



HAL
open science

Effet de la mélatonine sur le risque d'ostéoporose, le métabolisme énergétique cérébrale et la remyélinisation dans un modèle expérimental de souris EAE

Linda Scavo

► **To cite this version:**

Linda Scavo. Effet de la mélatonine sur le risque d'ostéoporose, le métabolisme énergétique cérébrale et la remyélinisation dans un modèle expérimental de souris EAE. Endocrinologie et métabolisme. Université Paris-Saclay, 2020. Français. NNT : 2020UPASS108 . tel-02935398

HAL Id: tel-02935398

<https://theses.hal.science/tel-02935398>

Submitted on 10 Sep 2020

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

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

Effet de la mélatonine sur le risque d'ostéoporose, sur le métabolisme énergétique cérébrale et la remyélinisation dans un modèle expérimental de souris EAE

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay
Préparée à l'Université Paris Sud

École doctorale n°582 Cancérologie : Biologie – Médecine - Santé
Spécialité de doctorat : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Thèse présentée et soutenue à Villejuif, le 8 juillet 2020, par

Mme Linda Scavo

Composition du Jury :

François Roman Professeur, Aix-Marseille Université (– CNRS UMR7051)	Président
Yossan-Var Tan Maître de conférences, Université de Rouen (–INSERM UMR1234)	Rapporteur
François Roman Professeur, Aix-Marseille Université (– CNRS UMR7051)	Rapporteur
Thomas Rival Associate Professeur, Aix-Marseille Université (– CNRS)	Examineur
Viviana Marin Estéban Maître de conférences, Université Paris Sud (– INSERM U996)	Examineur
Yacir Benomar Maître de conférences, Université Paris Sud (– INSERM U9197)	Examineur
Damien Arnoult CR1, Université Paris Sud (– INSERM U1197)	Directeur de thèse

Titre : Effet de la mélatonine sur l'ostéoporose, le métabolisme cérébrale et la remyélinisation dans un modèle de souris EAE

Mots clés : Sclérose en plaques, Mélatonine, pyruvate déshydrogénase kinase, complexe de pyruvate déshydrogénase, myéline, vitamine D.

Résumé : La Sclérose en plaques (SEP) est une maladie auto-immune chronique démyélinisante et neurodégénérative du SNC. Elle représente la première cause de handicap non traumatique chez l'adulte jeune et surtout les femmes. Malgré tous les efforts des chercheurs, la cause exacte de la SEP reste inconnue à ce jour. Selon eux, la SEP est considérée une maladie qui survient en présence des facteurs environnementaux combinés à des facteurs génétiques. La thérapie actuelle utilise des médicaments qui suppriment les attaques immunologiques et il n'existe aucun traitement efficace qui arrête les dommages neuro-axonaux ou favorise la remyélinisation. La mélatonine s'est révélée d'être un candidat neuroprotecteur puissant pour réduire la perte de la myéline.

Le but de ce travail est d'examiner la corrélation clinique entre la mélatonine sérique et la proCT chez les patients atteints de SEP et d'évaluer l'effet de la mélatonine sur le risque d'ostéoporose, le métabolisme cérébral et la remyélinisation in vivo. Pour ce faire, différentes techniques de biologie moléculaire et cellulaire ont été utilisées dans le modèle expérimental de souris d'encéphalomyélite auto-immune (EAE). Les résultats obtenus se divisent en trois parties. Dans la **première partie**, Les données ont montré une augmentation significative des taux sériques de proCT chez les patients atteints de SEP, inversement corrélée aux niveaux de mélatonine par rapport aux sujets sains. Dans la **seconde partie**, nous avons démontré que la mélatonine a diminué les scores cliniques moyens, a réduit significativement les taux sériques de proCT et a augmenté le niveau de 25-hydroxyvitamine D, du calcium et de l'OCN chez les souris EAE par rapport au souris EAE témoins. Dans la **troisième partie**, les résultats ont montré que la mélatonine a augmenté le niveau des cytokines anti-inflammatoires l'interleukine-10 (IL-10) et l'interleukine-4 (IL-4))

et a diminué le taux des cytokines pro-inflammatoires (le facteur de nécrose tumorale-alpha (TNF- α) et l'interleukine 1-bêta (IL-1 β)) chez les souris EAE par rapport aux souris EAE témoins. Nous avons aussi démontré que le taux de la glycoprotéine oligodendrocytaire de la myéline (MOG), le taux de la protéine basique de la myéline (MBP) et le taux de la protéine basique oligodendrocytaire associée à la myéline (MOBP) ont été augmentés par celle-ci. De plus, elle a entraîné une augmentation significative des concentrations cérébrales d'acétate, de N-acétylaspartate (NAA) et de 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-Coenzyme-Aréductase(HMGCR). Les niveaux d'expression de l'ARNm et des protéines de pyruvate déshydrogénase kinase-4 (PDK-4) ont également augmenté chez les souris traitées à la mélatonine par rapport aux souris EAE non traitées. Le traitement à la mélatonine a entraîné une augmentation des taux de lactate dans le cerveau, alors que l'activité du complexe de pyruvate déshydrogénase (PDC) actif et total, enzyme sous le contrôle de PDK-4, a été supprimée.

En conclusion, cette étude suggère que ProCT pourrait être un biomarqueur chez les patients atteints de SEP. Les résultats obtenus sur les souris EAE traitées à la mélatonine démontrent son importance sur l'atténuation de la gravité de la maladie et de l'inflammation intracérébrale ainsi que sur l'amélioration du métabolisme osseux qui a pour conséquent de réduire l'ostéoporose. De plus, le traitement curatif avec la melatonine a une dualité fonctionnelle dans le modèle EAE : (1) effets anti-inflammatoires capables de diminuer l'inflammation au niveau du SNC et (2) effets neuroprotecteurs initiés par le maintien du métabolisme énergétique cérébrale qui favorise l'oligodendrogenèse et de ce fait les processus de remyélinisation.

Title : Melatonin effect on osteoporosis, metabolic pathway and remyelination in the brain in the EAE mouse

Keywords : multiple sclerosis, melatonin, pyruvate dehydrogenase kinase, pyruvate dehydrogenase complex, myelin, vitamin D

Abstract: Multiple Sclerosis (MS) is a chronic demyelinating autoimmune and neurodegenerative disease of nervous central system (CNS). MS is the leading cause of non-traumatic disability in young adults, especially women. Despite research effort to elucidate its etiology, the exact cause for MS remains unknown to date. MS can occur in response to environmental and genetic factors or to a combination of both. The current therapy for MS uses medications that suppress the immunological attacks and there is no effective treatment that halts the neuro-axonal damage or promotes remyelination. Melatonin has been shown to be a potent neuroprotective candidate for reducing myelin loss. The aim of this study is to examine the clinical correlation between serum melatonin and proCT in patients with MS and to evaluate the effect of melatonin on osteoporosis, metabolic pathways and the process of re-myelination in the brain in vivo. To that end, different molecular and cellular biology techniques were used on an experimental model of autoimmune encephalomyelitis (EAE). The Results of the study are divided into three parts. In the first part, the data showed a significant increase in serum proCT levels in patients with MS that is inversely correlated with melatonin levels compared to healthy subjects. In the second part, we have demonstrated that melatonin treatment decreased the mean clinical scores, significantly reduced serum levels of proCT levels, and increased the level of 25-hydroxyvitamin D, calcium and OCN in EAE mice compared to control EAE mice. In the third part, the results showed that Melatonin increased the level of increased

the level of anti-inflammatory cytokines (interleukin-10 and interleukin-4) and decreased the level of pro-inflammatory cytokines (tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) and interleukin1-beta (IL-1 β) in EAE mice compared to control mice. We have also demonstrated that the oligodendrocytic myelin glycoprotein (MOG), and the myelin basic protein (MBP) and the oligodendrocytic myelin-associated basic protein (MOBP) levels are also increased. In addition, melatonin caused a significant increase in brain levels of acetate, N-acetylaspartate (NAA), and 3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme-A reductase (HMGCR). Moreover, the expression levels of mRNA and pyruvate dehydrogenase kinase-4 (PDK-4) proteins also increased in mice treated with melatonin compared to untreated EAE mice. Melatonin treatment resulted in an increase in lactate levels in the brain, while the activity of the active and total pyruvate dehydrogenase complex (PDC) was suppressed. In conclusion, this study suggests that ProCT could be a biomarker in MS patients. The results obtained on melatonin-treated EAE mice demonstrate its importance in attenuating the severity of the disease and intracerebral inflammation as well as improving bone metabolism, which consequently reduces osteoporosis. In addition, the curative treatment with melatonin has a functional duality in the EAE model: (1) anti-inflammatory effects capable of reducing inflammation in the CNS and (2) neuroprotective effects initiated by the maintenance of brain energy metabolism which promotes oligodendrogenesis and hence the remyelination processes.

Remerciements

*Presque tous mes travaux ont été réalisés au Plateforme de Recherche et d'Analyse en Sciences de l'Environnement (PRASE), Université Libanaise. Je remercie le **Prof. Fouad Hajj Hasan**, directeur de ce plateforme, pour m'avoir accueillie au sein de ce laboratoire et pour sa sympathie. Vous m'avez permis de développer les compétences et d'acquérir les connaissances que je possède aujourd'hui.*

*Je remercie vivement mon directeur, **Dr. Damien Arnoult**, pour son encadrement, son aide à me faire entrer dans le monde de la recherche, univers qui m'attirait depuis ma plus tendre enfance et à réaliser le rêve de 14 ans.*

Je remercie vivement les membres du jury de me faire l'honneur d'accorder leur attention à ce travail.

*Je remercie immensément ma **Mère**, pour son amour inlassable et pour sa prière jour et nuit pour nous tous*

*Je remercie chaleureusement ma soeur **Myriam** et son mari **Moiffac** pour leur aide et leur soutien, pour tous les bons moments passés ensemble en France. Je les aime fort.*

*Je remercie aussi mes soeur **Rima** et **Lina** pour tous ce qu'elles ont fait pour parvenir à mon but.*

*Je remercie également mon frère **Fadi** pour son aide précieuse en espérant que cette thèse puisse être à la hauteur de tout ce qu'il a fait pour moi.*

*Je remercie ma petite fille **Carine**, pour sa compréhension et pour son aide précieuse à illustrer la plupart des figures de cette thèse, j'admire beaucoup son intelligence. Je l'aime tant*

*Et finalement, cette thèse n'aurait pu voir le jour sans le support de mon extraordinaire mari **Kassem**. Merci de m'avoir accompagnée dans cette aventure, ça n'a pas été facile. Merci d'être resté à mes côtés dans les moments les plus difficiles, pour ton écoute, tes encouragements. Je te dois beaucoup, il n'existe pas de mots assez forts pour exprimer toute la gratitude et l'amour que je te porte. Grâce à ton amour, à ta confiance en moi, j'écris aujourd'hui ces lignes. Je te dédie cette thèse.*

Liste des publications

Publications et manuscrits inclus dans la Thèse

Publication N°1,

Linda Scavo, Majid Ghareghani, Damien Arnoult, Kazem Zibara and Naser Farhadi (2017).

“Melatonin therapy reduces the risk of osteoporosis and normalizes bone formation in multiple sclerosis”.

Fundamental and clinical pharmacology, **publié, sous presse.**

Publication N°2,

Linda Scavo, Majid Ghareghani, Yahya Jand, Naser Farhadi, Hossein Sadeghi, Amir Ghanbari, Stefania Mondello, Damien Arnoult, Sajjad Gharaghani and Kazem Zibara (2019).

“Melatonin Therapy Modulates Cerebral Metabolism and Enhances Remyelination by increasing PDK4 in a Mouse Model of Multiple Sclerosis”.

Frontiers in Pharmacology, **publié, sous presse.**

Sommaire

REMERCIEMENTS.....	3
LISTE DES PUBLICATIONS	4
SOMMAIRE.....	5
ABBRÉVIATION	8
FIGURES.....	12
TABLEAUX	14
I INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE	15
CHAPITRE 1 : LE SYSTÈME NERVEUX	16
1.1. LES NEURONES.....	17
1.2. LES CELLULES GLIALES OU NÉVROGLIES	17
1.2.1 Les astrocytes	17
1.2.2 Les oligodendrocytes	18
1.2.3 La microglie	18
1.3. ORGANISATION ANATOMIQUE DU CERVEAU	20
CHAPITRE 2 : LA SCLÉROSE EN PLAQUES	21
2.1 Historique	22
2.2 Définition	22
2.3 Poussée et progression.....	23
2.4 Échelle EDSS.....	24
2.5 Les modes évolutifs de la SEP.....	25
2.5.1 Forme récurrente–rémittente (SEP-RR).....	25
2.5.2 Forme progressive secondaire (SEP-SP).....	25
2.5.3 Forme progressive primaire (SEP-PP).....	25
2.6 Données épidémiologiques	26
2.7 Étiologie	27
2.7.1 Les facteurs génétiques	28
2.7.2 Les facteurs environnementaux.....	31
2.7.2.1 La répartition géographique.....	31
2.7.2.2 Vitamine D et ensoleillement	33
2.7.2.3 Les facteurs infectieux.....	37
i. Les virus.....	37
ii. Les parasites.....	40
2.7.2.4 Le tabac	40
2.8 Anatomopathologie	41
2.8.1 Les plaques démyélinisantes	41
2.8.2 Les quatre profils de démyélinisation	42
2.9 Diagnostic	44
2.9.1 Diagnostic clinique	44
2.9.2 L'imagerie par résonance magnétique (IRM).....	44
2.9.3 Analyse biologique du liquide céphalo-rachidien	45
2.9.4 Potentiels évoqués	46
2.10 Signes cliniques.....	46
2.11 Traitement	47
2.11.1 Traitement par des cellules souches.....	48
2.12 Physiopathologie de la SEP	51
2.12.1 La gaine de myéline	51
2.12.2 Processus de myélinisation.....	53
2.12.3 Mécanisme de la démyélinisation	54
2.12.3.1 Activation des cellules immunitaires	56
2.12.3.2 Transmigration des cellules immunitaires vers le SNC	59
2.12.3.3 Mécanismes des lésions du tissu neural.....	60
2.12.4 Remyélinisation	61
2.12.4.1 La redistribution des canaux sodiques	62

2.12.4.2	La remyélinisation spontanée.....	62
CHAPITRE 3 : LES MODÈLES SCIENTIFIQUES	64	
3.1	MODÈLES IN VITRO	65
3.1.1	<i>Culture des microglies</i>	65
3.1.2	<i>Culture des neurones.....</i>	65
3.1.3	<i>Culture des ODs.....</i>	66
3.1.4	<i>Culture des astrocytes</i>	67
3.2	MODÈLES IN VIVO	67
3.2.1	<i>Encéphalomyélite Auto-immune Expérimentale (EAE).....</i>	67
3.2.1.1	Modèles primates	69
3.2.1.2	Modèle de rat Lewis	69
3.2.1.3	Modèles de souris.....	70
i	Modèle de souris SJL/J.....	70
ii	Souris transgéniques.....	71
iii	Modèle de souris C57BL/6.....	72
3.2.2	<i>Modèle de démyélinisation induite par la cuprizone.....</i>	72
3.2.3	<i>Modèle de démyélinisation induite par le virus de l'encéphalomyélite murine de Theiler (TMEV) .</i>	74
3.3	SIGNES ET SCORES CLINIQUES DE LA MALADIE.....	78
CHAPITRE 4 : LA MÉLATONINE	79	
4.1	BIOSYNTHÈSE DE LA MÉLATONINE	80
4.2	PHARMACOCINÉTIQUE ET CATABOLISME DE LA MÉLATONINE	82
4.3	RÉCEPTEURS DE LA MÉLATONINE	83
4.4	PHYSIOLOGIE DE LA MÉLATONINE.....	84
4.5	MÉLATONINE ET SEP	85
CHAPITRE 5: LE MÉTABOLISME CELLULAIRE.....	87	
5.1	PDK ET PDC.....	88
5.2	LE N-ACÉTYLE ASPARTATE OU NAA	89
5.3	VOIE MÉTABOLIQUE PDC-DÉPENDANT	90
5.4	B-OXYDATION PEROXYDOMALE	91
5.5	LES MITOCHONDRIES ET LEUR RÔLE DANS LA NEURODÉGÉNÉRESCENCE DE LA SEP.....	92
5.2.1	<i>Les mitochondries.....</i>	92
5.2.2	<i>Mécanisme de dysfonctionnement mitochondrial perpétuant la lésion du SNC dans la SEP.....</i>	94
BUT DU TRAVAIL.....	96	
II MATÉRIELS ET MÉTHODES	98	
II.1	DÉCLARATION ÉTHIQUE	99
II.2	PLAN D'ÉTUDE ET PARTICIPANTS	99
II.3	QUANTIFICATION DES HORMONES SÉRIQUES PAR LE TEST ELISA	99
II.4	MODÈLE ANIMAL IN VIVO.....	99
II.4.1	<i>Animaux Expérimentaux.....</i>	99
II.4.2	<i>Induction de l'EAE.....</i>	100
II.4.3	<i>Évaluation clinique des souris EAE.....</i>	100
II.4.4	<i>Traitement des animaux.....</i>	100
II.4.5	<i>Préparation de l'échantillon</i>	101
II.4.6	<i>Quantification des cytokines par dosage immuno enzymatique (ELISA).....</i>	101
II.5	WESTERN BLOTTING	101
II.6	PCR EN TEMPS RÉEL	102
II.7	ÉVALUATION DU LACTATE CÉRÉBRAL ET DU N-ACÉTYLASPARTATE (NAA) PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE À HAUTE PERFORMANCE (HPLC)	102
II.8	DÉTERMINATION DE L'ACTIVITÉ PDC.....	103
II.9	ANALYSE STATISTIQUE	103
III RÉSULTATS.....	104	
PUBLICATION N°1	105	
INTRODUCTION 1	106	
DISCUSSION 1.....	114	

