EAN. Ces résultats confirment que la thiopalmitoylation peut également majorer la réponse humorale, comme cela avait déjà été montré dans des travaux antérieurs du laboratoire (49). Cependant, le rôle et la pathogénicité de ces anticorps doivent être étudiés plus précisément.

II. Evaluation de l'effet du Fingolimod dans notre modèle animal

Il y a actuellement peu de traitements validés pour la PDIC humaine. Bien que la majorité des patients puissent être traités avec succès par immunoglobulines intraveineuses, par échange de plasma ou par corticostéroïdes, un grand nombre de patients avec CIDP ne répondent pas ou

deviennent réfractaires à ces traitements, et certains sont atteints d'une invalidité permanente (17,71–76). De nouvelles options thérapeutiques sont donc attendues avec impatience, avec une efficacité élevée et moins d'effets secondaires. Pour étudier ces nouvelles stratégies thérapeutiques, l'utilisation de modèles animaux fiables et facilement reproductibles est essentielle. Nous avons montré précédemment que notre modèle animal de polyradiculonévrite chronique était fiable et reproductible. Dans ce contexte, il est donc possible de l'utiliser en vue d'essais thérapeutiques. Nous avons donc étudié les effets thérapeutiques du FTY720, un agoniste du récepteur S1P, sur notre modèle de rat d'EAN chronique mimant la CIDP humaine (77). Les résultats de nos expériences ont montré un effet bénéfique sur notre modèle de rat avec EAN chronique du FTY720 administré thérapeutiquement (1 mg / kg) par des injections intrapéritonéales.

A. Evaluation clinique

Le Fingolimod a permis, dans notre modèle, de diminuer la sévérité de la pathologie et de supprimer sa chronicité. Des rats développant une EAN classique ont été utilisés comme groupe contrôle. Dans ce groupe, le Fingolimod permet de diminuer significativement les scores cliniques maximaux et permet une meilleure récupération clinique finale. Des résultats similaires ont été rapportés dans la littérature sur un modèle de souris développant une polyneuropathie auto-immune spontanée mais avec FTY720 administré par voie orale (même dose) (78). Une autre étude sur le même modèle animal a depuis suggéré le contraire, mais ces résultats contradictoires pourraient être expliqués par le fait que dans la dernière étude, le traitement a commencé quand la démyélinisation était déjà bien plus avancée (79).

Nous avons également utilisé le modèle EAN aigu classique, induit avec PO (180-199), pour comparaison. Dans ce groupe d'animaux, le traitement FTY720 a significativement diminué

les scores cliniques maximaux par rapport au traitement par le véhicule et a permis une récupération plus rapide des rats. Ces résultats sont en accord avec une étude réalisée sur un modèle EAN induit avec le peptide synthétique neuritogène P2 (57-81) (80).

B. Evaluation électrophysiologique

Les analyses électrophysiologiques ont permis de confirmer les résultats cliniques. En effet, les animaux chroniques traités par Fingolimod normalisent progressivement la vitesse de conduction sensitive et l'amplitude des conductions motrice. On note également une disparition des blocs de conduction.

C. Evaluation histologique

Les animaux avec EAN chronique traités par Fingolimod présentent des fibres myélinisées de même calibre que celles des animaux contrôle ou des rats EAN, démontrant que chez les rats traités, il existe une restauration des fibres myélinisées ; résultant en une atténuation de la démyélinisation et de la dégénérescence axonale.

D. Evaluation immunologique

Le Fingolimod a également permis de réduire l'infiltration cellulaire par les macrophages et les cellules IL-17⁺ dans le système nerveux périphérique, à la phase tardive de la maladie chronique. Les taux d'IL-17 dans le sérum et les taux d'anticorps anti P0(180-199) sont également diminués chez les rat traités.

Fait intéressant, le FTY720 réduit les niveaux de cytokines pro-inflammatoires IL-17, IFN γ et TNF circulantes et les niveaux de réponses d'anticorps contre le peptide antigénique P0 (180-199). Ces résultats sont en accord avec le mécanisme d'action du FTY720. En effet, l'action la plus robuste du FTY720 est de séquestrer les lymphocytes dans les ganglions lymphatiques et de bloquer leur trafic vers les organes cibles (81,82) induisant une réduction des médiateurs pro-inflammatoires critiques dans le sang incluant l'IL-17, l'IFN γ et le TNF. En effet, des mécanismes supplémentaires ont été attribués aux effets de FTY720. Des études *in vitro* ont démontré l'implication de S1P dans le développement des cellules Th17 et suggèrent que l'immunosuppression par FTY720 pourrait être partiellement attribuable à l'inflammation médiée par Th17 (83).

Il a été récemment démontré que l'IL-17 joue un rôle majeur dans certaines maladies auto-immunes, notamment la sclérose en plaques et le SGB (84). L'immunopathogenèse de la PIDC reste mal comprise, mais il a été récemment suggéré que Th17 pourrait être un déterminant important de l'évolution de la PIDC (79). Il a également été montré dans l'EAN que l'accumulation de cellules IL-17⁺ dans les nerfs sciatiques corrélait temporellement avec la gravité des signes neurologiques (80). Nos résultats sont en accord avec l'implication possible des cellules IL-17⁺ dans la chronicité de la maladie. Par ailleurs, l'activité thérapeutique du FTY720 dans le modèle EAN chronique pourrait être suivie par la mesure de l'IL-17 circulante et des anticorps circulants anti-P0 (180-199) qui pourraient donc être utilisés comme marqueurs biologiques.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

De façon globale, nos résultats confirment que notre modèle animale de polyradiculonévrite chronique est bien un modèle fiable, reproductible et mimant la PIDC humaine. Il peut donc être aisément utilisé en vue de tester de façon translationnelle des molécules potentiellement thérapeutiques dans cette pathologie afin de valider des essais cliniques chez l'homme.

En effet, il n'y actuellement que peu d'alternatives thérapeutiques dans la PIDC. Le Fingolimod pourrait être une option thérapeutique dans cette maladie. L'efficacité et l'innocuité de 0,5 mg FTY720 administré par voie orale une fois par jour par rapport au placebo chez 106 patients atteints de PIDC ont fait l'objet d'une étude clinique (FORCIDP) (58) et les résultats de cette étude viennent d'être publiés (85). Malheureusement, l'étude a dû être interrompue en raison d'un manque d'efficacité. Ces résultats pourraient s'expliquer de plusieurs façon mais, mais la principale explication serait que plusieurs parties de la conception de l'étude ne sont pas suffisantes pour montrer l'efficacité du médicament, et plus précisément le délais d'action du Fingolimod (86). D'autres analogues synthétiques de S1P ayant ou pouvant avoir des effets thérapeutiques similaires à ceux du Fingolimod pourraient être testés dans les neuropathies périphériques à médiation immunitaire telles que la CIDP à condition de faire attention au choix des patients et aux traitements antérieurs, sélectionnant les bons critères d'inclusion, ainsi que le bon critère d'évaluation principal.