PUBLICATION N°2.....	117
INTRODUCTION 2	118
DISCUSSION 2	132
DISCUSSION GÉNÉRALE	136
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	142
RÉFÉRENCES	144

Abbréviation

AA	Acide Arachidonique
ACm	Anticorps Monoclonal
BCR	Barrière Céphalo-Rachidien
BHE	Barrière Hémato-Encéphalique
CFA	Complet Freund Adjuvant
CIS	Syndrome Clinique Isolé
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CPA	Cellule Présentatrice d'Antigène
CPO	Cellule Précurseur Oligodendrocytaire
DA	Dark Agouti
DC	Cellule Dendritique
DPB	Protéine de liaison à la Vitamine D
EAE	Encéphalite Auto-immune Expérimentale
EBV	Epstein-Barr Virus
FGF	Facteur de croissance fibroblastique
FDA	Food and Drug Administration
FLAIR	Fluide Attenuation Inversion Recovery
GWAS	Genome Wide Association Study
HIOMT	Hydroxy-Indole-O-Methyl Transferase
HGF	Hepatocyte Growth Factor
HERV	Human Endogenous RetroVirus
HHV6	Human Herpes Virus 6
HLA	Human Leucocyte Antigen

IC	IntraCephalo-ventriculaire
IFA	Incomplet Freund Adjuvant
IV	IntraVeineuse
ICAM	Intercellular Adhesion Molecule
IFN-γ	Interférons-gamma
IGF-1	Insulin Growth Factor type 1
IgG	Immunoglobulines de type G
IL	Interleukine
IL-7RA	chaîne alpha du récepteur à l'IL-7
IL-2RA	chaîne alpha du récepteur à l'IL-2
IRM	Imagerie par Résonance Magnétique
LB	Lymphocyte B
LCR	Liquide Céphalo-Rachidien
LFA-1	Leucocyte Function Associated Antigen-1
LT	Lymphocyte T
LT reg	Lymphocyte T régulateur
LTreg FOXP3	Lymphocyte T régulateur de type forkhead box P3
LTh	Lymphocyte T helper
MAG	Myelin Associated Glycoprotein
MBP	Myelin Basic Protein
MMP	Matrix Métallopeptidase
MO	Moelle Osseuse
MOBP	Myelin-associated Oligodendrocyte Basic Protein
MOG	Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein
NAS	N-acetyl Serotonin

NO	Monoxyde d'Azote
OD	Oligodendrocyte
OLS	Organe Lymphoide Secondaire
PAMP	Pathogen associated molecular patterns
PCR	Polymerase chain reaction
PDGF	Platelet-derived Growth Factor
PE	Potentiels Évoqués
PLP	Proteolipid Protein
ROR-α	Recepteur Retinoid Orphelin de type Alpha
ROS	Reactive Oxygen Species
SB	Substance Blanche
SEP	Sclérose En Plaques
SEP-RR	Sclérose En Plaques Récurrente Rémittente
SEP-SP	Sclérose En Plaques Secondairement Progressive
SEP-PP	Sclérose En Plaques Progressive Primaire
SG	Substance Grise
SN	Système Nerveux
SNC	Système Nerveux Central
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SNPer	Système Nerveux Périphérique
Tc	Cellule T Cytotoxique
TCR	Récepteur des Cellules T
TGF-β	Transforming Growth Factor beta
TLR	Toll-Like Receptor
TNF	Facteur de Nécrose Tumorale

VCAM	Vascular Cell Adhesion Molecule
VDR	Récepteur nucléaire à la vitamine D
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VLA-4	Very late activation antigen-4

Figures

Figure 1	Anatomie du SN
Figure 2	La microglie et ses fonctions
Figure 3	Représentation des différents lobes du cerveau
Figure 4	La SEP est une maladie auto-immune
Figure 5	Représentation schématique de l'échelle EDSS
Figure 6	Profils évolutif de la SEP
Figure 7	Prévalence de la SEP dans le monde
Figure 8	Risque de développer la SEP suivant le degré de parenté avec un individu atteint
Figure 9	Cartographie génétique du CMH
Figure 10	Locus 6p21–6p23 et SEP
Figure 11	Répartition géographique de la SEP dans le monde
Figure 12	Prévalence de la SEP et migration
Figure 13	Cycle de la vitamine D3
Figure 14	Les mécanismes de l'immunomodulation du vit D3
Figure 15	Rôle essentiel de l'EBV dans la pathogénèse de la SEP
Figure 16	Modèle représentant l'activation immunitaire périphérique et la neuroinflammation induite par l'HERV-W
Figure 17	Résumé du mécanisme pathogénique de la formation des lésions activement démyélinisantes
Figure 18	Lésions sous deux formes T1, T2
Figure 19	Thérapies établies et émergentes contre la SEP
Figure 20	Mécanisme thérapeutique des CSM dans la SEP
Figure 21	Les composants de la myéline du SNC

- Figure 22** Stade séquentiels de la maturation des oligodendrocytes et les marqueurs spécifiques pour la différenciation de chaque lignée
- Figure 23** Développement, migration et rôle des LB dans la SEP
- Figure 24** Différenciation des LT CD4+ naïf en LT helper
- Figure 25** Passage des LT activés à travers la BHE
- Figure 26** Mécanisme lésionnel du tissu neuronal
- Figure 27** Changement dynamique de la myélinisation axonale au cours de la progression de la SEP
- Figure 28** Représentation schématique des modèles de démyélinisation induite par le cuprizone
- Figure 29** Aperçu schématique de la démyélinisation induite par le virus
- Figure 30** Structure de la mélatonine
- Figure 31** Voies biosynthétique de la mélatonine et les enzymes impliquées
- Figure 32** Différentes voies métaboliques de la mélatonine
- Figure 33** Effet de la mélatonine dans la SEP
- Figure 34** Représentation schématique de la régulation du métabolisme du glucose par le PDC et le PDK
- Figure 35** Représentation schématique du métabolisme du glucose au niveau des ODs au cours de la remyélinisation
- Figure 36** Rôle des Mitochondries dans le processus de neurodégénérescence

Tableaux

Tableau 1 Caractéristiques des différents modèles in vivo dans la SEP

Tableau 2 Scores cliniques

I Introduction
Bibliographique

Chapitre 1 : *Le Système Nerveux*

Le système nerveux (SN) est un système biologique animal responsable de la coordination des actions avec l'environnement extérieur et de la communication rapide entre les différentes parties du corps. Chez tous les vertébrés, on distingue le système nerveux central (SNC) du système nerveux périphérique (SNPer). Le SNC comprend l'encéphale (cerveau, cervelet et tronc cérébral) et la moelle épinière. La dissection du SNC montre deux parties différentes : la substance blanche (SB) et la substance grise (SG). Quant au SNPer comprend les nerfs rachidiens et crâniens (**Figure 1A**). À l'échelle cellulaire, le SN est défini par la présence de cellules hautement spécialisées appelées neurones. En outre, le SN contient des cellules de support appelées cellules gliales ou névroglies qui apportent un soutien structurel et fonctionnel aux neurones. L'espace persistant entre ces cellules est appelé matrice extracellulaire

1.1. Les neurones

Le neurone représente l'unité fonctionnelle du SN. Un neurone est formé d'un corps cellulaire ou péricaryon et de deux types de prolongements: les dendrites et l'axone unique qui peut être nu ou recouvert d'une gaine de myéline. Le rôle d'une cellule nerveuse est de permettre la réception ainsi que l'intégration et la transmission des informations. Elles assurent la transmission du message nerveux. [1].

1.2. Les cellules gliales ou névroglies

Les cellules gliales ou névroglies jouent un rôle majeur dans le métabolisme cérébral, car elles contrôlent la composition chimique du fluide qui entoure les neurones, y compris les niveaux d'ions et de nutriments. Elles renferment les astrocytes, les oligodendrocytes (OD) et les microglies. Chaque type cellulaire a une fonction qui lui est unique. Les métabolismes des neurones et des cellules gliales sont interdépendants, et ces cellules fonctionnent de manière intégrée (**Figure 1B**).

1.2.1 Les astrocytes

Les astrocytes ont la forme étoilée. Ils sont beaucoup plus complexes et ont beaucoup plus de fonctions dans le SN que personne ne l'aurait soupçonné il y a quelques décennies. Avec les vaisseaux sanguins, ils forment un cadre qui soutient, nourrit et protège les neurones et les ODs, ils participent au maintien de la barrière hémato-encéphalique (BHE), régulent le flux sanguin,

maintiennent un environnement extracellulaire optimal au fonctionnement de celles-ci [1]. Ils nettoient les débris cellulaires par phagocytose au cours de la mort cellulaire apoptotique développementale, du vieillissement normal, du remodelage des processus neuronaux, pendant la récupération après une blessure, et dans les processus pathologiques [2]. Ils ont des systèmes d'assimilation à haute affinité pour la plupart des neurotransmetteurs et peuvent absorber et métaboliser un certain nombre de transmetteurs incluant le glutamate, l'acide β -amino-butérique, la glycine, la taurine, l'alanine, les catécholamines et la sérotonine [3]. Les astrocytes sont des acteurs centraux du couplage neuro-métabolique et subissent des adaptations plastiques en parallèle avec des mécanismes adaptatifs qui caractérisent la plasticité synaptique [4, 5]. Aussi, ils sont capables de sécréter l'interleukine-1 (IL-1). La combinaison des antigènes d'IL-1 et d'histocompatibilité (CMH) permet aux astrocytes de fonctionner comme des cellules présentatrices d'antigène (CPA) [6]. Des fonctions supplémentaires sont susceptibles d'apparaître à mesure que la recherche se poursuit (**Figure 1B, C**).

1.2.2 Les oligodendrocytes

Les ODs sont des cellules spécialisées qui isolent l'axone en enroulant plusieurs fois un segment de leur membrane plasmique autour des axones pour former une structure nommée une gaine de myéline. Une cellule sous-exprimée mais étonnamment commune (environ 5% de toutes les cellules du SNC) est la cellule précurseur des oligodendrocytes (CPO) qui exprime le protéoglycane NG2 [7]. Les CPOs peuvent se différencier en ODs et sont présentes même tard dans la vie [8]. Ainsi, la différenciation des CPOs est une stratégie visant à améliorer la remyélinisation endogène, mais une telle stratégie doit être mise en balance avec le potentiel des CPOs à répondre aux cytokines et de participer ainsi elles-mêmes à l'inflammation [9, 10]. De plus, les ODs peuvent devenir dysfonctionnels même sans mourir, causant des dommages aux tissus par la perte du support trophique aux axones (**Figure 1B**).

1.2.3 La microglie

La microglie joue un rôle dans la défense immunitaire active du SNC. Elle partage les mêmes caractéristiques que les macrophages: la phagocytose, la présentation d'antigènes et la modulation de la réponse immunitaire via la production de cytokines [11]. Ces fonctions sont essentielles au maintien de l'homéostasie, à la réparation cellulaire et à la protection contre les pathogènes. Les microglies jouent un double rôle, parfois en favorisant l'inflammation en sécrétant

des cytokines pro-inflammatoires comme IL-6, TNF- α , CCL2, ROS, NO, IL-1 β , IL-12, CXCL10. Dans d'autres circonstances, elles favorisent la réparation par l'élimination des débris de la myéline et la protection des neurones en sécrétant des chimokines et des cytokines anti-inflammatoires comme IL-10, IL-4 et TGF- β [12] (**Figure 1B,2**).

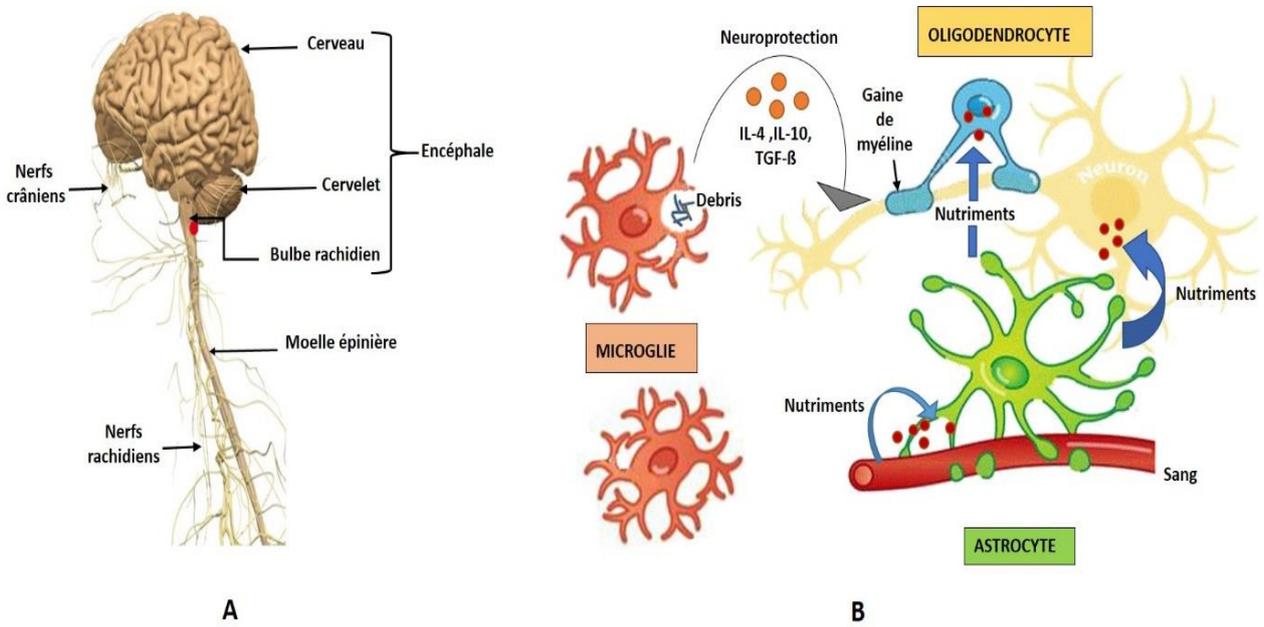


Figure 1 : Anatomie du SN. A: Organisation du SNC. B: Rôle de chaque cellule gliale dans le SNC. Les astrocytes absorbent les nutriments du sang et les fournit aux cellules, Les ODs forment la myéline qui recouvre les neurones, la microglie secrète IL-4, IL-10, TGF- β qui protège le neurone.

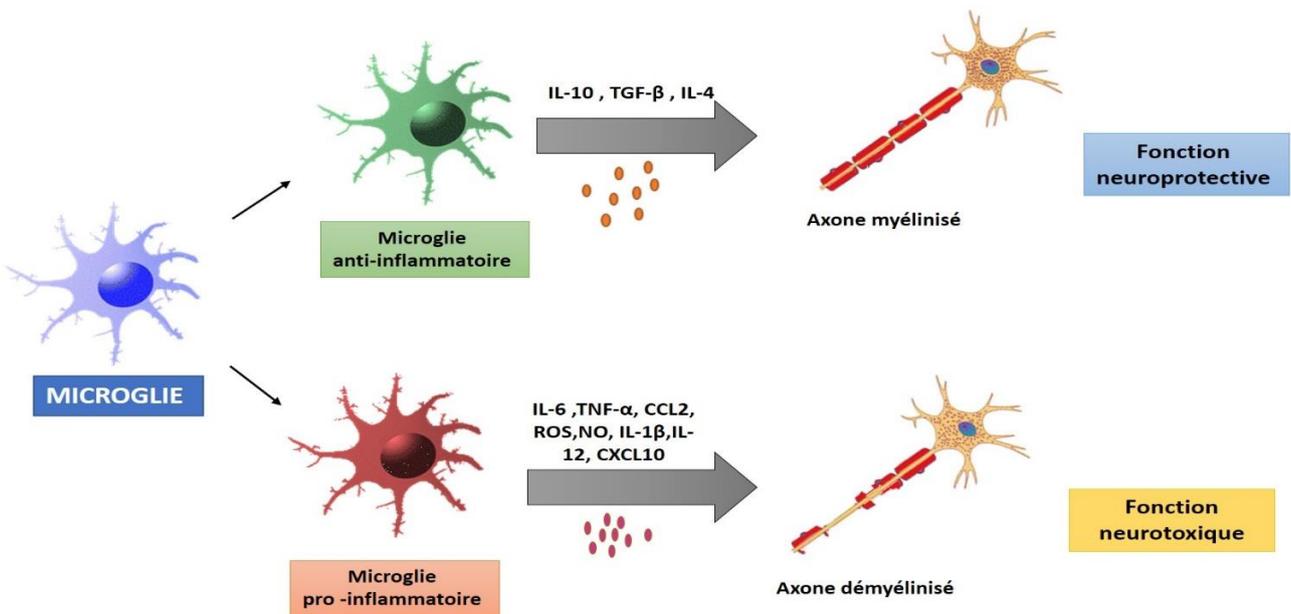


Figure 2: La microglie et ses fonctions. La microglie joue un double rôle dans le SNC. Lorsqu'elle sécrète IL-10, TGF- β , IL-4, sa fonction est neuroprotecteur, tandis que lorsqu'elle sécrète IL-6, TNF- α , CCL2, ROS, NO, IL-1 β , IL-12, sa fonction est neurotoxique.

CXCL-10, sa fonction est neurotoxique.

1.3. Organisation anatomique du cerveau

Le cerveau est constitué de deux hémisphères gauche et droite, un cerveau moyen appelé le diencephale qui réunit les deux hémisphères, et le corps calleux. Chaque hémisphère est subdivisé par des scissures délimitant plusieurs lobes qui sont creusés par des sillons qui forment des plis (**Figure 3**). À l'intérieur du cerveau proprement dit, on remarque la présence de cavités qu'on appelle les ventricules. Celles-ci sont remplies du LCR qui nourrit et protège le cerveau. On trouve quatre ventricules: deux ventricules cérébraux latéraux —un dans chaque hémisphère —, un troisième ventricule correspondant au diencephale, et un quatrième situé entre le tronc cérébral et le cervelet. Enfin, l'encéphale est recouvert par les méninges, qui sont des membranes protectrices.

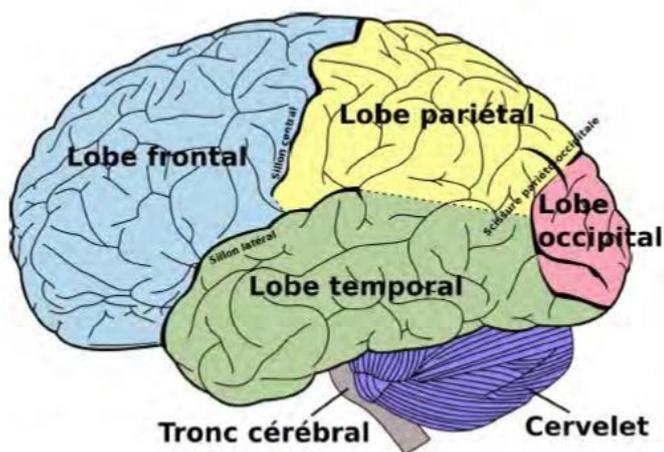


Figure 3 : Représentation des différents lobes du cerveau

Chapitre 2 : La Sclérose En Plaques

La sclérose en plaques ou SEP est une maladie inflammatoire, démyélinisante et neurodégénérative du SNC [13]. Elle représente la première cause de handicap non traumatique chez les jeunes adultes, elle vient juste après les accidents. Dans la plupart du temps, les personnes touchées sont entre 20 ans et 40 ans [14, 15]. Une particularité de la SEP est de toucher davantage les femmes deux à trois fois plus que les hommes. En France, elle affecte plus de 90 000 personnes, 350 000 en Europe et 2 millions et demie dans le monde [14].

2.1 Historique

En 1824, les premiers patients ont été diagnostiqués avec des symptômes qui caractériseraient de façon définitive la SEP. Ces diagnostics sont apparus dans le journal d'Auguste D'Estée, qui comprenait également un compte rendu personnel de ses propres expériences avec ce que l'on appelle maintenant la névrite optique et la SEP récurrente-rémittente (SEP-RR) [16]. Malgré ces observations cliniques, la SEP ne reçut pas de nom avant 1868, lorsque le médecin français Jean-Martin Charcot l'appela «Sclérose en plaques». Charcot est reconnu comme le premier scientifique à lier les symptômes de la SEP à la démyélinisation et aux lésions dans les tissus du système nerveux central et à proposer des critères pour diagnostiquer cette nouvelle pathologie et à les consigner dans un ouvrage intitulé «histologie de la sclérose en plaques» [17]. Bien qu'il n'ait diagnostiqué qu'une trentaine de cas pendant sa carrière, l'intérêt de Charcot pour cette pathologie l'a amené à proposer les bases histopathologiques de cette affection qui demeurent toujours valides jusqu'aujourd'hui. En 1933, *Rivers et al* ont décrit l'un des premiers modèles expérimentaux, l'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE), pour la démyélinisation inflammatoire aiguë [18]. L'EAE a été largement utilisée comme modèle de SEP pour la recherche immunologique, immunothérapeutique et immunogénétique.

2.2 Définition

La SEP est une maladie auto-immune chronique où le système immunitaire s'attaque à lui-même et plus particulièrement le SNC. Elle se caractérise par des réactions inflammatoires qui entraînent la destruction de la myéline conduisant à une démyélinisation des axones. Cette démyélinisation va être dans un second temps responsable d'une atteinte axonale à des degrés divers dans le SNC aboutissant à des difficultés de conduction de l'influx nerveux (IN) expliquant ainsi les symptômes de la maladie qui varient considérablement selon l'emplacement et la taille des lésions dans le cerveau et la moelle épinière de la personne et plus tard à un handicap irréversible [19] **(Figure 4A,B).**

Comme l'indique le nom de la maladie, les individus atteints présentent un tissu durci (sclérotique) dans de nombreuses parties (multiples) du cerveau et de la moelle épinière. Le terme plaques est employé car les parties du SN touchées par la maladie ressemblent à des plaques que l'on peut visualiser lors d'une imagerie par résonance magnétique (IRM) [20].

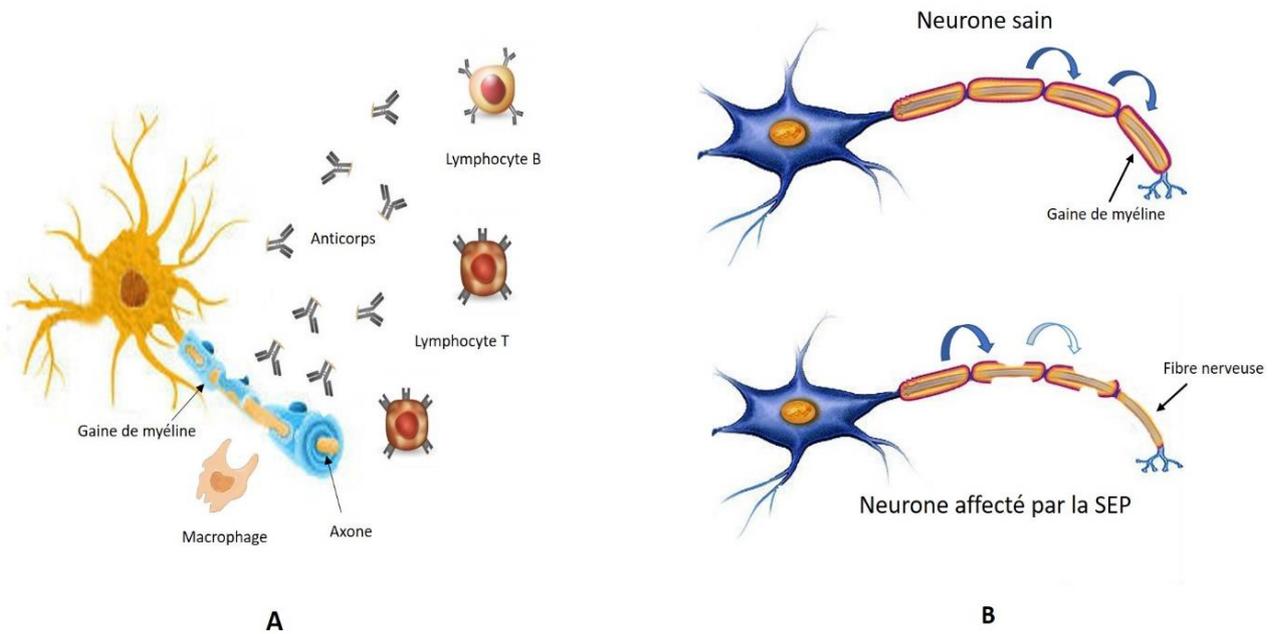


Figure 4: La SEP est une maladie auto-immune. A: Le système immunitaire attaque la myéline. B : Le neurone sain transmet l'IN, tandis que le neurone affecté par la SEP ne transmet pas l'IN.

2.3 Poussée et progression

Une poussée est définie comme une période de survenue de nouveaux signes neurologiques ou de réapparition d'anciens symptômes durant au moins 24h, plusieurs jours ou semaines puis disparaissent complètement ou partiellement, et elle est séparée de la poussée précédente d'au moins 1 mois [21]. Il faut au moins deux lésions distinctes dans le SNC pour qu'on puisse parler de la SEP. On parle alors de dissémination lésionnelle dans le temps et dans l'espace. La SEP se révèle par une poussée dans environ 85% des cas. Lors d'une poussée, de nouveaux symptômes peuvent apparaître, mais également réapparaître d'anciennes manifestations, des symptômes présents peuvent également s'aggraver. Cependant, il est impossible de prévoir le moment, l'intensité ou la durée d'une poussée [21]. En dehors des poussées, l'inflammation disparaît et la myéline se reforme en partie autour des fibres, ce qui entraîne une restauration de la conduction nerveuse plus ou moins complète et donc une régression des signes cliniques (poussée sans séquelle) ou partielle laissant des symptômes permanent c'est-à-dire qu'il n'existe pas de retour à l'état neurologique normal (poussée

avec séquelles) [22]. Quant à la progression, elle correspond à une aggravation continue des signes cliniques neurologiques du patient, indépendamment des poussées, sur une période d'au moins 6 mois voire 12 mois. Il s'agit d'une accumulation progressive du handicap. Elle est une source majeure de handicap chez les patients atteints de SEP.

2.4 Échelle EDSS

L'EDSS (*Expanded Disability Status Scale*) a l'intention de capturer l'incapacité des patients atteints de SEP sur la base d'un examen neurologique en décrivant les symptômes et les signes dans huit systèmes fonctionnels (SF). En outre, il englobe la fonction ambulatoire et la capacité à effectuer les activités de la vie quotidienne (AVQ). Un score global peut être donné sur une échelle ordinale allant de 0 (examen neurologique normal) à 10 (décès dû à la SEP).

Les scores de 0 à 4.0 sont déterminés en tenant compte des déficiences fournies par l'examen clinique. Les scores de 4,0 à 7 caractérisée par une limitation à divers degrés de la marche. Les scores de 7 à 10 au cours duquel la marche est devenue impossible. Une représentation schématique de l'EDSS est donnée à la **Figure 5**.

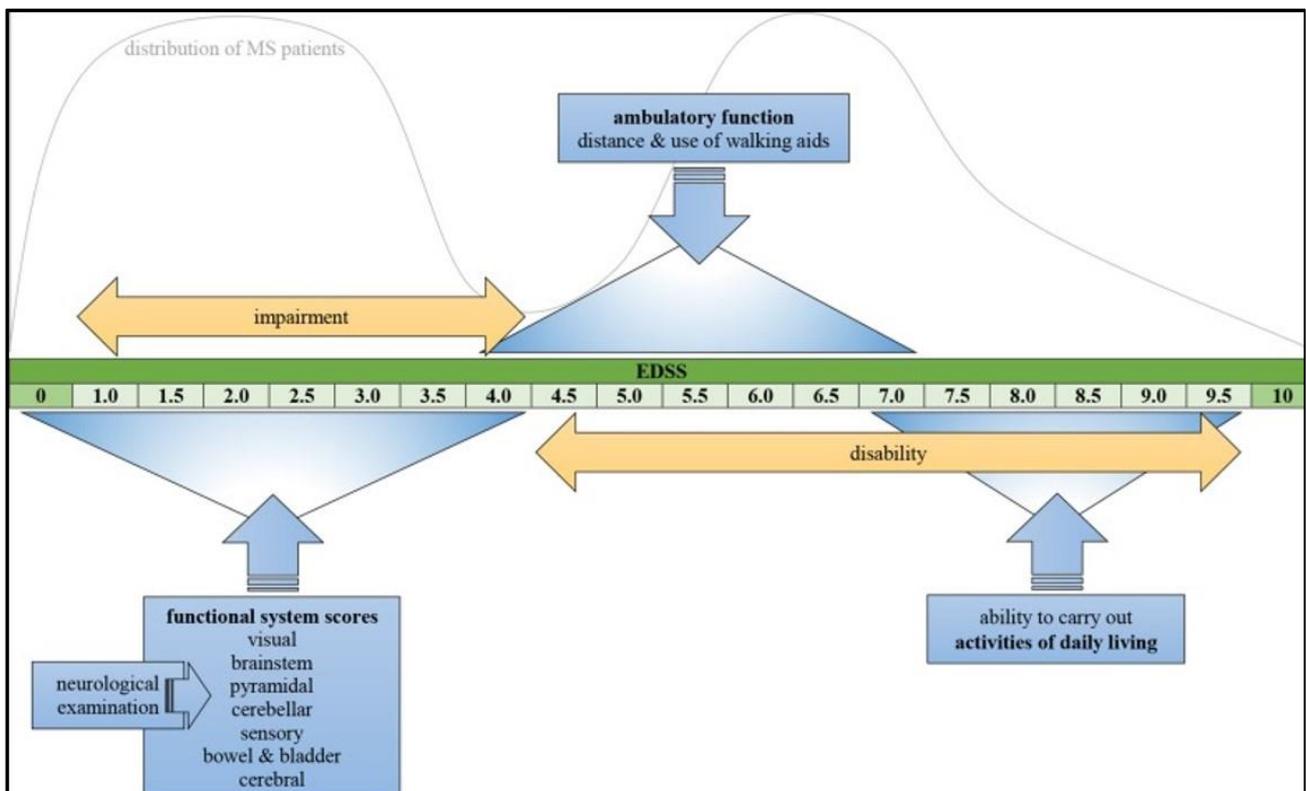


Figure 5 : Représentation schématique de l'échelle EDSS décrivant les facteurs qui déterminent le score global; le graphique montre la répartition des patients sur l'EDSS [23] MS : Multiple Sclerosis (sclérose en plaques)

2.5 Les modes évolutifs de la SEP.

En général, on distingue trois formes principales de la SEP, selon la façon dont la maladie évolue dans le temps:

2.5.1 Forme récurrente–rémittente (SEP-RR).

Dans 85% à 90% des cas, la maladie débute par cette forme, elle est caractérisée par des poussées suivies d'une rémission complète ou partielle. Il s'agit de la forme la plus souvent diagnostiquée. Dans la majorité des cas, au bout de plusieurs années, la perte axonale dépasse le mécanisme de remyélinisation spontanée, cette forme de la maladie peut évoluer vers une forme secondairement progressive [24] (**Figure 6A**).

2.5.2 Forme progressive secondaire (SEP-SP).

Après une forme rémittente initiale, la maladie peut s'aggraver de façon continue s'installant de manière irréversible. On parle alors de forme secondairement progressive. L'examen anatomo-pathologique, à ce stade, montre une atrophie cérébrale (diminution du volume du parenchyme cérébral) et une perte axonale qui est la cause essentielle du handicap neurologique irréversible[24]. La régression au moment des périodes de rémission est de plus en plus incomplète, le nombre de poussées et de rémissions diminuent parallèlement au handicap qui persiste davantage tout en augmentant d'intensité. La plupart des personnes souffrant de la forme rémittente présenteront une forme progressive dans les 15 ans qui suivent le diagnostic de la maladie [25] (**Figure 6B**).

2.5.3 Forme progressive primaire (SEP-PP).

Cette forme se caractérise par une évolution lente et constante de la maladie sans poussées ni remissions dès le diagnostic contrairement à la forme SEP-RR. Cette forme est plus grave et plus rare, elle concerne 10% des cas et apparaît généralement plus tard dans la vie, vers l'âge de 40 ans. Les symptômes apparaissent graduellement et le handicap augmente rapidement et devient permanent car il n'existe ni poussée ni rémission. La progression est alors irréversible [24]. Sur le plan anatomo-pathologique, cette forme se caractérise par la mort des ODs [20] (**Figure 6C**).

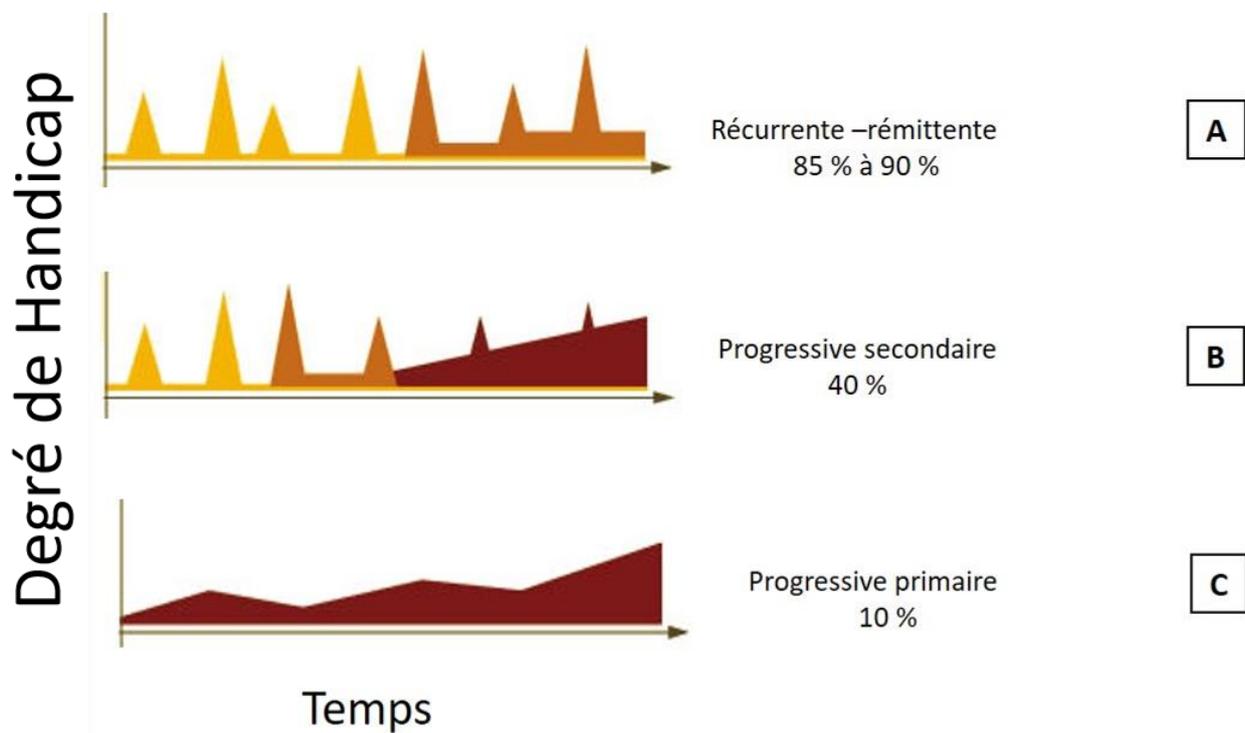


Figure 6 : Profils évolutifs de la SEP A: La forme RR caractérisée par des poussées de symptômes suivies d’une rémission complète ou partielle. B: La forme SP présente une aggravation graduelle de l’état du patient et font suite aux formes rémittentes. C: Les formes primitives progressives présentent une augmentation ininterrompue de séquelles progressive primaire se caractérise par une évolution lente et constante de la maladie, dès le diagnostic. D’après [26]