Nos résultats montrent que FTY720 présente des effets bénéfiques remarquables à la fois au niveau biologique et clinique sur notre modèle animal. Même si le Fingolimod a été évalué dans un essai clinique chez des patients avec CIDP et a démontré des effets limités comparé au placebo (85), en montrant son efficacité in vivo, notre modèle de rat peut prouver que le Fingolimod et ses analogues peuvent être testés dans les neuropathies dysimmunitaires. De

façon plus générale, ils mettent également en évidence le potentiel des molécules ciblant SIP, pour le développement de médicaments novateurs dans les neuropathies démyélinisantes auto-immunes.

Par ailleurs, d'autres nouvelles alternatives thérapeutiques pourraient être testées telles que les thérapies anti-IL-17, les thérapies basées sur les peptides modifiés.

Notre modèle pourrait également permettre de mieux comprendre les mécanismes physiopathologiques de la PIDC. L'autophagie est l'une des pistes physiopathologiques qui pourraient participer au développement de la PIDC. Notre modèle pourrait permettre de mieux comprendre les différentes voies impliquées et peut être, encore une fois, de trouver des thérapies spécifiques ciblant cette voie.

Il serait également intéressant de tester la sensibilité de certains biomarqueurs de la réponse thérapeutique, tels que l'IL-17 sérique, chez l'homme, en comparaison avec nos résultats chez l'animal et d'essayer de développer d'hypothétiques biomarqueurs diagnostiques.

BIBLIOGRAPHIE

1. Campagnoni AT, Macklin WB. Cellular and molecular aspects of myelin protein gene expression. *Mol Neurobiol.* 1988;2(1):41- 89.
2. Baumann N, Pham-Dinh D. Biology of oligodendrocyte and myelin in the mammalian central nervous system. *Physiol Rev.* avr 2001;81(2):871- 927.
3. Rosati G. The prevalence of multiple sclerosis in the world: an update. *Neurol Sci.* avr 2001;22(2):117- 39.
4. Gold R, Linington C, Lassmann H. Understanding pathogenesis and therapy of multiple sclerosis via animal models: 70 years of merits and culprits in experimental autoimmune encephalomyelitis research. *Brain.* août 2006;129(Pt 8):1953- 71.
5. Nakahara J, Aiso S, Suzuki N. Autoimmune versus oligodendrogliopathy: the pathogenesis of multiple sclerosis. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* oct 2010;58(5):325- 33.
6. Tuohy VK. Peptide determinants of myelin proteolipid protein (PLP) in autoimmune demyelinating disease: a review. *Neurochem Res.* août 1994;19(8):935- 44.
7. Swanborg RH. Experimental autoimmune encephalomyelitis in rodents as a model for human demyelinating disease. *Clin Immunol Immunopathol.* oct 1995;77(1):4- 13.
8. Ewing C, Bernard CC. Insights into the aetiology and pathogenesis of multiple sclerosis. *Immunol Cell Biol.* févr 1998;76(1):47- 54.
9. Baxter AG. The origin and application of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Nat Rev Immunol.* nov 2007;7(11):904- 12.
10. Hughes RAC, Cornblath DR. Guillain-Barré syndrome. *Lancet.* 5 nov 2005;366(9497):1653- 66.
11. Cosi V, Versino M. Guillain-Barré syndrome. *Neurol Sci.* mars 2006;27 Suppl 1:S47-51.
12. Vucic S, Kiernan MC, Cornblath DR. Guillain-Barré syndrome: an update. *J Clin Neurosci.* juin 2009;16(6):733- 41.
13. Hartung HP, Kieseier BC, Kiefer R. Progress in Guillain-Barré syndrome. *Curr Opin Neurol.* oct 2001;14(5):597- 604.
14. Kieseier BC, Kiefer R, Gold R, Hemmer B, Willison HJ, Hartung H-P. Advances in understanding and treatment of immune-mediated disorders of the peripheral nervous system. *Muscle Nerve.* août 2004;30(2):131- 56.
15. Ang CW, Jacobs BC, Laman JD. The Guillain-Barré syndrome: a true case of molecular mimicry. *Trends Immunol.* févr 2004;25(2):61- 6.

16. Willison HJ, O'Hanlon GM. The immunopathogenesis of Miller Fisher syndrome. *J Neuroimmunol.* déc 1999;100(1- 2):3- 12.
17. Vallat J-M, Sommer C, Magy L. Chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy: diagnostic and therapeutic challenges for a treatable condition. *Lancet Neurol.* avr 2010;9(4):402- 12.
18. Dyck PJ, Lais AC, Ohta M, Bastron JA, Okazaki H, Groover RV. Chronic inflammatory polyradiculoneuropathy. *Mayo Clin Proc.* nov 1975;50(11):621- 37.
19. Hughes RAC, Allen D, Makowska A, Gregson NA. Pathogenesis of chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. *J Peripher Nerv Syst.* mars 2006;11(1):30- 46.
20. Research criteria for diagnosis of chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy (CIDP). Report from an Ad Hoc Subcommittee of the American Academy of Neurology AIDS Task Force. *Neurology.* mai 1991;41(5):617- 8.
21. French CIDP Study Group. Recommendations on diagnostic strategies for chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* févr 2008;79(2):115- 8.
22. Nicolas G, Maisonobe T, Le Forestier N, Léger J-M, Bouche P. Proposed revised electrophysiological criteria for chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. *Muscle Nerve.* janv 2002;25(1):26- 30.
23. Joint Task Force of the EFNS and the PNS. European Federation of Neurological Societies/Peripheral Nerve Society Guideline on management of chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy: report of a joint task force of the European Federation of Neurological Societies and the Peripheral Nerve Society--First Revision. *J Peripher Nerv Syst.* mars 2010;15(1):1- 9.
24. Maisonobe T, Chassande B, Vérin M, Jouni M, Léger JM, Bouche P. Chronic dysimmune demyelinating polyneuropathy: a clinical and electrophysiological study of 93 patients. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* juill 1996;61(1):36- 42.
25. Azulay JP, Pouget J, Pellissier JF, Blin O, Serratrice G. [Chronic polyradiculoneuritis. 25 cases]. *Rev Neurol (Paris).* 1992;148(12):752- 61.
26. Viala K, Maisonobe T, Stojkovic T, Koutlidis R, Ayrignac X, Musset L, et al. A current view of the diagnosis, clinical variants, response to treatment and prognosis of chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. *J Peripher Nerv Syst.* mars 2010;15(1):50- 6.
27. Serratrice G, Azulay JP, Pouget J, Boucraut J. [Variable and recurrent ptosis and ophthalmoplegia in chronic polyradiculoneuritis]. *Rev Neurol (Paris).* avr 1997;153(3):197- 200.
28. Attarian S, Azulay JP, Boucraut J, Escande N, Pouget J. Terminal latency index and modified F ratio in distinction of chronic demyelinating neuropathies. *Clin Neurophysiol.* mars 2001;112(3):457- 63.