2.6 Données épidémiologiques

La SEP est la maladie démyélinisante la plus fréquente, elle représente la première cause de handicap sévère non traumatique chez les jeunes adultes en raison d’une déficience neurologique acquise, elle vient juste après les accidents [15]. Elle touche environ 2.5 millions de personnes dans le monde [14]. Bien que la SEP puisse survenir à tout âge, les manifestations initiales sont le plus souvent évidentes au début de l’âge adulte, généralement entre 20 et 40 ans [15]. Une particularité de la SEP est de toucher davantage les femmes deux à trois fois plus que les hommes [14]. Sa répartition dans le monde n’est pas uniforme. Selon le dernier «Atlas MS», produit par «l’International Foundation of Multiple Sclerosis» en 2013, la prévalence de la SEP varie considérablement, passant de niveaux élevés en Amérique du nord et en Europe (respectivement 140 et 108 cas par 100 000 habitants) au niveaux bas en Asie orientale et en Afrique subsaharienne (respectivement 2,2 et 2,1 cas par 100 000 habitants). Grossièrement, celle-ci est faible à l’équateur et augmente vers les pôles. Le nombre estimé de personnes atteintes de la SEP a augmenté depuis

2008, en allant de 1.8 millions à 2.5 millions en 2013. La prévalence médiane globale utilisée a augmenté en 2013 de 30 à 33 pour 100 000 habitants [14]. Le Canada détient la prévalence de la SEP la plus élevée au monde avec 291 cas par 100 000 habitants [27]. La France est située au milieu de l'Europe occidentale entre des zones de forte prévalence de la SEP (telles que les pays scandinaves et le Royaume-Uni) et des zones de faible prévalence de la SEP (Italie, Grèce, Espagne), la prévalence est estimée à 60 pour 100 000 habitants avec 2500 à 3000 nouveaux cas répertoriés chaque année [28]. Au Liban, les institutions de sécurité et des forces armées sont les seules sources d'information de la SEP. Ces sources portent principalement sur le nombre de patients atteints de sclérose en plaques traités, dont la plupart sont traités par interférons. Une étude publiée en 2008 a estimé le nombre de patients atteints de SEP entre 1200 et 1700, mais il ne s'agit que d'une approximation. Dans le même article, les auteurs ont décrit les caractéristiques de 202 patients répondant aux critères de McDonald [29]. Les données rapportées dans ce document sont discutables. Il est nécessaire d'établir un registre national incluant tous les patients atteints de SEP afin de définir avec précision l'incidence et la prévalence de la maladie au Liban. Toutes ces données épidémiologiques descriptives et analytiques mèneront à une meilleure compréhension des facteurs de risque de SEP et pourraient même avoir des répercussions sur les stratégies thérapeutiques (**Figure 7**).

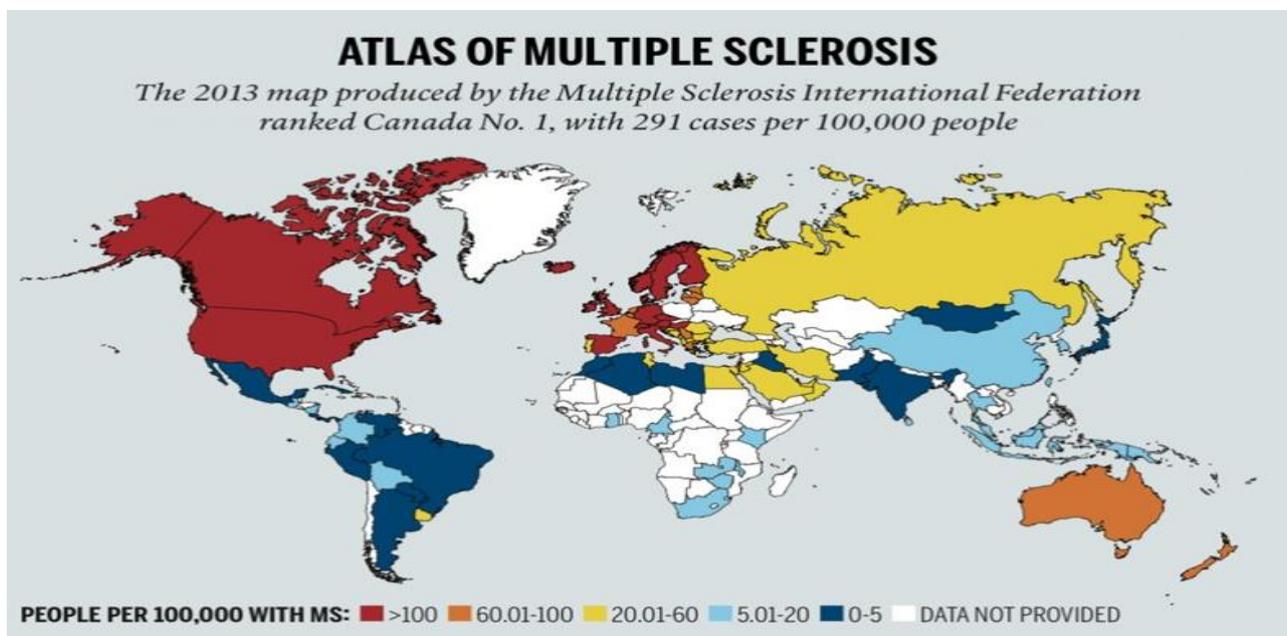


Figure 7: Prévalence de la SEP dans le monde [14]

2.7 Étiologie

Les causes spécifiques de la SEP sont actuellement inconnues et il n'y a pas de facteurs bien établis pour aider à la prévention des maladies. Selon les chercheurs, la SEP est considérée une

maladie multifactorielle c.-à-d. plusieurs facteurs vont concourir au développement de la maladie. Ces facteurs sont d'une part, des facteurs génétiques propres à chaque individu, d'autre part des facteurs environnementaux et des facteurs infectieux notamment les virus aboutissant ensemble à une maladie auto-immune [30].

2.7.1 Les facteurs génétiques

La SEP est plus fréquente deux à trois fois chez les femmes que chez les hommes et elle est également plus fréquente chez les blancs que chez les autres groupes raciaux [30]. Des études sur la famille et les jumeaux ont démontrés que la SEP présente un risque familial plus élevé chez les parents du premier ou du deuxième degré que chez les individus non apparentés et indiquent des taux de concordance plus élevés chez les jumeaux monozygotes (25-30%) que chez les jumeaux dizygotes (2-5%) atteints de SEP tandis que le taux de concordance chez les frères et sœurs non jumeaux est de 3,5 % [31]. Dans l'ensemble, Ces faits indiquent une prédisposition génétique à la SEP et non pas une maladie héréditaire (**Figure 8**).

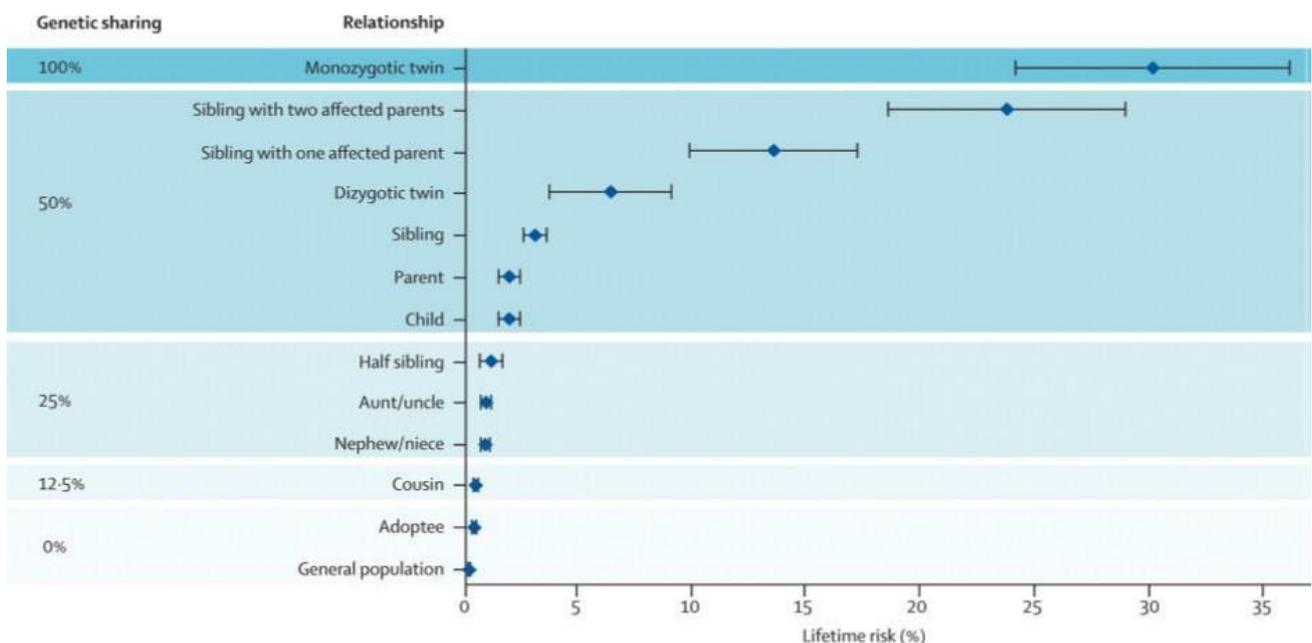


Figure 8 : Risque de développer la SEP suivant le degré de parenté avec un individu atteint [32]

D'autres preuves d'une base génétique pour la susceptibilité à la SEP ont été obtenues en étudiant l'association entre SEP et le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) [31]. Le gène HLA est localisé sur le bras court du chromosome 6 et code pour une glycoprotéine qui assure une fonction de présentation de l'antigène et d'histocompatibilité, cela permet au système immunitaire de connaître le soi et le non-soi. Le HLA est subdivisé en 3 régions: HLA-I, HLA-II et HLA-III. **HLA-I**

comprend 3 gènes: HLA-A, HLA-B et HLA-C. Alors que **HLA-II** comprend 3 paires de gènes: HLA-DP (gène DPA et DPB), HLA-DQ (DQA et DQB) et HLA-DR (DRA et DRB1). Quant au **HLA-III** ne renferme pas de gènes associés à la maladie [31], elle contient des gènes codant pour des protéines du système du complément (C2, C4, facteur B), pour le facteur de nécrose tumoral (TNF) et pour les lymphotoxines (**Figure 9**).

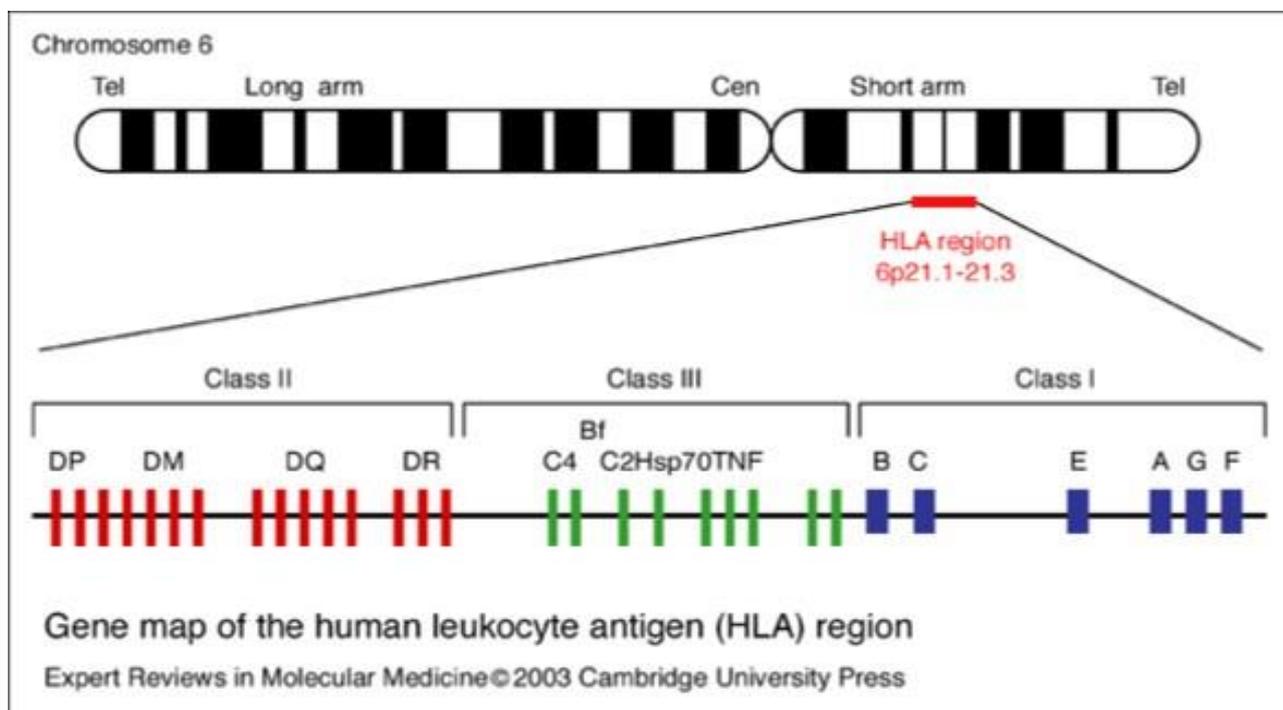


Figure 9 : Cartographie génétique du CMH : Le locus HLA sur le chromosome 6 [33]

Les patients porteurs de l'haplotype HLA-DW2 sont plus fréquemment atteints de la SEP que les sujets témoins [34]. Au fil du temps, le progrès technologique a permis de détecter le gène HLA-DRB1*15:01 [35], le gène HLA-DR4 qui se trouve chez les patients qui vivent surtout dans le pourtour méditerranéen [36]. Bien que l'haplo type HLA-DRB1*15:01 exerce l'effet génétique le plus fort dans la SEP, l'association n'est pas directe [37]. Par exemple, HLA-DRB1*08 n'augmente que modérément le risque de SEP, mais en combinaison avec HLA-DRB1*15:01, le risque se double [37]. D'autre part, HLA-DRB1*14 a un effet protecteur, il supprime complètement le risque accru de HLA-DRB1*15:01 [37]. Bien que la SEP ne soit pas comorbide avec d'autres maladies auto-immunes, environ 22% des locus associés à la maladie sont également associés à d'autres maladies auto-immunes telles que la polyarthrite rhumatoïde, le psoriasis et les maladies auto-immunes de la thyroïde [38]. En revanche, l'allèle de risque HLA qui est le plus important (DRB1*15:01) n'est pas associé avec d'autres maladies auto-immunes communes. Par conséquent, l'allèle HLA-DRB1*15:01 pourrait conduire à une auto-immunité spécifique au SNC. Des études ont trouvé qu'il y a une association entre l'âge de début de

la maladie et l'allèle DRB1*15:01, donc celui qui porte ce gène, il a un risque de débiter la maladie plus précocement de 10 mois [39]. L'allèle HLA-DRB1*15:01 augmente la sévérité de la SEP en augmentant le nombre de lésions conduisant à une diminution du volume cérébral et des performances cognitives [40] (**Figure 10**).

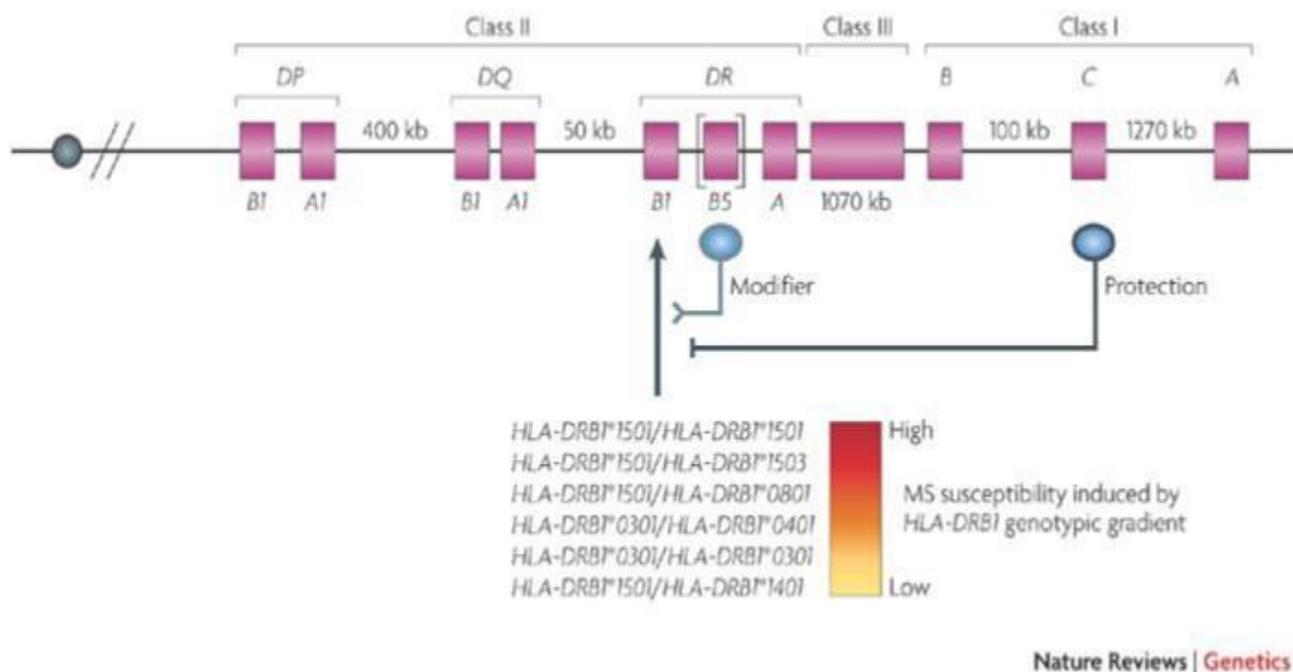


Figure 10: Locus 6p21–6p23 et SEP. Le gène HLA-DRB1*1501 est le gène qui représente la plus importante susceptibilité de la SEP [41].

En plus de la région HLA-DRB1, des études ont obtenu HLA-DQA1 et HLA-DQB1 comme des locus de risque [42]. D'autres locus de risque indépendants dans la région HLA de classe I ont été récemment confirmé tel que le HLA-A*02 qui favorise un effet protecteur à son porteur avec un odds ratio 0,73 [43]. L'allèle HLA-B44 provoquerait une évolution moins sévère en préservant le volume cérébral et en réduisant les lésions dans le cerveau [44].

Après les études menées sur les gènes du système HLA, les chercheurs ont identifié des gènes non liés au locus HLA qui sont impliqués dans la SEP. Alors, ils ont étudié le génome de nombreux sujets atteints de SEP et des sujets sans maladie grâce à la nouvelle technique du génome en association GWAS (genome wide association studies) [45]. Cette étude examine les polymorphismes mononucléotidiques ou SNP (single nucléotide polymorphisme) à travers le génome et vise à comparer les variantes génétiques communs dans un grand nombre de cas affectés à ceux des témoins non affectés afin de déterminer s'il existe une association avec la maladie [45]. Chaque étude peut regarder des centaines ou des milliers de SNP en même temps et a pu détecter des gènes de faible implication dans la SEP. Plus particulièrement, les résultats du GWAS impliquent des gènes

associés à la SEP codant pour des voies de cytokines (CXCR5, IL-2RA, IL-7RA, IL-7, IL-12RB1, IL-22RA2, IL-12A, IL-12B, IRF8, TNFRSF1A, TNFRSF14, TNFSF14) [46] et co-stimulateur (CD37, CD40, CD58, CD80, CD86, CLECL1) et des molécules de transduction du signal d'intérêt immunologique (CBLB, GPR65, MALT1, RGS1, STAT3, TAGAP, TYK2) [31]. Récemment, des études ont trouvé le gène VAV1 dont l'expression joue un rôle dans le contrôle des maladies immunitaires du SNC et dans la production de cytokines pro-inflammatoires qui sont impliquées dans la pathogénèse de la SEP. Chez les patients atteints de SEP, l'expression de VAV1 est augmentée et corrélée avec l'expression du TNF- α et de l'interféron- γ (INF- γ) dans les cellules du sang périphérique et du liquide céphalo-rachidien (LCR) [47].

2.7.2 Les facteurs environnementaux

La prédisposition génétique ne suffit pas à elle seule de déclencher la SEP. Il semble qu'il y a aussi une nécessité de l'intervention des facteurs environnementaux pour que la maladie survienne. Bien que les gènes jouent un rôle important dans la SEP, le taux de concordance de 15 à 25% chez les jumeaux monozygotes suggère que des facteurs non génétiques peuvent également affecter la susceptibilité à la SEP [48]. Les études épidémiologiques suggèrent que les facteurs environnementaux contribuent au sens large au développement de la SEP. Tous les facteurs environnementaux impliqués dans la SEP ne sont pas encore connus, mais des preuves accumulées soutiennent fortement plusieurs candidats, notamment la répartition géographique, l'exposition au soleil et/ou à la vitamine D, et la cigarette avec un soutien non confirmé ou hypothétique à l'obésité en tant que facteurs de risque [30]. Ces facteurs pourraient théoriquement modifier la susceptibilité à la SEP à n'importe quel moment de la vie, depuis la conception (ou même avant) jusqu'au début de la maladie.

2.7.2.1 La répartition géographique

La répartition géographique inégale de la SEP est essentielle pour comprendre le rôle de l'environnement. La distribution de la SEP varie selon la latitude. Cette variation est due au niveau d'ensoleillement. Sa prévalence augmente en allant de l'équateur là où l'ensoleillement est élevé vers les pôles nord et sud où le niveau du soleil est faible et elle est plus importante dans les régions tempérées plutôt que tropicales [30] (**Figure 11**)

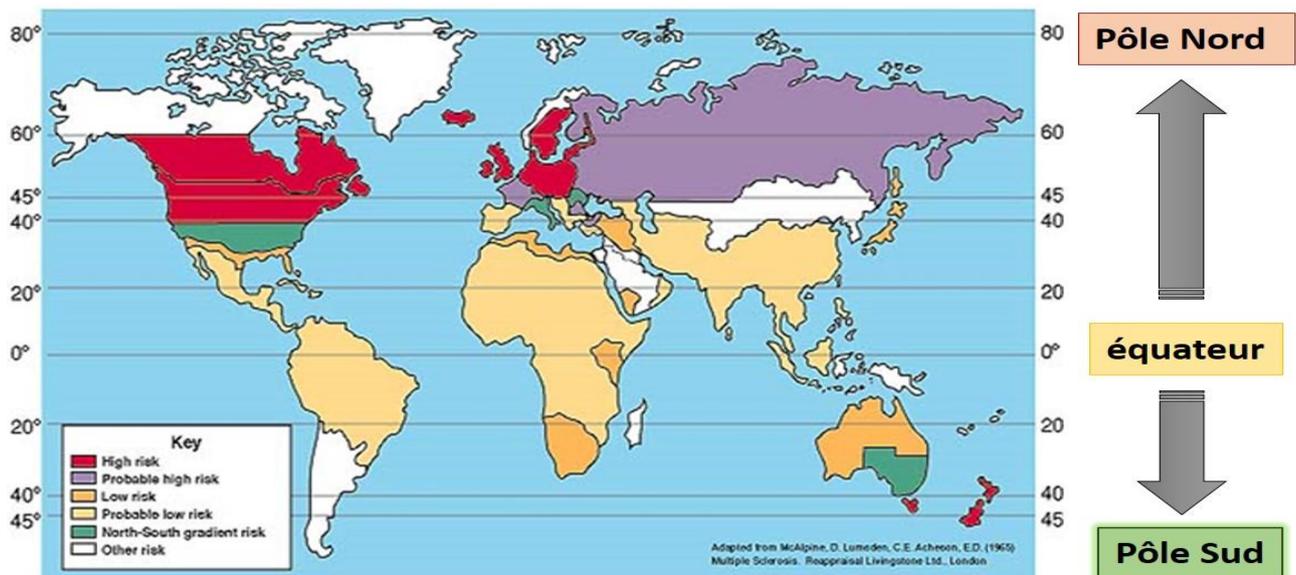


Figure 11 : La répartition géographique. La prévalence de la SEP augmente en allant de l'équateur vers les pôles nord et sud et est plus important dans les régions tempérées plutôt que tropicales. (D'après <http://library.med.utah.edu/kw/ms/epidemiology.html>).

Les études sur la migration démontrent que cette dernière a une influence sur le risque de SEP et surtout si cette migration a eu lieu pendant l'enfance. Le passage d'une région à risque élevée vers une région à risque faible avant l'âge d'adolescence réduit le risque de SEP car les individus adoptent le mode de vie du pays d'accueil. Par contre, si cette migration est faite après l'âge d'adolescence, le risque n'est pas réduit, cela est possiblement lié au fait que les individus conservent le mode de vie initial [49] (**Figure 12**).

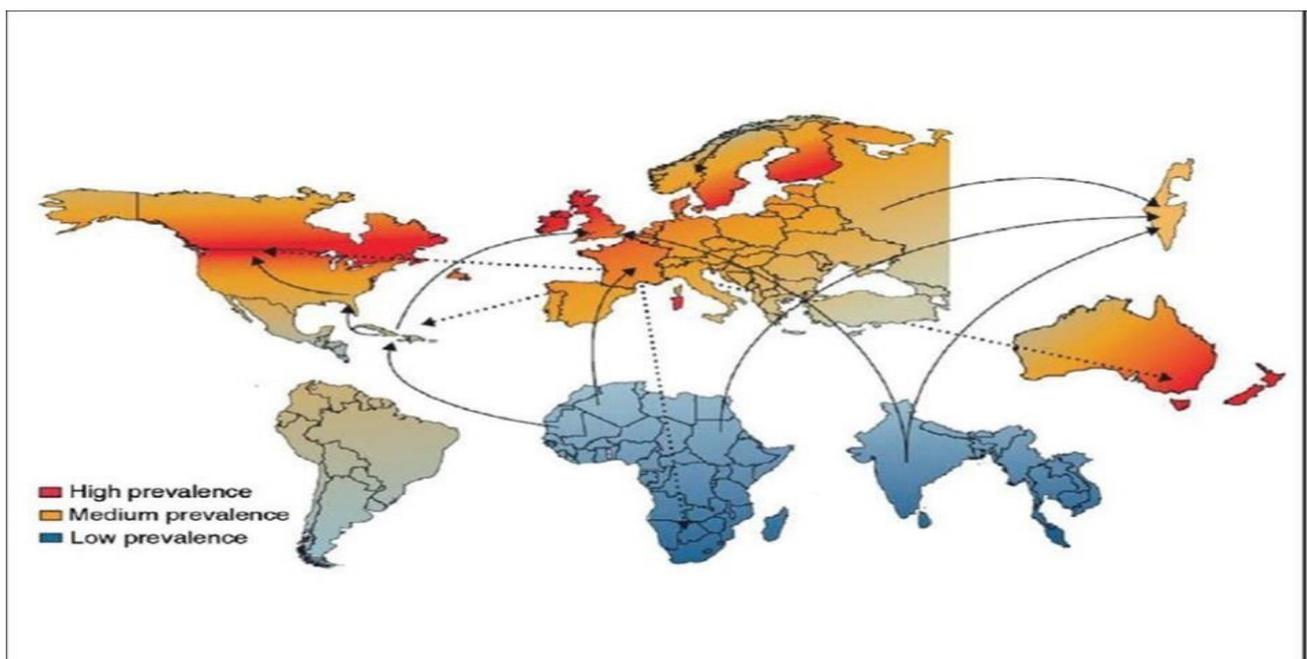


Figure 12 : Prévalence de la SEP et migrations. [32]

2.7.2.2 Vitamine D et ensoleillement

Un total de 85% de la population mondiale vit dans un endroit bien ensoleillé, alors que le reste (15%) vit à des altitudes plus élevées où l'ensoleillement est relativement très faible, tout en ayant le taux le plus élevé de SEP [30]. Les effets protecteurs de la lumière du soleil sont supposés être médiés par les rayons ultraviolets (UVR), peut-être via la vitamine D. Une exposition inadéquate à la lumière du soleil a été introduite comme principal facteur de risque de carence en vitamine D [50]. La vitamine D est une vitamine liposoluble, mais agit comme une hormone. Elle est l'un des principaux régulateurs qui jouent un rôle essentiel dans le système immunitaire [51] et diverses maladies immunologiques en particulier la SEP [52]. Des études ont montré que l'on pouvait prévenir l'EAE chez la souris en irradiant le corps entier avec de la lumière UV [53]. Les principales sources de vitamine D sont l'exposition de la peau aux rayons solaires ultraviolets B (UVB), l'alimentation d'origine animale (comme par exemple les poissons gras huile de foie de morue, le jaune d'œuf), l'alimentation d'origine végétale (comme par exemple le produit laitier, céréales.) et la supplémentation en vitamine D (**Figure 13**). Le $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ a un effet sur les organes cibles classiques : os, intestin et rein et stimule le transport du calcium de ces organes vers le sang. La production de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ est stimulée par l'hormone parathyroïdienne (PTH). Une carence en vitamine D entraîne également une sécrétion plus élevée de PTH en raison de la faible teneur en sérum $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ et du faible taux de calcium sérique ce qui entraîne un renouvellement osseux élevé provoqué par le PTH et une résorption osseuse accrue. Cela provoque une perte osseuse, principalement de l'os cortical, ce qui peut contribuer à la pathogenèse de l'ostéoporose [54]. Il existe donc une relation inverse entre le sérum 25 (OH) D et l'hormone PTH. Cela a été étudié dans l'étude longitudinale sur le vieillissement d'Amsterdam chez 1320 hommes et femmes plus âgés. La PTH sérique diminue lorsque le 25 (OH) D sérique augmente et la PTH sérique se stabilise lorsque le 25 (OH) D est suffisant [55].

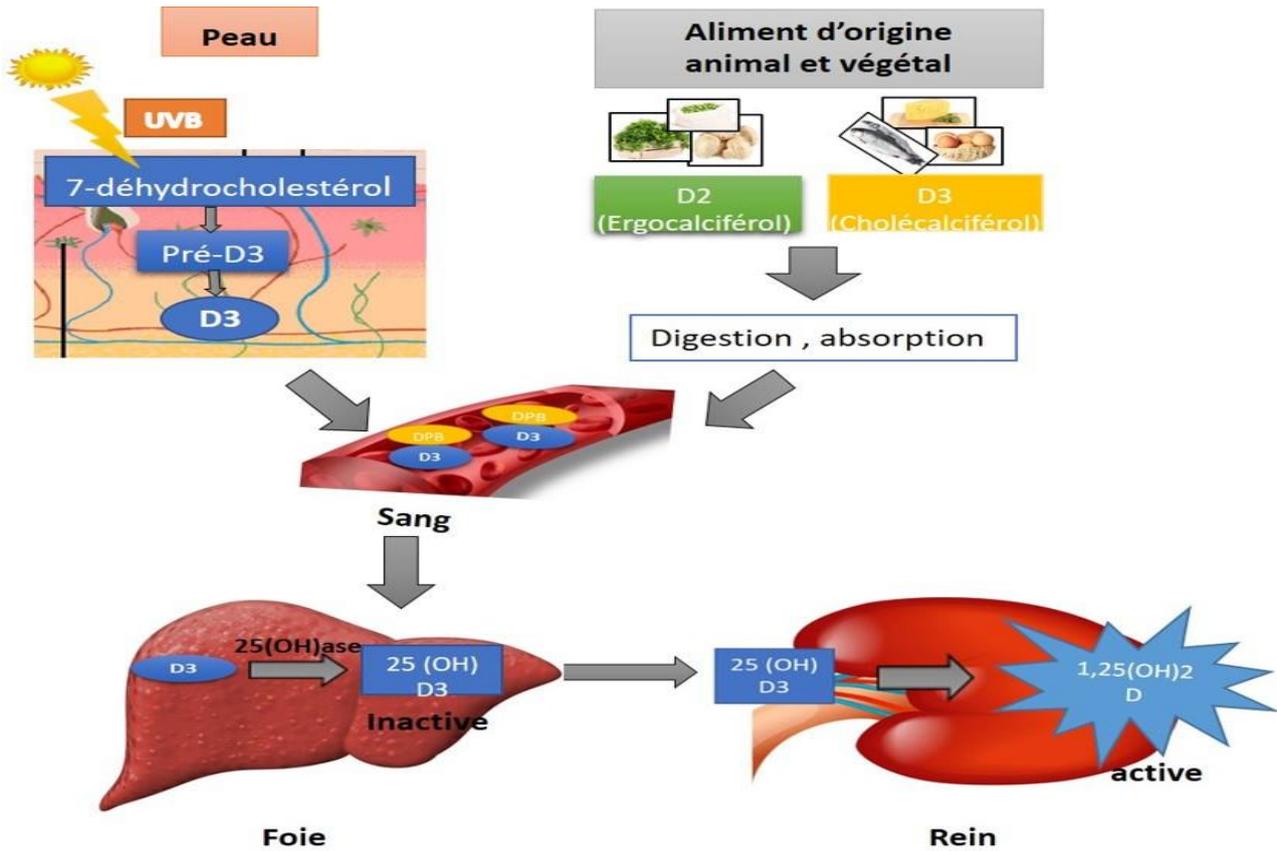


Figure 13: Cycle de la vitamine D3. La vitamine D a deux formes principales: l'ergocalciférol (vitamine D2) dérivé de la matière végétale [56] et le cholécalciférol (vitamine D3) d'origine animale [57]. La forme active de la vitamine D chez l'homme et l'animal est 1,25 dihydroxycholécalciférol ou 1,25-(OH)₂D, appelé aussi calcitriol. Cette forme est synthétisée dans la peau via le rayon UVB du 7-déhydrocholestérol pour former la pré-vitamine D3 qui s'isomérisé ensuite en vitamine D3 ou en cholécalciférol [58]. Une fois transportée vers le foie, le cholécalciférol est hydroxylée en une forme circulante majeure, la 25-hydroxyvitamine D3 (25(OH) D3) ou calcidiol. Stimulée par l'hormone parathyroïdienne, la 25(OH)D3 subit une seconde hydroxylation dans le rein ou d'autres tissus où il est converti en 1,25(OH)₂ D3 biologiquement actif [57]. Le métabolite actif 1,25(OH)₂ D3 est libéré dans la circulation sanguine et transporté dans le sang où il se lie à la protéine de liaison de la vitamine D dans le sang (DPB) et à la surface des tissus cibles. 1,25(OH)₂ D3 se lie au récepteur intracellulaire de la vitamine D (VDR) qui recrute ensuite des cofacteurs pour former un complexe transcriptionnel qui régule l'expression d'au moins 500 gènes qui dirigent une variété de fonctions biologiques [59]

Le VDR se trouve dans presque tous les tissus humains, pas seulement ceux qui participent aux actions classiques de la vitamine D, telles que les os, les intestins et les reins. Le 1,25 (OH)₂ D₃ exerce ses effets sur plusieurs types de cellules immunitaires, y compris les macrophages, les cellules dendritiques (DC), les lymphocytes T (LT) et les lymphocytes B (LB) [60]. Les macrophages et les DC expriment constitutivement le VDR, tandis que l'expression de la VDR dans les LTs est surexprimée seulement après l'activation. Dans les macrophages et les monocytes, 1,25(OH)₂ D₃ a un effet positif sur ses propres effets en augmentant l'expression de VDR et de la protéine CYP27B1 du cytochrome P450. Certains signaux médiés par les récepteurs Toll-like (TLR) peuvent également augmenter l'expression des VDRs. La forme active de la vitamine D induit également la prolifération des monocytes et l'expression de l'interleukine-1 (IL-1) et la cathélicidine (un peptide antimicrobien) par les macrophages, contribuant ainsi aux réponses immunitaires innées à certaines bactéries. 1,25(OH)₂ D₃ diminue la maturation des DCs, inhibant la régulation positive de l'expression de CMH-II, CD40, CD80 et CD86. En outre, il diminue la production d'interleukine-12 (IL-12) par les DCs tout en induisant la production d'interleukine-10 (IL-10). Dans les cellules T, le 1,25(OH)₂ D₃ diminue la production d'interleukine-2 (IL-2), d'interleukine-17 (IL-17) et d'IFN-γ et atténue l'activité cytotoxique et la prolifération des cellules T CD4⁺ et CD8⁺. Le 1,25 (OH)₂ D₃ pourrait également favoriser le développement de cellules T régulateurs de type forkhead box P3 (Treg FOXP3) et de cellules T régulatrices de type 1 (Treg-1) productrices d'IL-10. Enfin, le 1,25(OH)₂D₃ bloque la prolifération des LBs, la différenciation des cellules plasmiques et la production d'immunoglobulines. De nombreuses études observationnelles ont suggéré qu'il existe une corrélation entre le niveau de vitamine D sérique, le risque de SEP et l'activité de la maladie, ainsi le niveaux plus élevés de vitamine D réduit le risque de développer la SEP et l'activité clinique dans la SEP établie, y compris une diminution du risque de rechute et une réduction de l'activité cérébrale en IRM cérébrale [61]. D'autres études in vitro ou chez l'animal ont montré que le calcitriol stabilise la BHE [62], a des effets étendus dans le corps humain, sur l'expression des gènes au niveau nucléaire, il réduit l'expression de nombreuses cytokines pro-inflammatoires (IFN-γ, IL-2, IL-6, IL-17, TNF-α), soit par les LT CD4⁺ [63], soit LT CD8⁺[64], pourtant, il favorise l'expression de cytokine anti-inflammatoire IL-10 [65], ou des cellules Treg FOXP3 [66]. Donc il a un effet immunomodulateur. La vitamine D diminue aussi l'expression de CD40 sur la membrane des LBs, par suite la capacité de ces cellules à présenter des antigènes aux LT naïfs diminue [67]. Enfin, les hommes et les femmes ne semblent pas être égaux devant la vitamine D, les femmes bénéficieraient mieux des effets immunomodulateurs de la vitamine D que les hommes, puisque la captation de la vitamine D circulante est plus rapide chez la femme, de même que sa dégradation est plus lente [63] (**Figure 14**).