29. Attarian S, Azulay J-P, Lardillier D, Verschueren A, Pouget J. Transcranial magnetic stimulation in lower motor neuron diseases. *Clin Neurophysiol.* janv 2005;116(1):35- 42.
30. Lewis RA, Sumner AJ, Brown MJ, Asbury AK. Multifocal demyelinating neuropathy with persistent conduction block. *Neurology.* sept 1982;32(9):958- 64.
31. Willison HJ, Yuki N. Peripheral neuropathies and anti-glycolipid antibodies. *Brain.* déc 2002;125(Pt 12):2591- 625.
32. Attarian S, Boucraut J, Hubert AM, Uzenot D, Delmont E, Verschueren A, et al. Chronic ataxic neuropathies associated with anti-GD1b IgM antibodies: response to IVIg therapy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* janv 2010;81(1):61- 4.
33. Attarian S, Azulay J-P, Verschueren A, Pouget J. Magnetic stimulation using a triple-stimulation technique in patients with multifocal neuropathy without conduction block. *Muscle Nerve.* déc 2005;32(6):710- 4.
34. Eftimov F, Winer JB, Vermeulen M, de Haan R, van Schaik IN. Intravenous immunoglobulin for chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. *Cochrane Database Syst Rev.* 30 déc 2013;(12):CD001797.
35. Dyck PJ, O'Brien PC, Oviatt KF, Dinapoli RP, Daube JR, Bartleson JD, et al. Prednisone improves chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy more than no treatment. *Ann Neurol.* févr 1982;11(2):136- 41.
36. Mehndiratta MM, Hughes RAC, Pritchard J. Plasma exchange for chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. *Cochrane Database Syst Rev.* 25 août 2015;(8):CD003906.
37. Zhu J, Deng GM, Levi M, Wahren B, Diab A, van der Meide PH, et al. Prevention of experimental autoimmune neuritis by nasal administration of P2 protein peptide 57-81. *J Neuropathol Exp Neurol.* mars 1998;57(3):291- 301.
38. Zhu J, Pelidou SH, Deretzi G, Levi M, Mix E, van der Meide P, et al. P0 glycoprotein peptides 56-71 and 180-199 dose-dependently induce acute and chronic experimental autoimmune neuritis in Lewis rats associated with epitope spreading. *J Neuroimmunol.* 1 mars 2001;114(1- 2):99- 106.
39. Gabriel CM, Hughes RA, Moore SE, Smith KJ, Walsh FS. Induction of experimental autoimmune neuritis with peripheral myelin protein-22. *Brain.* oct 1998;121 (Pt 10):1895- 902.
40. Mäurer M, Gold R. Animal models of immune-mediated neuropathies. *Curr Opin Neurol.* oct 2002;15(5):617- 22.
41. Zou LP, Ljunggren HG, Levi M, Nennesmo I, Wahren B, Mix E, et al. P0 protein peptide 180-199 together with pertussis toxin induces experimental autoimmune neuritis in resistant C57BL/6 mice. *J Neurosci Res.* 1 déc 2000;62(5):717- 21.
42. Calida DM, Kremlev SG, Fujioka T, Hilliard B, Ventura E, Constantinescu CS, et al. Experimental allergic neuritis in the SJL/J mouse: induction of severe and reproducible

- disease with bovine peripheral nerve myelin and pertussis toxin with or without interleukin-12. *J Neuroimmunol.* 10 juill 2000;107(1):1- 7.
43. Yuki N, Yamada M, Koga M, Odaka M, Susuki K, Tagawa Y, et al. Animal model of axonal Guillain-Barré syndrome induced by sensitization with GM1 ganglioside. *Ann Neurol.* juin 2001;49(6):712- 20.
 44. Susuki K, Nishimoto Y, Koga M, Nagashima T, Mori I, Hirata K, et al. Various immunization protocols for an acute motor axonal neuropathy rabbit model compared. *Neurosci Lett.* 16 sept 2004;368(1):63- 7.
 45. Lassmann H, Fierz W, Neuchrist C, Meyermann R. Chronic relapsing experimental allergic neuritis induced by repeated transfer of P2-protein reactive T cell lines. *Brain.* févr 1991;114 (Pt 1B):429- 42.
 46. Jung S, Gaupp S, Korn T, Köllner G, Hartung H-P, Toyka KV. Biphasic form of experimental autoimmune neuritis in dark Agouti rats and its oral therapy by antigen-specific tolerization. *J Neurosci Res.* 15 févr 2004;75(4):524- 35.
 47. Salomon B, Rhee L, Bour-Jordan H, Hsin H, Montag A, Soliven B, et al. Development of spontaneous autoimmune peripheral polyneuropathy in B7-2-deficient NOD mice. *J Exp Med.* 3 sept 2001;194(5):677- 84.
 48. Weimbs T, Stoffel W. Proteolipid protein (PLP) of CNS myelin: positions of free, disulfide-bonded, and fatty acid thioester-linked cysteine residues and implications for the membrane topology of PLP. *Biochemistry.* 15 déc 1992;31(49):12289- 96.
 49. Greer JM, Denis B, Sobel RA, Trifilieff E. Thiopalmitoylation of myelin proteolipid protein epitopes enhances immunogenicity and encephalitogenicity. *J Immunol.* 1 juin 2001;166(11):6907- 13.
 50. Pfender NA, Grosch S, Roussel G, Koch M, Trifilieff E, Greer JM. Route of uptake of palmitoylated encephalitogenic peptides of myelin proteolipid protein by antigen-presenting cells: importance of the type of bond between lipid chain and peptide and relevance to autoimmunity. *J Immunol.* 1 févr 2008;180(3):1398- 404.
 51. Beaino W, Trifilieff E. Thiopalmitoylated peptides from the peripheral nervous system myelin p0 protein: synthesis, characterization, and neuritogenic properties. *Bioconjug Chem.* 18 août 2010;21(8):1439- 47.
 52. Shy ME. Charcot-Marie-Tooth disease: an update. *Curr Opin Neurol.* oct 2004;17(5):579- 85.
 53. Horga A, Montalban X. FTY720 (fingolimod) for relapsing multiple sclerosis. *Expert Rev Neurother.* mai 2008;8(5):699- 714.
 54. Chun J, Hartung H-P. Mechanism of action of oral fingolimod (FTY720) in multiple sclerosis. *Clin Neuropharmacol.* avr 2010;33(2):91- 101.
 55. VIDAL. Monographie du Gilenya. 2018.