Ainsi par différentes actions, la vitamine D est capable de conférer un statut de tolérance du système immunitaire. L'exposition au soleil et le taux sanguin de 25-(OH) D3 sont donc clairement associés à un risque moindre de développer une SEP. La supplémentation en vitamine D semble diminuer le nombre de poussées chez les patients atteints de SEP rémittente [68].

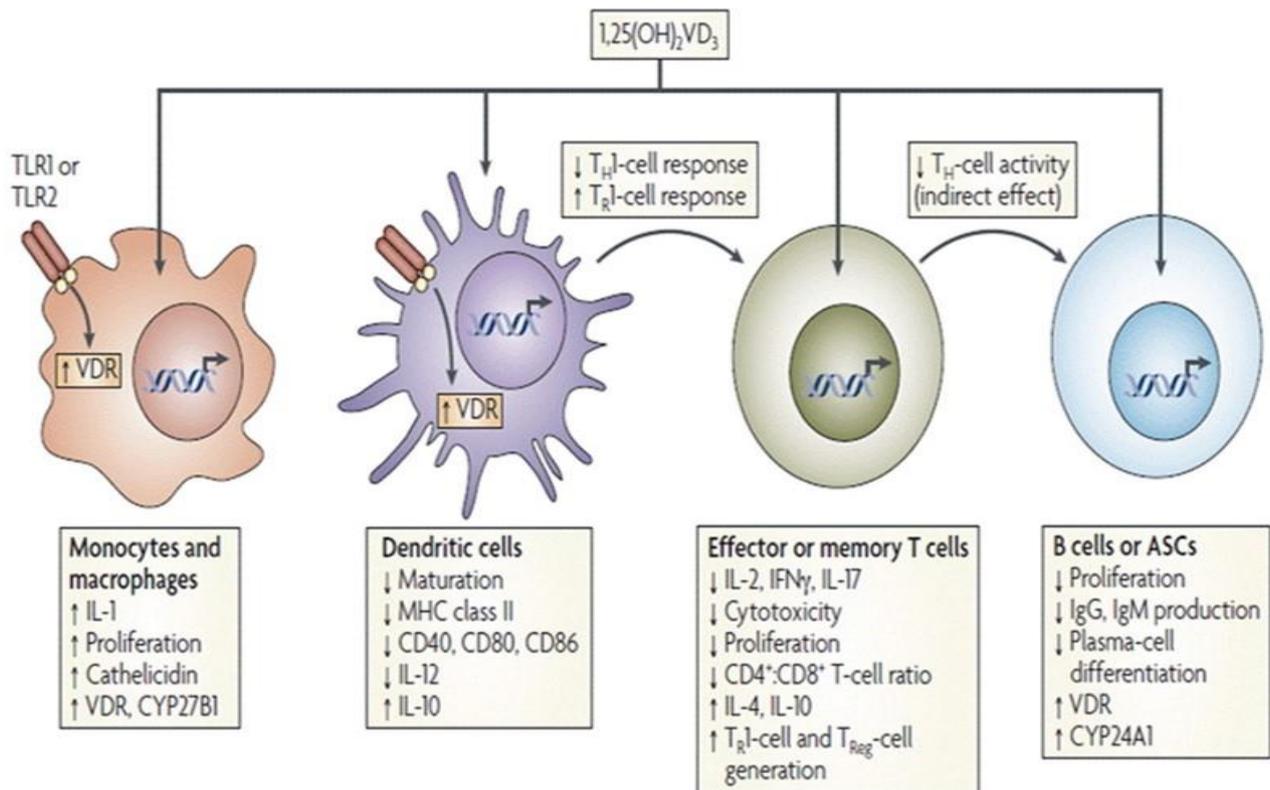


Figure 14 : Les mécanismes de l'immunomodulation de la vitamine D3. Le 1,25 (OH) 2D3 systémique ou produit localement exerce ses effets sur plusieurs types de cellules immunitaires, y compris les macrophages, les cellules dendritiques (DC), les LTs et les LBs. Les macrophages et les DC expriment de manière constitutive le VDR, tandis que l'expression de la VDR dans les lymphocytes T n'est régulée positivement qu'après l'activation. Dans les macrophages et les monocytes, 1,25 (OH)₂ D3 exerce un effet positive en augmentant l'expression de VDR et de la protéine CYP27B1 du cytochrome P450. Certains signaux médiés par les TLR peuvent également augmenter l'expression de VDR. Le 1,25 (OH)₂D3 induit également la prolifération des monocytes et l'expression de l'IL-1 et de la cathélicidine (un peptide anti-microbien) par les macrophages, contribuant ainsi aux réponses immunitaires innées de certaines bactéries. 1,25 (OH)₂D3 diminue la maturation des DCs, inhibant la régulation positive de l'expression de CMH-II, CD40, CD80 et CD86. En outre, il diminue la production d'IL-12 par les DCs tout en induisant la production d'IL-10. Dans les cellules T, le 1,25 (OH)₂D3 diminue la production d'IL-2, d'IL-17 et d'IFN- γ et atténue l'activité cytotoxique et la prolifération des cellules T CD4⁺ et CD8⁺. Le 1,25 (OH)₂D3 pourrait également favoriser le développement de cellules T(FOXP3⁺), les cellules Treg et de cellules Treg-1 et les cellules productrices d'IL-10. Enfin, le 1,25 (OH)₂D3 bloque la prolifération des cellules B, la différenciation des cellules plasmatiques et la production d'immunoglobulines. ASCs, cellules sécrétrices d'anticorps. D'après [60].

2.7.2.3 Les facteurs infectieux

i. Les virus

Il existe plusieurs agents infectieux qui ont été étudiés dans la recherche du développement de la SEP tels que Epstein-Barr virus (EBV), human herpes virus 6 (HHV6), cytomégalovirus et rétrovirus endogènes humains (human endogenous retrovirus (HERV)) [69]. L'**EBV** a été démontré par son association forte à la SEP. Il appartient à la famille des virus de l'herpès, il infecte plus de 90% de la population mondiale. Les infections se produisent habituellement durant les premiers mois de la vie. Pourtant, dans les pays développés, l'infection à l'EBV peut survenir plus tard chez l'adolescent ou à l'âge adulte. L'infection tardive conduit au développement d'une mononucléose dans 35 à 55% des cas [70]. De plus, Les personnes infectées par l'EBV durant l'enfance présentent un risque de développer la SEP 15 fois plus élevées que les personnes non infectées et les infections infantiles sont généralement silencieuses, alors que celles infectées à l'adolescence ou plus tard dans la vie présente un risque 30 fois plus élevée que les sujets contrôl. L'infection à l'adolescence ou après l'adolescence entraîne des symptômes de mononucléose infectieuse dans environ la moitié des cas [71]. En conclusion, la mononucléose infectieuse est plus fréquente chez les adolescents et les adultes que les enfants. Des études épidémiologiques portant sur un grand nombre de patients ont conclu que le risque de SEP est proche de zéro chez les personnes séronégatives à l'EBV, intermédiaire chez celles infectées durant l'enfance et plus élevé chez celles infectées plus tard dans la vie [72] **(Figure 15)**

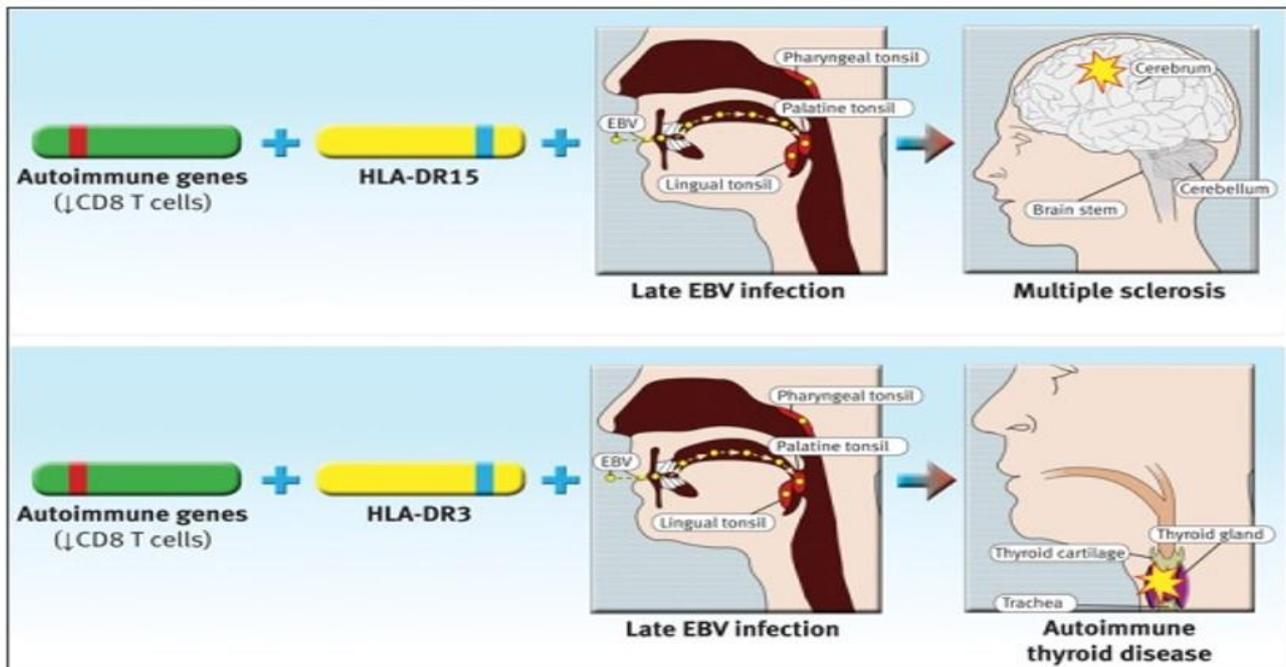


Figure 15 : Le rôle essentiel de l'EBV dans la pathogénèse de la SEP. Chez les individus présentant un déficit génétique en lymphocytes T CD8 + (portés par des «gènes auto-immuns») et avec des gènes HLA de classe II prédisposant à la SEP (comme HLA-DR15), l'infection tardive par le virus d'Epstein-Barr (EBV) conduit à l'infection par autoréactivité. Les lymphocytes B, qui s'accumulent dans le SNC, où ils réactivent les lymphocytes T autoréactifs qui orchestrent une attaque auto-immune sur le SNC conduisant au développement de la SEP (panneau supérieur). Chez les individus présentant un déficit génétique en cellules T CD8 + et avec des gènes HLA de classe II prédisposant à une maladie thyroïdienne auto-immune (comme HLA-DR3), une infection tardive à EBV conduit à l'infection de cellules B autoréactives, qui s'accumulent dans la glande thyroïde, où elles réactivent les cellules T autoréactives qui orchestrent une attaque auto-immune sur la glande thyroïde, conduisant au développement d'une maladie thyroïdienne auto-immune (panneau inférieur).[73]

Le **HHV6** existe sous deux sous-types A et B. Le sous-type A est le plus souvent détecté chez les patients atteints de SEP [74] alors que le sous-type B est plutôt associé à la roséole infantile [75].

Le **cytomégalo virus** a été préjugé d'être impliqué dans le développement de la SEP, cependant, des études épidémiologiques ont montré une corrélation négative chez l'enfant et chez l'adulte atteint de SEP [76].

Les **HERVs** sont des virus qui se sont intégrés de façon stable au génome de l'homme lors d'infections par des retrovirus exogènes. Les chercheurs ont pensé que ces retrovirus endogènes seraient impliqués dans la pathogénèse de la SEP. *Herve Perron et al* ont fait ces premières observations sur un retrovirus impliqué dans la SEP (multiple sclerosis-associated Retrovirus: MSRV) [77]. Les chercheurs ont ensuite montré que la protéine d'enveloppe de ce rétrovirus (MSRV-Env) activait le système immunitaire en stimulant la production des cytokines pro-inflammatoires, en agissant sur le récepteur TLR4 et son co-récepteur CD14, et inhibait la différenciation de CPOs chez les personnes

atteintes de SEP [78]. De plus, ils ont récemment retrouvé cette protéine MSRV-Env sous forme soluble dans le sérum de 73 % des patients atteints de SEP., ainsi que dans les macrophages au niveau des lésions cérébrales [79]. (Figure 16).

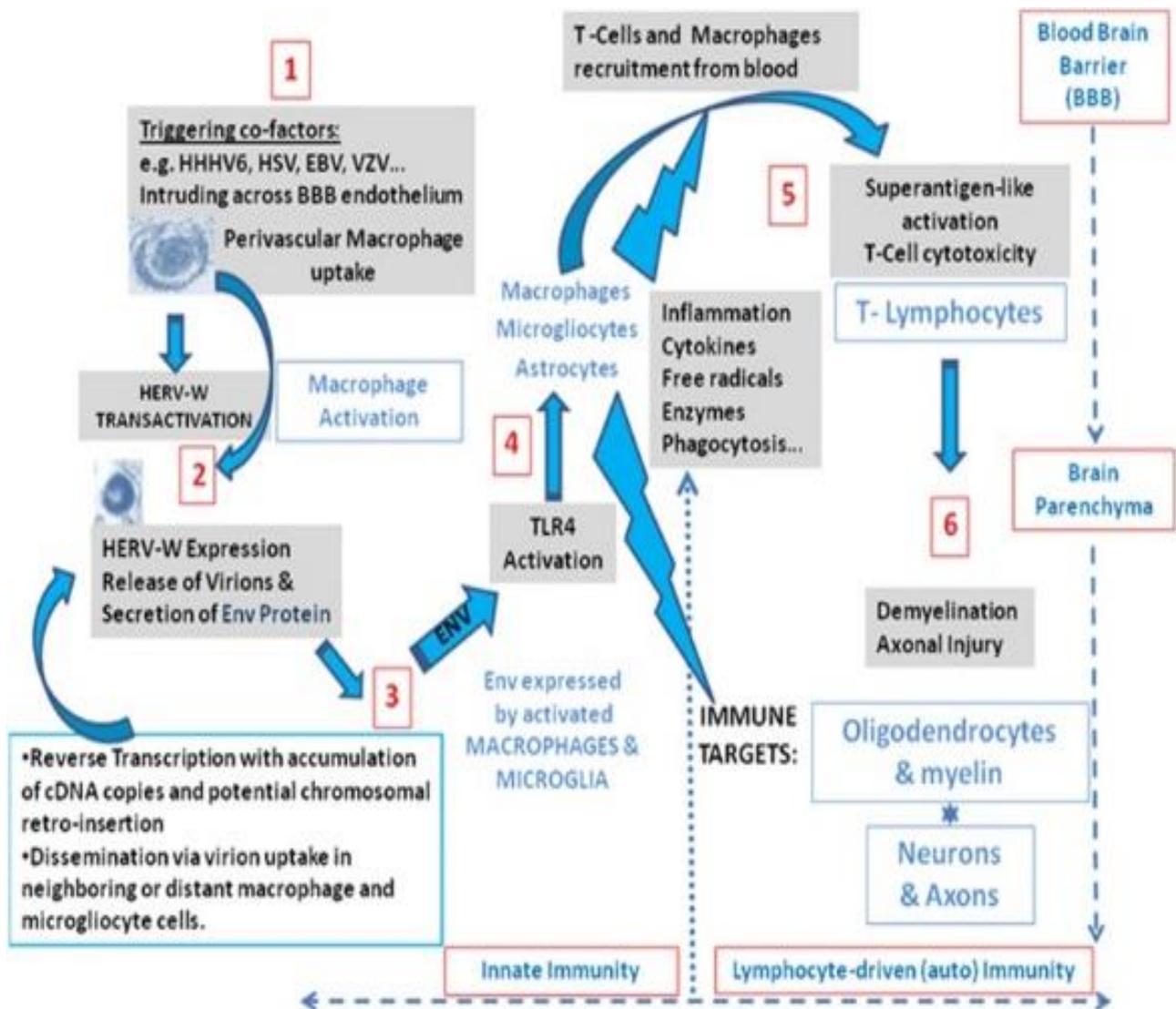


Figure 16 : Modèle représentant l'activation immunitaire périphérique et la neuroinflammation induite par l'HERV-W (1) Des facteurs exogènes comme une infection par l'EBV, l'HSV ou l'HHV-6 transactivent l'HERV-W conduisant à la production de virions et de protéines d'enveloppe. (2).Ceci permet d'activer l'immunité innée via le récepteur TLR4. (3) provoquant une cascade inflammatoire. (4) intensifiée par l'activité super antigénique de la protéine d'enveloppe. (5), ce qui aboutit à la démyélinisation et la formation de lésions axonales (6). D'après [79]

ii. Les parasites

On sait depuis plusieurs années qu'une exposition des enfants à divers agents infectieux confère une immunité protectrice, par contre quand il survient plus tard dans la vie ça confère un effet pathogène. Ainsi, des études ont été démontrées que l'éradication des infections helminthiques a joué un rôle dans l'incidence croissante de la SEP dans les Antilles françaises. [80]. Les helminthes ont pour fin de vivre en harmonie avec leur hôte, dès lors, ils induisent des réponses anti-inflammatoires pour diminuer leur risque d'être éliminé par l'hôte, ce qui aboutit à une augmentation de la quantité de Treg (CD4+, CD25+, Fox P3+), une diminution de la production d'IFN- γ et la production des cytokines anti-inflammatoires telles que TGF- β , IL-4 ou encore IL-10 [81]. Par conséquent, *Corréale et al.* a montré que les patients SEP qui sont infectés par des parasites présentent un nombre significativement plus bas de poussées, une absence d'aggravation du handicap et une plus faible charge lésionnelle à l'IRM par rapport à des patients SEP non infectés. Donc les helminthes jouent un rôle protecteur dans l'EAE ou la SEP, parmi lesquels qui ont été identifiés sont *Trichuris trichuris*, *trichinella spiralis*, *schistosoma mansoni* ou *trichuris suis* [63].