56. Luchtman D, Gollan R, Ellwardt E, Birkenstock J, Robohm K, Siffrin V, et al. In vivo and in vitro effects of multiple sclerosis immunomodulatory therapeutics on glutamatergic excitotoxicity. *J Neurochem.* mars 2016;136(5):971- 80.
57. Rossi S, Lo Giudice T, De Chiara V, Musella A, Studer V, Motta C, et al. Oral fingolimod rescues the functional deficits of synapses in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Br J Pharmacol.* févr 2012;165(4):861- 9.
58. ClinicalTrials.gov. FORCIDP, ClinicalTrials.gov Identifier NCT01625182.
59. Van den Bergh PYK, Rajabally YA. Chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. *Presse Med.* juin 2013;42(6 Pt 2):e203-215.
60. Van den Bergh PYK, Piéret F. Electrodiagnostic criteria for acute and chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. *Muscle Nerve.* avr 2004;29(4):565- 74.
61. Köller H, Kieseier BC, Jander S, Hartung H-P. Chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *N Engl J Med.* 31 mars 2005;352(13):1343- 56.
62. Harbo T, Andersen H, Jakobsen J. Length-dependent weakness and electrophysiological signs of secondary axonal loss in chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. *Muscle Nerve.* août 2008;38(2):1036- 45.
63. Vital C, Vital A, Lagueny A, Ferrer X, Fontan D, Barat M, et al. Chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy: immunopathological and ultrastructural study of peripheral nerve biopsy in 42 cases. *Ultrastruct Pathol.* déc 2000;24(6):363- 9.
64. Sommer C, Koch S, Lammens M, Gabreels-Festen A, Stoll G, Toyka KV. Macrophage clustering as a diagnostic marker in sural nerve biopsies of patients with CIDP. *Neurology.* 27 déc 2005;65(12):1924- 9.
65. Chi LJ, Xu WH, Zhang ZW, Huang HT, Zhang LM, Zhou J. Distribution of Th17 cells and Th1 cells in peripheral blood and cerebrospinal fluid in chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. *J Peripher Nerv Syst.* déc 2010;15(4):345- 56.
66. Zhang Z-Y, Zhang Z, Schluesener HJ. FTY720 attenuates lesional interleukin-17(+) cell accumulation in rat experimental autoimmune neuritis. *Neuropathol Appl Neurobiol.* oct 2009;35(5):487- 95.
67. Horiuchi I, Ochi H, Murai H, Osoegawa M, Minohara M, Furuya H, et al. Th2 shift in mononeuritis multiplex and increase of Th2 cells in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy: an intracellular cytokine analysis. *J Neurol Sci.* 15 déc 2001;193(1):49- 52.
68. Madia F, Frisullo G, Nociti V, Conte A, Luigetti M, Del Grande A, et al. pSTAT1, pSTAT3, and T-bet as markers of disease activity in chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. *J Peripher Nerv Syst.* juin 2009;14(2):107- 17.
69. Rentzos M, Angeli AV, Rombos A, Kyrozis A, Nikolaou C, Zouvelou V, et al. Proinflammatory cytokines in serum and cerebrospinal fluid of CIDP patients. *Neurol Res.* nov 2012;34(9):842- 6.

70. Yan WX, Taylor J, Andrias-Kauba S, Pollard JD. Passive transfer of demyelination by serum or IgG from chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy patients. *Ann Neurol.* juin 2000;47(6):765- 75.
71. Dalakas MC, Medscape. Advances in the diagnosis, pathogenesis and treatment of CIDP. *Nat Rev Neurol.* 16 août 2011;7(9):507- 17.
72. Ubogu EE. Inflammatory neuropathies: pathology, molecular markers and targets for specific therapeutic intervention. *Acta Neuropathol.* oct 2015;130(4):445- 68.
73. Dalakas MC. Clinical trials in CIDP and chronic autoimmune demyelinating polyneuropathies. *J Peripher Nerv Syst.* mai 2012;17 Suppl 2:34- 9.
74. Schafflick D, Kieseier BC, Wiendl H, Meyer Zu Horste G. Novel pathomechanisms in inflammatory neuropathies. *J Neuroinflammation.* 28 nov 2017;14(1):232.
75. Bright RJ, Wilkinson J, Coventry BJ. Therapeutic options for chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy: a systematic review. *BMC Neurol.* 7 févr 2014;14:26.
76. Ripellino P, Fleetwood T, Cantello R, Comi C. Treatment of chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy: from molecular bases to practical considerations. *Autoimmune Dis.* 2014;2014:201657.
77. Brun S, Schall N, Bonam SR, Bigaut K, Mensah-Nyagan A-G, de Sèze J, et al. An autophagy-targeting peptide to treat chronic inflammatory demyelinating polyneuropathies. *J Autoimmun.* août 2018;92:114- 25.
78. Kim H-J, Jung C-G, Dukala D, Bae H, Kakazu R, Wollmann R, et al. Fingolimod and related compounds in a spontaneous autoimmune polyneuropathy. *J Neuroimmunol.* 29 sept 2009;214(1- 2):93- 100.
79. Huehnchen P, Boehmerle W, Endres M. Fingolimod therapy is not effective in a mouse model of spontaneous autoimmune peripheral polyneuropathy. *Sci Rep.* 4 avr 2018;8(1):5648.
80. Zhang Z, Zhang Z-Y, Fauser U, Schluesener HJ. FTY720 ameliorates experimental autoimmune neuritis by inhibition of lymphocyte and monocyte infiltration into peripheral nerves. *Exp Neurol.* avr 2008;210(2):681- 90.
81. Mandala S, Hajdu R, Bergstrom J, Quackenbush E, Xie J, Milligan J, et al. Alteration of lymphocyte trafficking by sphingosine-1-phosphate receptor agonists. *Science.* 12 avr 2002;296(5566):346- 9.
82. Brinkmann V, Billich A, Baumruker T, Heining P, Schmouder R, Francis G, et al. Fingolimod (FTY720): discovery and development of an oral drug to treat multiple sclerosis. *Nat Rev Drug Discov.* nov 2010;9(11):883- 97.
83. Asakura H, Churin Y, Bauer B, Boettcher JP, Bartfeld S, Hashii N, et al. *Helicobacter pylori* HP0518 affects flagellin glycosylation to alter bacterial motility. *Mol Microbiol.* déc 2010;78(5):1130- 44.