2.7.2.4 Le tabac

Il y a d'autres facteurs qui semblent favoriser la SEP, tel que le tabagisme qui serait impliqué dans le déclenchement de la SEP chez les personnes ayant une susceptibilité génétique. Ce facteur participe aussi au déclenchement d'autres pathogènes auto-immunes comme le lupus ou la polyarthrite rhumatoïde. Même les enfants qui ont déjà été exposés au tabagisme parental ont un risque plus élevé de développer une SEP [82]. Actuellement, on ne connaît pas l'action exacte du tabac dans la SEP. On admet que la nicotine serait capable de modifier la perméabilité de la BHE et permettrait aux lymphocytes d'entrer dans le cerveau. La nicotine stimulerait la production de monoxyde d'azote (NO) endogène susceptible d'être impliqué dans le déclenchement de la maladie [83].

En conclusion, la SEP est causée par une réponse auto-immune anormale chez des individus génétiquement sensibles après des expositions environnementales spécifiques dont l'EBV, la vitamine D et le tabac semblent les plus influents. C'est une maladie multifactorielle, elle dépend de plusieurs facteurs qui interagissent entre eux et multigénique. Cependant le rôle de la génétique semble modéré puisque les facteurs environnementaux participent plus de 85 % au risque de développer une SEP [84].

2.8 Anatomopathologie

2.8.1 Les plaques démyélinisantes

L'idée que la SEP est une sclérose disséminée ressemblant à une plaque a été établie il y a environ 150 ans. Toutes les régions myélinisées du SNC peuvent être affectées par la SEP, tels que les aires periventriculaire, les nerfs optiques et chiasma, la substance blanche hémisphérique, le tronc cérébral, le cervelet et la moelle épinière. Ces plaques sont de tailles variables et d'âges différents. La pathologie de la SEP est généralement centrée sur l'étude des tissus de patients. L'aspect histologique est différent en fonction de l'âge des lésions mais il existe toujours une atteinte sélective de la myéline associée à des degrés divers d'atteintes axonales. On distingue:

-Des plaques récentes ou « actives », où le processus de démyélinisation est en cours. Elles sont caractérisées par des infiltrats de LT (CD8+ et CD4+) activés, de macrophages phagocytant les débris myéliniques, d'une gliose réactionnelle (réaction des astrocytes) et d'un œdème témoignant de la rupture de la BHE.

-Des plaques anciennes ou « chroniques », non actives, où le processus de démyélinisation est terminé caractérisé par la perte d'oligodendrocytes, une gliose cicatricielle et une perte axonale [85].

L'examen pathologique du cerveau et de la moelle épinière chez des patients atteints de SEP chronique peut révéler des plaques ou des lésions grisâtres à la surface du nerf optique, du chiasma, du tronc cérébral et de la moelle épinière. Dans les cas chroniques graves, une atrophie du cerveau et de la moelle épinière est observée et le poids du cerveau peut être réduit. Le SNPer et d'autres organes ne sont pas ciblés par le processus pathologique. La compréhension des détails de cette pathologie, et surtout comment elle évolue au fil du temps, a été révolutionnée par des techniques modernes telles que la coloration immuno histochimique et l'IRM [86]. La dissection du cerveau révèle des lésions rétrécies grisâtres qui sont souvent fibreuses en raison de l'astrogliose des lésions chroniques inactives. Ceux-ci sont clairement identifiables dans la substance blanche, souvent associée aux vaisseaux sanguins (**Figure 17A**). Les lésions autour des vaisseaux sanguins a été documentée par Dawson, donnant naissance au terme «doigts de Dawson» [87]. En mettant l'accent sur la pathologie de la matière grise, un examen attentif du cerveau révèle également des lésions dans les régions corticales. Les lésions corticales sont moins inflammatoires que leurs homologues de la substance blanche et ont considérablement moins de perméabilité de la BHE [88]. Ces lésions de la substance grise sont beaucoup moins évidentes que les lésions de la substance blanche et c'est probablement la raison pour laquelle la SEP est considérée à l'origine comme une maladie purement

blanche. Ainsi, la pathologie de la matière grise joue un rôle clé dans le handicap cognitif.

2.8.2 Les quatre profils de démyélinisation

Bien que toutes les lésions actives démyélinisées aient été associées à un infiltrat inflammatoire composé principalement de LT et de macrophages, les analyses histo-immunologiques de ces lésions ont révélé quatre profils différents (pattern I-IV) basés sur la distribution de la perte de myéline, la géographie de la plaque et l'extension des oligodendrocytes, la destruction et la preuve immunologique des immunoglobulines et du dépôt de complément activé. La démyélinisation peut être induite par les macrophages et leurs produits toxiques (pattern I), par des anticorps et un complément démyélinisants spécifiques (pattern II), par des modifications dégénératives des processus distaux, en particulier oligodendrocytes péri-axonaux suivis d'apoptose (pattern III) ou par dégénérescence primaire des oligodendrocytes suivi de la destruction de la myéline (pattern IV) [89] **(Figure 17B)**.

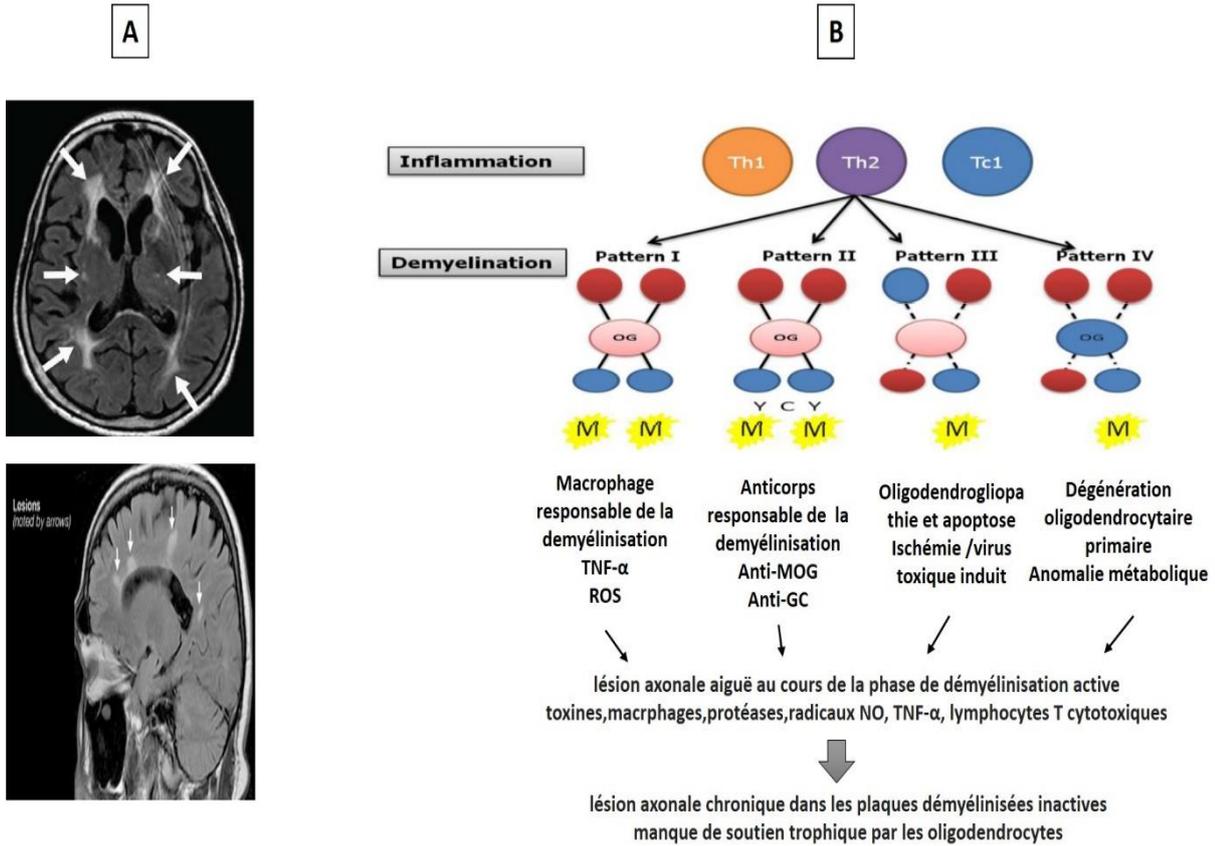


Figure 17: A: IRM du cerveau. La dissection du cerveau révèle des lésions rétrécies blanchâtres notés par des flèches [90]. B : Résumé du mécanisme pathogénique de la formation des lésions activement démyélinisantes. Les sphères bleues indiquent une gaine de myéline normale et des sphères rouges une gaine de myéline démyélinisée. **Inflammation:** Les cellules T auxiliaires 1 (Th1) maintiennent l'inflammation dans le SNC. Ces cellules sécrètent des cytokines pro-inflammatoires qui induisent l'activation des macrophages (M), qui sont principalement responsables de la démyélinisation et de la lésion axonale. De plus, les LT restreints en classe Th2 et cytotoxiques (Tc) pourraient modifier le résultat des lésions. **Démyélinisation:** la gaine de myéline et les oligodendrocytes (OD) sont détruits par de multiples mécanismes. Quatre mécanismes différents (schéma) dans les lésions démyélinisantes actives ont été trouvés. **Lésion axonale:** la lésion axonale suit la destruction aiguë de la gaine de myéline. Abréviations: C complément; GC galactocérobroside; M macrophages; MOG myéline oligodendrocytes glycoprotéine; NO oxyde nitrique; ROS les espèces réactives de l'oxygène; Le facteur de nécrose tumorale du TNF; Y anticorps. D'après [89].

2.9 Diagnostic

Il n'y a pas un test génétique, bactérien ou viral capable de fournir un diagnostic définitif. Le diagnostic de la SEP n'est pas facile et est posé seulement après la deuxième poussée. Lors d'une première poussée, on parle de syndrome clinique isolé (CIS) sauf si la localisation des atteintes est typique de la maladie (periventriculaire, juxtacorticale, infratentorielle, spinale) environ 60 % des patients ayant un CIS présenteront dans les 10 ans qui suivent une SEP. La SEP est fondée sur la mise en évidence de lésions distinctes dans le temps (dissémination temporelle) et dans l'espace (dissémination spatiale), sur la présence d'arguments cliniques et paracliniques (LCR, IRM) en faveur du caractère inflammatoire démyélinisant de la maladie et enfin sur l'absence d'autre diagnostic. L'âge de survenue est également un élément important qui oriente le diagnostic. Les critères diagnostiques retenus par consensus sont ceux de McDonald et al. révisés en 2017 [91].

2.9.1 Diagnostic clinique

Il se repose sur la dissémination des lésions dans le temps qui correspond à la répétition d'épisodes neurologiques bien distincts au fil du temps et sur la dissémination spatiale qui correspond à la diffusion des lésions dans l'espace. Il faut au moins deux lésions distinctes dans le SNC et la survenue de la deuxième poussée doit être au moins un mois après la première pour qu'on puisse parler de la SEP. Comme les lésions du SNC peuvent être causées par d'autres affections que la SEP (comme le cancer, les carences nutritionnelles ou les lésions cérébrales traumatiques), les neurologues élimineraient d'abord toutes les autres causes possibles de lésions avant de poser un diagnostic de SEP. Par conséquent, le processus de diagnostic différentiel était souvent long et laborieux et exige un lourd fardeau psychologique pour les patients et leurs familles. Il n'est pas surprenant que les diagnostics et les erreurs de diagnostic aient été assez fréquentes et que de nombreux patients aient été renvoyés chez eux avec une SEP «possible» et «probable» pour attendre que leurs symptômes progressent avant de recevoir un diagnostic définitif [92].

2.9.2 L'imagerie par résonance magnétique (IRM)

L'IRM constitue actuellement l'examen paraclinique le plus utile pour le diagnostic positif et différentiel de la SEP. C'est une technique d'imagerie médicale utilisant un contraste élevée qui permet une étude précise des organes et la mise en évidence de la dissémination spatiale des lésions que ça soit symptomatique ou non et la dissémination temporelle en détectant les anciennes lésions des lésions actives récentes grâce à un produit de contraste le gadolinium. Cet outil s'appuie

sur les nouveaux critères établis et révisés par McDonald et al. 2017 [91].

On distingue différents types de lésions : Des lésions qui apparaissent plus claires que la substance blanche, ces lésions sont sous forme d'hyper signaux en T2 ou en FLAIR «Fluid Attenuation Inversion recovery», et des lésions qui apparaissent sous forme de trous noirs c.-à-d. un peu plus foncé que la substance blanche qui correspond à une perte axonale permanente. Ces lésions sont généralement ovoïdes, de plus de 5 mm, et se localisent majoritairement dans la substance blanche périventriculaire, juxta-corticale, sous-tensorielle (dans le cervelet ou le tronc cérébral) ou médullaire de la substance blanche. Ces lésions sont sous forme d'hypo signal en T1 (**Figure 18**)

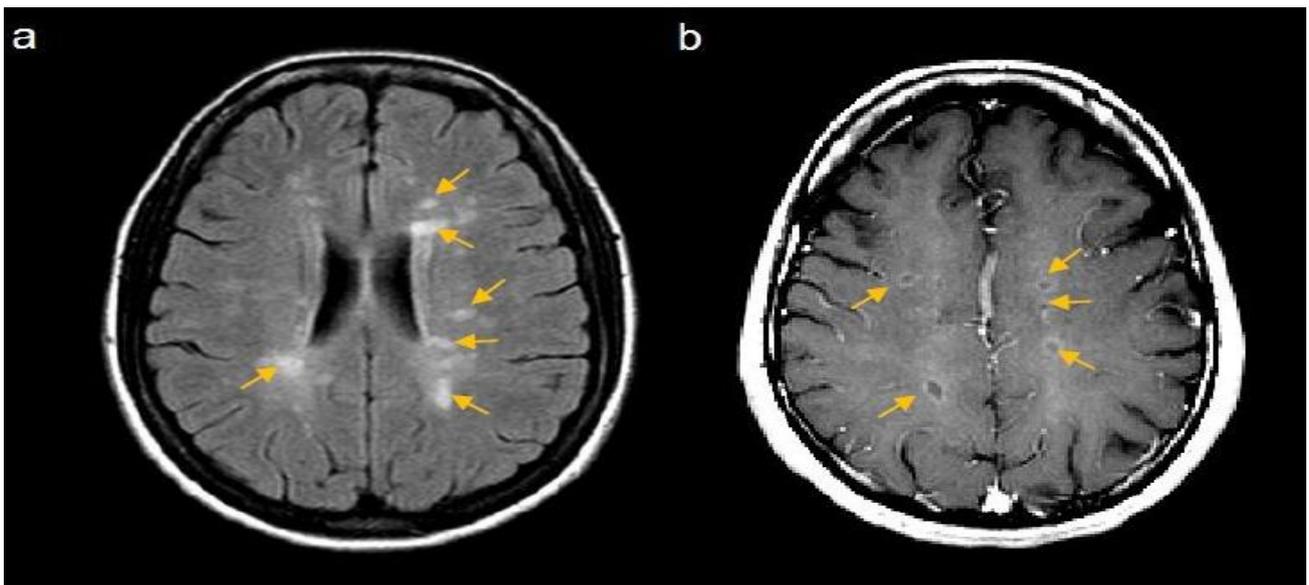


Figure 18 : Lésions sous deux formes T1 et T2. (a) IRM cérébrale en T2 (b) Lésions T1 prenant le gadolinium [93]. Les lésions sont signalées par les flèches jaunes

2.9.3 Analyse biologique du liquide céphalo-rachidien

Un examen du liquide céphalo-rachidien (LCR) est prescrit auprès des neurologues pour le diagnostic de la SEP. C'est un test important mais qui n'est pas obligatoire. Il est utilisé pour fournir un soutien supplémentaire pour le diagnostic lorsque les caractéristiques cliniques et l'IRM sont insuffisantes pour faire le diagnostic. Dans la SEP, l'exploration biochimique repose sur deux dosages quantitatifs et qualitatifs. Le dosage quantitative a pour but d'évaluer l'état de perméabilité de la BHE, il mesure la quantité des immunoglobulines et d'albumine présentes dans le LCR comparés au sérum [94] alors que le dosage qualitative a pour but de rechercher les bandes oligoclonales d'immunoglobulines IgG par focalisation isoélectrique. Cette technique met en évidence la distribution oligoclonales des IgG du LCR. Chez les personnes atteintes de SEP, ces bandes ne sont pas présentes dans leur sérum, montrant ainsi une synthèse intrathécale d'IgG et donc un processus

inflammatoire limité au SNC [94]. L'analyse de LCR chez les patients atteints de SEP montre une inflammation au niveau du SNC, on retrouve une hyperprotéinorachie (supérieur à 1g/l), une cytorachie composée surtout de lymphocytes et de plasmocytes supérieure à 4 éléments/mm³ et reste inférieure à 50 éléments/mm³ (N: 0-2 éléments/mm³), Index IgG supérieur à 0,7 (témoigne d'une synthèse intrathécale d'IgG). Ces anomalies ne sont pas spécifiques de la SEP, elles peuvent être retrouvées dans d'autres affections inflammatoires ou infectieuses du SNC tels que la maladie de Behçet, méningite, lupus [95].