84. Wang X, Ma C, Wu J, Zhu J. Roles of T helper 17 cells and interleukin-17 in neuroautoimmune diseases with emphasis on multiple sclerosis and Guillain-Barré syndrome as well as their animal models. *J Neurosci Res.* juill 2013;91(7):871- 81.
85. Hughes R, Dalakas MC, Merkies I, Latov N, Léger J-M, Nobile-Orazio E, et al. Oral fingolimod for chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy (FORCIDP Trial): a double-blind, multicentre, randomised controlled trial. *Lancet Neurol.* août 2018;17(8):689- 98.
86. Magy L. Fingolimod and CIDP: insights from negative results. *Lancet Neurol.* août 2018;17(8):655- 6.

ANNEXES

Annexe 1 : Liste des communications orales et par affiche

Annexe 2 : Poster JNLF 2014 : Validation et caractérisation d'un modèle animal de polyradiculonévrite chronique.

L. Kremer, S. Brun, W. Beaino, O. Taleb, D. Lam, E. Triffilief, J. de Seze

Annexe 3 : Poster AAN 2014 : Characterization of a new animal mode of chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy.

L. Kremer, S. Brun, W. Beaino, O. Taleb, D. Lam, E. Triffilief, J. de Seze

Annexe 4 : Poster JNLF 2015 : Effet du FTY720 (Fingolimod) chez un nouveau modèle animal préclinique de polyradiculonévrite inflammatoire démyélinisante chronique.

L. Kremer, S Brun, E. Trifilieff, J. de Seze

Annexe 5 : Poster AAN 2015 : Effect of FTY720 (Fingolimod) in a new preclinical rat model for chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy (CIDP).

S Brun, L. Kremer, E. Trifilieff, J. de Seze

ANNEXE 1

Communications orales :

Journée de la SFN, 17 janvier 2014 : Développement et caractérisation d'un modèle animal de polyradiculonévrite chronique.

JNLF 2015 Session de la Société Française de neurologie (SFN), 1^{er} avril 2015 : Effet du FTY720 (Fingolimod) chez un nouveau modèle animal préclinique de polyradiculonévrite inflammatoire démyélinisante chronique.

Troisièmes journées scientifiques de la fédération de médecine Translationnelle de Strasbourg (FMST), 16 avril 2015, Strasbourg De nouvelles stratégies thérapeutiques pour la polyradiculonévrite inflammatoire démyélinisante chronique (PIDC) : de l'animal à l'homme.

Communications par affiche :

JNLF 2014 : Validation et caractérisation d'un modèle animal de polyradiculonévrite chronique.

L. Kremer, S. Brun, W. Beaino, O. Taleb, D. Lam, E. Triffilief, J. de Seze

Journées de Neurologie de Langue Française (JNLF), 1-4 avril 2014, Strasbourg

AAN 2014 : Characterization of a new animal mode of chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy.

L. Kremer, S. Brun, W. Beaino, O. Taleb, D. Lam, E. Triffilief, J. de Seze

American Academy of Neurology (AAN), 26 avril – 3 mai 2014, Philadelphia, Pennsylvania

JNLF 2015 : Effet du FTY720 (Fingolimod) chez un nouveau modèle animal préclinique de polyradiculonévrite inflammatoire démyélinisante chronique.

L. Kremer, S Brun, E. Trifilieff, J. de Seze

Journées de Neurologie de Langue Française (JNLF), 31 mars - 3 avril 2015, Marseille

AAN 2015 : Effect of FTY720 (Fingolimod) in a new preclinical rat model for chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy (CIDP).

S Brun, L. Kremer, E. Trifilieff, J. de Seze

American Academy of Neurology (AAN), 18 – 25 avril 2015, Washington, DC

ANNEXE 2

Poster JNLF 2014 :

Validation et caractérisation d'un modèle animal de polyradiculonévrite chronique.

L. Kremer, S. Brun, W. Beaino, O. Taleb, D. Lam, E. Triffilief, J. de Seze



VALIDATION ET CARACTÉRISATION D'UN MODÈLE ANIMAL DE POLYRADICULONÉVRITE CHRONIQUE

Laurent Kremer^{1,2}, Susana Brun², Wissam Beaino², Omar Taleb², Dao Lam², Elisabeth Triffilief², Jérôme de Seze^{1,2}

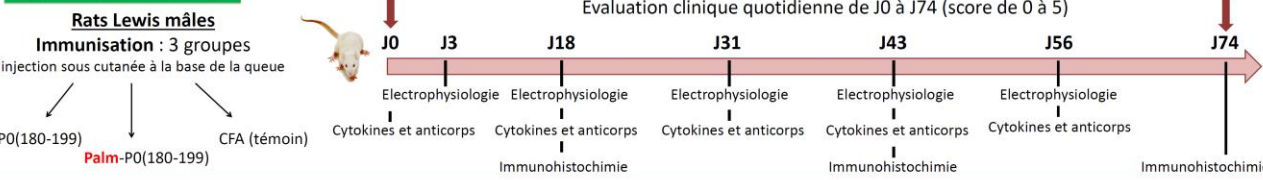
1. Service de Neurologie, CHU de Strasbourg - 2. Biopathologie de la Myéline, Neuroprotection et Stratégies Thérapeutiques, UMR 5 INSERM U1119, Fédération de Médecine Translationnelle de Strasbourg (FMT), Université de Strasbourg, Strasbourg, France



Problématique : Le syndrome de Guillain-Barré (SGB) et la polyradiculonévrite inflammatoire démyélinisante chronique (PIDC) sont des maladies inflammatoires auto-immunes du système nerveux périphérique. La plupart des connaissances sur la pathogenèse GBS dérivent du modèle animal de névrite auto-immune expérimentale (EAN) qui peut être induite par immunisation avec le peptide P0(180-199). À l'heure actuelle, il n'existe pas de modèle animal fiable pour la PIDC. Lors de travaux précédents au laboratoire, nous avons montré que le peptide thiopalmitoylé S-palmP0(180-199) est capable d'induire une EAN chronique chez le rat Lewis.

Objectif : Caractériser un nouveau modèle animal de PIDC.

Matériels et méthodes :



Résultats :

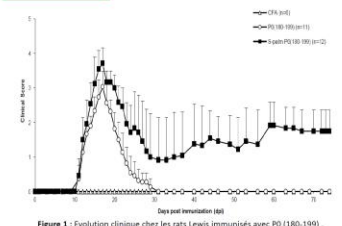


Figure 1 : Evolution clinique chez les rats Lewis immunisés avec PO(180-199), S-palmPO(180-199) ou CFA (contrôle).

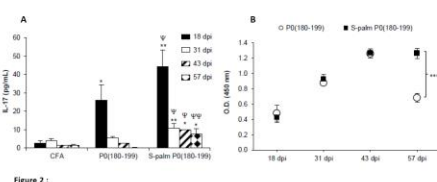


Figure 2 : A) IL-17 dans le sérum des rats immunisés avec le CFA (contrôle), PO(180-199) ou S-palm PO(180-199). B) Anticorps anti-peptide P0(180-199) dans le sérum des rats immunisés avec PO(180-199) et S-palm PO(180-199).

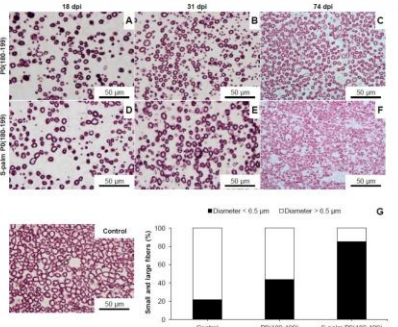


Figure 4 (au dessus) : Immunohistochimie de sections de nerfs sciatiques de rats avec EAN (A,C) et de rats avec maladie chronique (D,F) marqués avec des anticorps anti-MBP montrant une démyélinisation suivie d'une remyélinisation. En G) à J74 la majorité des fibres remyélinisées chez les rats avec maladie chronique étaient de plus petit diamètre par rapport aux rats EAN et témoins.

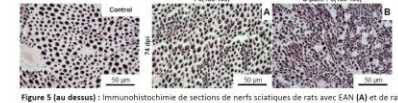


Figure 5 (au dessous) : Immunohistochimie de sections de nerfs sciatiques de rats avec EAN (A) et de rats avec maladie chronique (B) marqués avec des anticorps anti-neurofilaments à J74 montrant une dégénérescence et un remaniement axonal chez les rats avec maladie chronique.

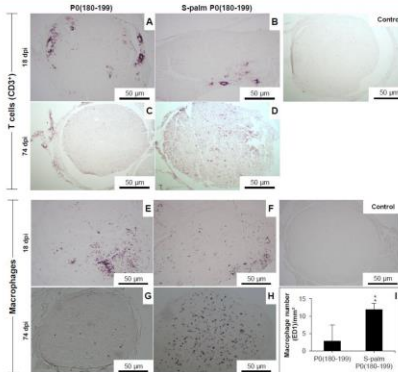


Figure 6 (au dessus) : Immunohistochimie de sections de nerfs sciatiques avec un anticorps anti-CD3 (lymphocytes T) (A à D) et un anticorps anti-CD11b (Macrophages) (E à H). Chez les rats EAN et ceux ayant développé la maladie chronique montrant une importante infiltration de cellules T (A, B) et de macrophages (E, F) autour des vaisseaux sanguins à J18 dans les deux groupes. À J74, on retrouve une diminution considérable du nombre de cellules T et de macrophages chez les rats EAN (C, G) alors que chez les rats avec maladie chronique il persiste quelques cellules T (D) et surtout un nombre important de macrophages (H).



Figure 7 (à droite) : Immunohistochimie de sections de racines de la queue de cheval de rats avec EAN (A) et de rats avec maladie chronique (B) marqués avec des anticorps anti-IL17 à J74 montrant des cellules IL-17+ en nombre important chez les rats avec maladie chronique comparé au rats EAN.

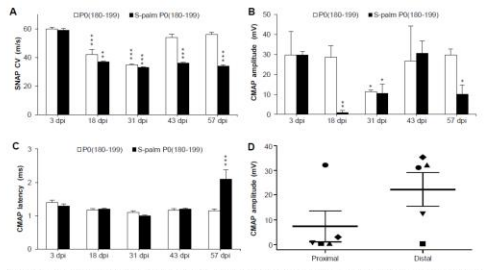


Figure 3 : Electrophysiologie chez les rats avec maladie chronique induite par S-palmPO(180-199) par rapport à EAN induite par PO(180-199). A) Vitesses de conduction nerveuse sensorielle (SNAP CV) du nerf caudal suggérant une démyélinisation persistante sévère chez les rats avec maladie chronique. B) Amplitudes motrices distales des CMAP du nerf sciatique indiquant une dégénérescence axonale récurrente chez les rats avec maladie chronique. C) Latences motrices distales des CMAP du nerf sciatique indiquant une démyélinisation des nerfs moteurs de rats chroniques à J57. D) Amplitudes maximales distales et proximales des CMAP de cinq rats chroniques individualisés à J57 suggérant la présence d'un bloc de conduction.

Discussion et Conclusion :

- Modèle simple et bonne reproductibilité
- Incidence de la maladie après immunisation : 100 %
- Différences marquées entre le modèle chronique et le modèle aigu
- Modèle proche de la PIDC humaine

	PIDC chez l'homme	Notre modèle animal
Cytokines pro-inflammatoires (IFNg, IL-10, IL-17)	↑ pendant la phase active et de rémission	↑ pendant la phase active et de rémission
Cytokine anti-inflammatoire (IL-4)	↑ pendant la phase active ↓ pendant la phase de rémission	↑ pendant la phase active ↓ pendant la phase de rémission
Electrophysiologie	↓ vitesse et amplitude ↑ latence Blocs de conduction	↓ vitesse et amplitude ↑ latence Blocs de conduction
H	Densité fibres myélinisées	Diminution
i	Démyélinisation	OUI
s	Inflammation	OUI
t	Atteinte axonale	OUI

Abbreviations : EAN = neuropathie immunologique expérimentale ; CFA = adjuvant complet de Freund

ANNEXE 4

Poster JNLF 2015 :

Effet du FTY720 (Fingolimod) chez un nouveau modèle animal préclinique de polyradiculonévrite inflammatoire démyélinisante chronique.

L. Kremer, S Brun, E. Trifilieff, J. de Seze



EFFET DU FTY720 (FINGOLIMOD)



CHEZ UN NOUVEAU MODELE ANIMAL PRECLINIQUE

DE POLYRADICULONEVRITE INFLAMMATOIRE DEMYELINISANTE CHRONIQUE

Susana BRUN¹, Laurent KREMER^{1,2}, Elisabeth TRIFILIEFF¹, Jérôme DE SEZE^{1,2}

(1) UMR 5 INSERM U1119 Biopathologie de la Myéline, Neuroprotection et Stratégies Thérapeutiques, Université de Strasbourg, Fédération de Médecine Translationnelle de Strasbourg (FMTS), 67000 Strasbourg – France.
(2) Service de Neurologie - CHU Strasbourg, Hôpital de Hautepieper, 67200 Strasbourg – France.

Problématique :

La polyradiculonévrite chronique (CIDP "chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy") est une pathologie inflammatoire auto-immune du système nerveux périphérique (SNP) caractérisée par une réaction dirigée contre certaines protéines de la myéline et dont les ressources thérapeutiques sont actuellement limitées.

Récemment, nous avons développé un modèle animal préclinique fiable et reproductible de CIDP, la névrite expérimentale auto-immune (EAN) chronique, chez des rats Lewis qui peut maintenant être utilisé comme un outil pour tester des stratégies thérapeutiques pour cette pathologie. Notre modèle répond à des critères électrophysiologiques de démyélinisation avec dégénérescence axonale, confirmées par immunohistopathologie. La phase tardive de la maladie est caractérisée par une accumulation de macrophages dans le nerf sciatique et de cellules interleukine 17 positives (IL-17⁺) dans la queue de cheval, ainsi que par un taux sérique élevé d'IL-17 tout au long de la maladie.

OBJECTIF: Étudier l'effet du FTY720 (fingolimod) sur ce nouveau modèle animal de CIDP (EAN-chronique) que nous avons obtenu chez des rats Lewis par immunisation active avec le peptide P0(180-199) palmitoylé (Palm-P0(180-199)).

Matériels et méthodes :

Des rats Lewis immunisés avec le peptide Palm-P0(180-199) ont été traités avec le FTY720 par injection intrapéritonéale journalière (1mg/kg) dès le début de l'apparition des signes cliniques et pendant 17 jours. Une évaluation clinique quotidienne a été faite pendant 60 jours. Nous avons étudié à 18, 33 et 60 jours post-immunisation (jpi) le taux d'IL-17 dans le sérum (ELISA). Une analyse immunohistochimique du nerf sciatique et de la queue de cheval à 60 jpi a évalué la myéline, l'infiltration cellulaire (macrophages) et la présence de cellules IL-17⁺.

Résultats :

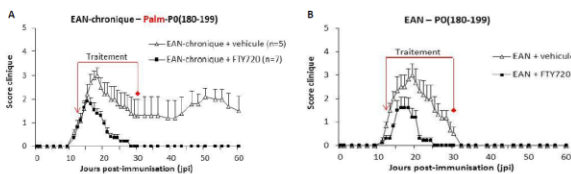


Figure 1 : Evolution clinique des rats EAN-chronique (A) et EAN (B) traités avec FTY720 (Δ) comparés aux rats non traités (■). La moyenne ± SEM est indiquée.

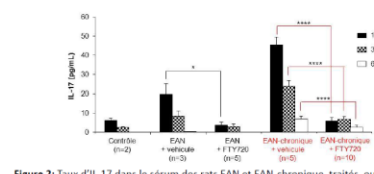


Figure 2 : Taux d'IL-17 dans le sérum des rats EAN et EAN-chronique, traités ou non avec FTY720, à différents stades de la maladie. La moyenne ± SEM est indiquée. *p<0,05, ****p<0,0001.

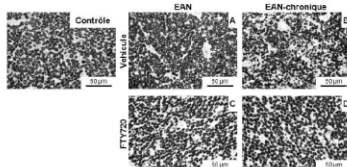


Figure 3 : Marquage de la myéline (anticorps anti-MBP) à 60 jpi sur des sections de nerf sciatique des rats EAN et EAN-chronique, non traités (A,B) et traités (C,D) avec FTY720.

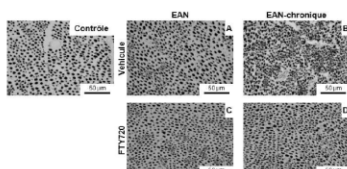


Figure 4 : Marquage des neurofilaments (anticorps anti-SMI-31) à 60 jpi sur des sections de nerf sciatique des rats EAN et EAN-chronique, non traités (A,B) et traités (C,D) avec FTY720.

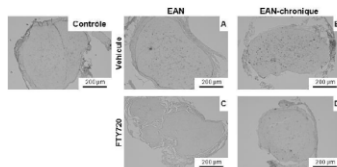


Figure 5 : Marquage de l'infiltration de macrophages (anticorps anti-ED1) à 60 jpi sur des sections de nerf sciatique des rats EAN et EAN-chronique, non traités (A,B) et traités (C,D) avec FTY720. E) Nombre de macrophages par mm² à 60 jpi chez les rats EAN et EAN-chronique traités ou non avec FTY720. La moyenne ± SEM est indiquée. ***p<0,0001.

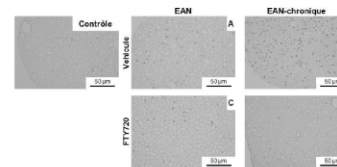


Figure 6 : Marquage des cellules IL-17⁺ (anticorps anti-IL-17) à 60 jpi sur des sections de nerf sciatique des rats EAN et EAN-chronique, non traités (A,B) et traités (C,D) avec FTY720. E) Nombre de cellules IL-17⁺ par mm² à 60 jpi chez les rats EAN et EAN-chronique traités ou non avec FTY720. La moyenne ± SEM est indiquée. ***p<0,001.

Discussion - Conclusion:

Nous avons montré l'effet thérapeutique du FTY720 sur l'EAN-chronique, un nouveau modèle animal mimant la CIDP humaine. Nos résultats ont démontré que le FTY720 peut supprimer la chronicité de la maladie, inhiber l'inflammation dans le SNP et diminuer dans le sang le taux d'IL-17 (cytokine pro-inflammatoire). Nos observations sont en accord avec la possibilité que l'IL-17 pourrait jouer un rôle important dans la pathogenèse de l'EAN-chronique.

Ces données suggèrent un rôle thérapeutique potentiel du fingolimod sur la CIDP humaine et confirment l'intérêt de le tester dans cette pathologie. En effet, fingolimod est actuellement en cours d'évaluation dans l'étude FORCIDP.

Nous remercions Novartis et l'AFM-Téléthon pour leur soutien financier.

ANNEXE 5

Poster AAN 2015 :

Effect of FTY720 (Fingolimod) in a new preclinical rat model for chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy (CIDP).

S Brun, L. Kremer, E. Trifilieff, J. de Seze

EFFECT OF FTY720 (FINGOLIMOD) IN A NEW PRECLINICAL RAT MODEL FOR CHRONIC INFLAMMATORY DEMYELINATING POLYNEUROPATHY (CIDP)

Susana Brun, Laurent Kremer, Elisabeth Trifilieff, Jérôme de Seze
 Inserm UMR_S INSERM U1135, Fédération de Médecine Translationnelle de Strasbourg (FMTS), University of Strasbourg, Strasbourg, France - *Neurology Department, University Hospital of Strasbourg

Introduction: Chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy (CIDP) is an autoimmune-mediated inflammatory disease of the peripheral nervous system (PNS) characterized by a response directed against certain myelin proteins and for which therapies are limited. Recently we have developed a reliable and reproducible preclinical chronic-EAN model in Lewis rats that can now be used as a tool to test treatment strategies for CIDP. Our model fulfills electrophysiological criteria of demyelination with axonal degeneration, confirmed by immunohistopathology. The late phase of the chronic disease is characterized by an accumulation of IL-17⁺ cells in spinal nerve roots and macrophages in sciatic nerves and by high serum IL-17 levels.

Objective : To investigate the therapeutic effect of FTY720 on this new chronic-EAN model for CIDP we obtained in Lewis rats by active immunization with thiolipitoylated (S-palm)-PQ(180-199) peptide.

Methods: Lewis rats immunized with S-palm-PQ(180-199) peptide were assessed daily for clinical signs and treated with FTY720 (1 mg/kg) intraperitoneally once daily from the onset of clinical signs for 17 days. An immunohistological analysis of sciatic nerves and spinal nerve roots at 60 days post injection (dpi) evaluated myelin, axons, macrophages infiltration and IL-17⁺ cells. We also evaluated at 18, 33 and 60 dpi the IL-17 levels in serum by ELISA. Rats immunized with PQ(180-199) peptide to induce the classical EAN were also treated and used as positive control. Rats immunized with complete Freund's adjuvant (CFA) were used as sham control.

Results :

Figure 1: Clinical course of chronic-EAN (A) and EAN (B) rats treated with FTY720 (■) compared to untreated rats (△). Mean values and SEM are indicated. *p < 0.05.

Figure 2: IL-17 levels in the sera of EAN and chronic-EAN rats untreated and treated with FTY720 at 18, 33 and 60 dpi. FTY720 treatment significantly reduces IL-17 levels in the chronic-EAN group at any stage of the disease while in the EAN group IL-17 levels are only reduced at 18 dpi. Mean values and SEM are indicated. *p < 0.05, ****p < 0.0001.

Figure 3: Cross sections of sciatic nerves of EAN and chronic-EAN rats treated with FTY720 (1 mg/kg) intraperitoneally once daily from the onset of clinical signs for 17 days with anti-ED1 for macrophage infiltration at 60 dpi. (A, C) EAN and (B, D) chronic-EAN rats. Scale bars: 100 μm. Mean values and SEM are indicated. ****p < 0.0001.

Figure 4: Cross sections of sciatic nerves of EAN and chronic-EAN rats non-treated (A, B) and treated (C, D) with FTY720 (1 mg/kg) intraperitoneally once daily from the onset of clinical signs for 17 days with anti-ED1 for macrophage infiltration at 60 dpi. (A, C) EAN and (B, D) chronic-EAN rats. Scale bars: 100 μm. Mean values and SEM are indicated. ****p < 0.0001.

Figure 5: Cross sections of spinal nerve roots of EAN and chronic-EAN rats treated with FTY720 (1 mg/kg) intraperitoneally once daily from the onset of clinical signs for 17 days with anti-IL-17 for IL-17⁺ cells at 60 dpi. (A, C) EAN and (B, D) chronic-EAN rats. Scale bars: 100 μm. Mean values and SEM are indicated. ****p < 0.0001.

Figure 6: Cross sections of spinal nerve roots of EAN and chronic-EAN rats treated with FTY720 (1 mg/kg) intraperitoneally once daily from the onset of clinical signs for 17 days with anti-ED1 for macrophage infiltration at 60 dpi. (A, C) EAN and (B, D) chronic-EAN rats. Scale bars: 100 μm. Mean values and SEM are indicated. ****p < 0.0001.

Discussion - Conclusion: Here we have shown the effects of FTY720 on chronic-EAN, a new animal model of human CIDP. Our data demonstrate that FTY720 can suppress the chronicity of the disease, inhibit inflammation in PNS and significantly reduce IL-17 levels (pro-inflammatory cytokine) in the serum. Our results are consistent with the possible involvement of IL-17 and IL17⁺ cells in the pathogenesis of chronic-EAN. These data confirm the interest of testing Fingolimod in human CIDP that is currently in progress in the FORCIDP study.

Acknowledgements: We wish to gratefully thank Novartis and AFM (Association Française contre les myopathies) for financial support.

Caractérisation d'un nouveau modèle animal de polyradiculonévrite chronique et développement de stratégies thérapeutiques

Résumé

La polyradiculonévrite inflammatoire démyélinisante chronique (PIDC) est une pathologie neurologique auto-immune du système nerveux périphérique dont la physiopathologie est actuellement mal connue, pour laquelle les options thérapeutiques sont peu nombreuses et dont il n'existe pas de modèle animal fiable. Le premier objectif de ce travail était de valider et de caractériser un modèle animal de PIDC par immunisation de rat Lewis avec le peptide P0(180-199) palmitoylé. Les animaux ont développé une pathologie chronique ou à rechute qui a pu être caractérisée aux plans clinique, histologique, électrophysiologique et immunologique. Les résultats sont en faveur d'un modèle fiable et reproductible mimant bien la PIDC humaine. Le deuxième objectif de ce travail était de tester, sur notre modèle, le fingolimod, modulateur des récepteurs à la sphingosine 1-phosphate, comme potentiel traitement de la pathologie. Le fingolimod a permis, dans notre modèle, de diminuer la sévérité et la chronicité de la maladie, d'améliorer les paramètres électrophysiologiques, de diminuer l'infiltration par les cellules inflammatoire et les anomalies immunologiques.

Mots clés : Polyradiculonévrite inflammatoire démyélinisante chronique, Modèle animal, Stratégies thérapeutiques, Fingolimod, Peptides palmitoylés

Résumé en anglais

Chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy (CIDP) is an autoimmune pathology of the peripheral nervous system whose pathophysiology is currently poorly understood, for which there are few therapeutic options and no reliable animal model. The first aim of this work was to validate and characterize an animal model of CIDP by immunization of rat Lewis with the palmitoylated peptide P0(180-199). The animals developed a chronic or relapsing pathology that could be characterized clinically, histologically, electrophysiologically and immunologically. The results are in favor of a reliable and reproducible model that mimics the human CIDP. The second aim of this work was to test, on our model, the fingolimod, sphingosine 1-phosphate receptor modulator, as potential treatment of the pathology. In our model, fingolimod has reduced the severity and the chronicity of the disease, improved electrophysiological parameters, reduced infiltration by inflammatory cells and relieved immunological abnormalities.

Keywords : Chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy, Animal model, therapeutic options, Fingolimod, Palmitoylated peptides