2.9.4 Potentiels évoqués

Un autre examen complémentaire qui peut nous aider à diagnostiquer la SEP et notamment nous donner des arguments de dissémination spatiale, ce sont les potentiels évoqués (PE). Ce test permet de stimuler les voies nerveuses, à l'aide d'électrodes placées au niveau du crâne, du cou et des membres des patients et permet d'évaluer la vitesse de conduction de l'IN au niveau de la voie visuelle, motrice, sensitive et auditives en réponse à un stimulus. Dans le cas de SEP, l'influx va être très ralenti au niveau des fibres démyélinisées par rapport à la fibre normale. La mesure des PE enregistre le temps que met un signal pour atteindre le cerveau. Les retards sont détectés en comparant les résultats du test avec le temps nécessaire pour transmettre les impulsions chez les personnes non atteintes de SEP. Les potentiels évoqués visuels sont les PE les plus fréquemment mesurés. Ils enregistrent l'activité du nerf optique en mesurant le temps nécessaire pour que le cerveau reçoive et interprète les images [96].

2.10 Signes cliniques

Les symptômes varient en fonction de l'endroit du SNC où l'inflammation va se situer et peuvent différer considérablement d'une personne à l'autre. Au début de la maladie, il y a atteinte qui est la plupart du temps monofocal, on va avoir de signe très varié, en majorité la vision devient floue par atteinte du nerf optique, la coordination des mouvements est perturbée, dans la plupart des cas on trouve des troubles sensibles, les patients sentent un picotement inhabituel, une fatigue anormale, tremblent, perd l'équilibre spasme musculaire. La maladie peut affecter quasiment toutes les fonctions biologiques. Ces symptômes apparaissent et disparaissent en laissant plus ou moins des séquelles. Quand la maladie est plus avancée d'autres symptômes peuvent survenir parmi lesquelles l'incontinence, constipation, les troubles de l'élocution, la paralysie et le trouble de la mémoire [97].

2.11 Traitement

À nos jours, les médicaments utilisés par les patients atteints de SEP permettent globalement de freiner cette maladie chronique mais pas de la guérir. L'efficacité du traitement se juge sur la fréquence des poussées et sur l'évolution du handicap neurologique. Au cours des deux dernières décennies, de nombreux progrès ont été réalisés dans le développement de traitements ciblant le système immunitaire des patients atteints de SEP-RR. Ceux-ci comprennent des médicaments immunomodulateurs à large spectre d'action, mais aussi des médicaments immunosuppresseurs très spécifiques ciblant sélectivement des molécules uniques du système immunitaire. En décembre 2017, la Food and Drug Administration (FDA) aux États-Unis a approuvé 15 médicaments pour modifier l'évolution de la SEP: 5 préparations d'IFN- β ; 2 préparations d'acétate de glatiramère; les ACm natalizumab, alemtuzumab, daclizumab et ocrelizumab (première thérapie ciblée sur les LBs), l'agent chimio thérapeutique mitoxantrone; et les agents oraux à petites molécules, le fingolimod, le diméthyle fumarate et le tériflunomide. La damfampridine a été approuvée comme traitement symptomatique pour améliorer la vitesse de marche. L'approbation récente de l'ocrelizumab pour la SEP progressive primaire est une étape prometteuse, mais les raisons de la capacité de l'ocrelizumab à ralentir la progression de la SEP reste incertain [98]. Une immunosuppression agressive ou une ablation immunitaire ne peut empêcher l'accumulation d'un handicap dans la phase progressive de cette maladie [99]. Ces traitements sont particulièrement efficaces pendant la phase précoce de la SEP pour réduire les taux de rechute et la progression vers le handicap, mais ils ont peu ou pas d'effet durant la phase progressive [100]. Bien que ces médicaments puissent inhiber la réponse auto-immune dans la SEP, elle ne joue pas un rôle direct dans l'amélioration de la remyélinisation. L'effet bénéfique des immunosuppresseurs et immunomodulateurs conforte l'idée que la SEP est une maladie auto-immune. Ces traitements sont conçus pour supprimer les poussées inflammatoires, prévenir de nouvelles poussées et empêcher la migration des cellules immunitaires à travers la BHE (Figure 19).

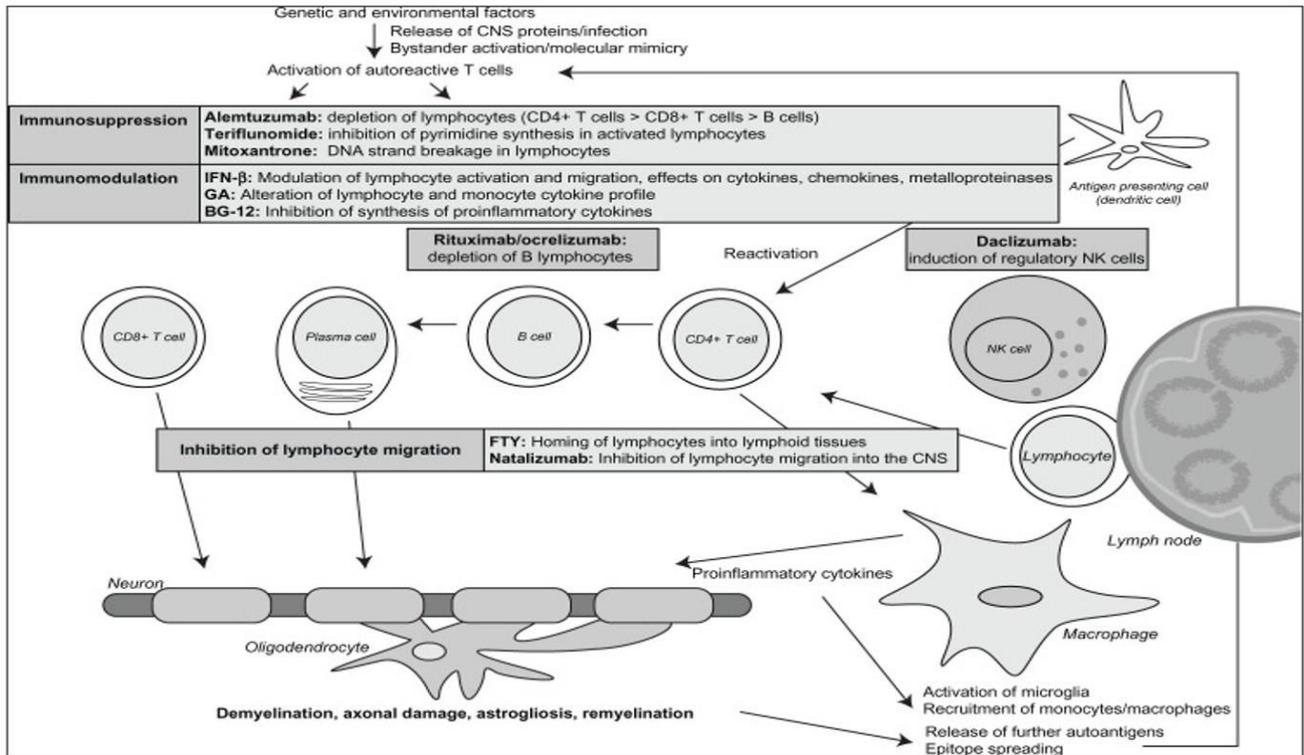


Figure 19: Thérapies établies et émergentes contre la SEP. **Abbreviations:** IFN-β, interféron bêta; GA, glatiramère acetate; BG-12, dimethyl fumarate; FTY, fingolimod; NK cell, natural killer cell.

Cependant, le traitement de l'inflammation récurrente n'assure pas nécessairement la remyélinisation des lésions démyélinisées, il est donc crucial de concevoir des stratégies thérapeutiques visant à promouvoir la remyélinisation dans le SNC après l'apparition de la SEP.

2.11.1 Traitement par des cellules souches

Il est intéressant de noter que la thérapie par cellules souches est apparue comme une approche thérapeutique prometteuse dans la SEP [101]. La capacité des cellules souches à différencier et à remplacer les cellules qui ont été perdues à la suite d'une maladie ou d'une blessure [102] fait de la transplantation de ces cellules ou la programmation de cellules somatiques vers les cellules souhaitées un candidat au traitement de divers états pathologiques, en particulier les troubles neurodégénératifs et neurologiques comme la SEP [103, 104]. Donc, les cellules souches pourraient être utilisées pour atténuer la progression de la maladie et régénérer les dommages irréversibles et la perte neuronale dans les lésions liées au SNC [105]. Il existe au moins cinq types de cellules souches, y compris les cellules souches embryonnaires (CES), les cellules souches hématopoïétiques (CSH), les cellules souches neurales (CSN), les cellules souches mésenchymateuses

(CSM) et les cellules souches pluripotentes induites (CSPi) qui produisent des cellules neurales [103, 106, 107].

Pour la première fois, une thérapie immunoablative avec des CSH a été menée sur des patients atteints de SEP en 1995 [108]. Malgré les nombreux avantages des CSH, la maladie maligne secondaire, le lymphome induit par le virus d'Epstein-Barr (EBV) et la thrombocytopenie ont entravés les applications des CSH en thérapie clinique [109]. Des études à petite échelle ont montré que l'immuno-ablation suivie d'une greffe autologue de cellules souches hématopoïétiques peut être un traitement très durable et efficace et de plus en plus sûr [110]. De plus, les CES obtenus par fécondation in vitro sont instables épigénétiquement et vulnérables aux conditions environnementales ou de culture [111]. En outre, pour éviter l'organisation du tératocarcinome, les iPSC doivent être différenciées en cellules souhaitées avant la transplantation [112].

Fait intéressant, il a été démontré que la transplantation des CSM autologues ou allogéniques grâce au remplacement des cellules, aux effets neuroprotecteurs et à la sécrétion de facteurs immunorégulateurs améliorent l'immunomodulation et le processus de remyélinisation dans le SNC [113]. Différentes caractéristiques des CSM, notamment leur capacité à migrer vers le site de la lésion, leur différenciation vers la lignée neurale et l'immunomodulation en sécrétant des facteurs neurotropes et anti-inflammatoires, en font une stratégie thérapeutique intéressante dans la maladie de SEP [114]. La barrière hémato-encéphalique (BHE) est une frontière semi-perméable qui limite le passage des macromolécules et des cellules à travers la BHE. Après la perturbation de la BBB, les MSC peuvent traverser la BBB à travers des zones déficientes [115, 116]. En outre, il a été montré que de nombreuses chimiokines, facteurs de croissance et interactions de récepteurs tels que le facteur 1 dérivé des cellules stromales (SDF-1) / récepteur de chimiokines CXC de type 4 (CXCR4), le facteur de cellules souches/ckit, HGF/c-Met, facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF) / récepteur VEGF, facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF) / récepteur PDGF, monocyte chimioattractant protéine-1 (MCP-1) / récepteur de chimiokines CC de type 2 et boîte de groupe 1 / récepteur à haute mobilité sont impliqués dans le retour et la migration des CSM [114]. Parmi ceux-ci, l'interaction CXCR4 et SDF-1 joue un rôle important dans la migration des MSC dans le tissu sur des déclencheurs chimiotactiques spécifiques [117] **(Figure 20)**.

Diverses études ont utilisé différents modèles murins de la SEP avec différents types de cellules souches et fourni une preuve de principe pour cette approche. Des neurosphères marquées dérivées du cerveau antérieur des souris C57BL/6 ont été administrées à la fois par voie intraveineuse (IV) et intra céphalo-ventriculaire (IC) à des souris EAE C57BL/6, il semble que les cellules transplantées puissent se différencier en ODs matures et remyélinisent les axones et jouent un rôle dans l'induction

de la maturation des CPOs résidents qui induisent à leur tour la remyélinisation [118]. Une autre étude prometteuse pour la remyélinisation a récemment démontré les effets de la benztropine, un médicament approuvé par la FDA, sur la différenciation du CPO [119], elle est couramment utilisée dans le traitement de la maladie de Parkinson ou pour réduire les tremblements produits comme effet secondaire d'autres médicaments. Les nouveaux défis concernent les traitements ciblant la phase progressive de la SEP, sur laquelle les thérapies actuelles n'ont peu, voire pas d'impact, afin de favoriser la neuroprotection ou de limiter voire arrêter le processus de neurodégénérescence.

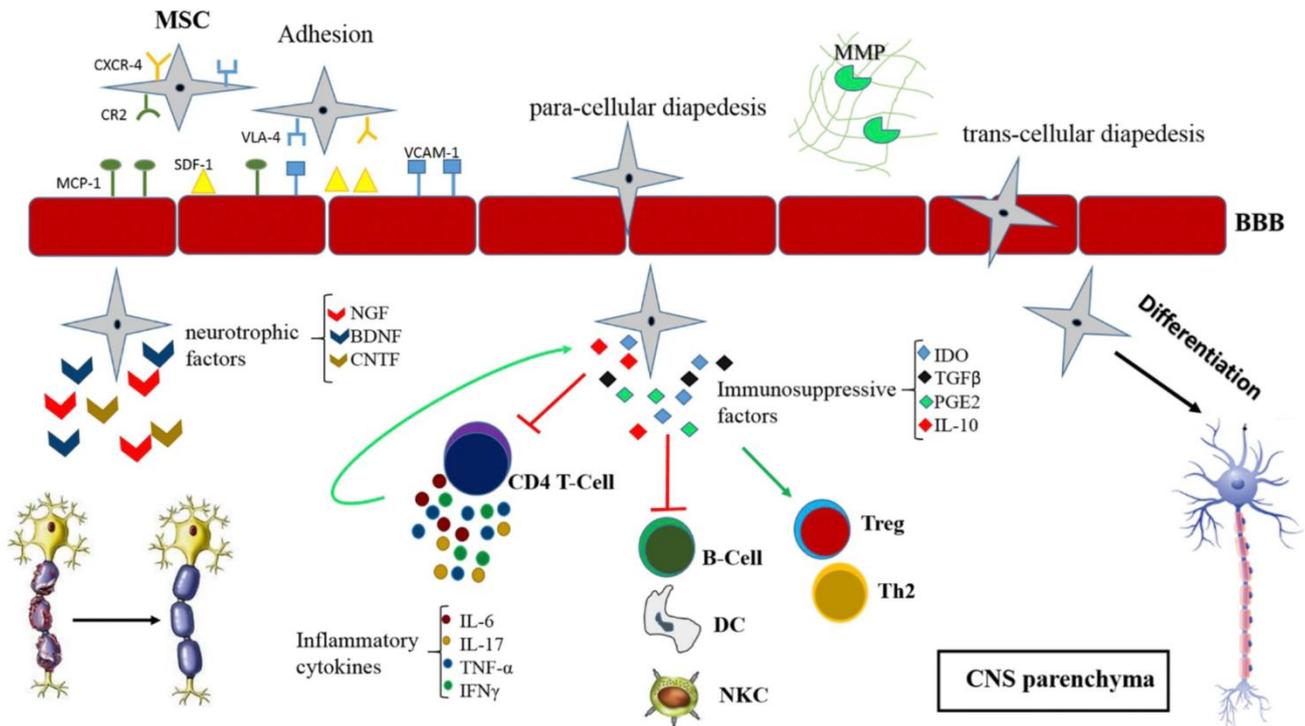


Figure 20 : Mécanismes thérapeutiques des CSM dans la SEP. Les CSM peuvent traverser le BBB (diapédèse transcellulaire et diapédèse paracellulaire) et migrer vers les sites inflammatoires par interaction avec les molécules d'adhésion et leurs récepteurs (CXCR4-SDF1, CR2-MCP-1 et VLA4-VCAM1). Les MMP jouent un rôle important dans la dégradation de la matrice extracellulaire. Les CSM peuvent se différencier en neurones, astrocytes et oligodendrocytes. De plus, les CSM sécrètent des facteurs immunosuppresseurs tels que IDO, TGFβ, PGE2 et IL-10 pour supprimer la prolifération des cellules immunitaires inflammatoires (cellules T CD4, cellules B, DC et NKC), la maturation, l'activation et la sécrétion de cellules inflammatoires cytokines. Les cytokines inflammatoires stimulent les CSM pour qu'elles sécrètent des facteurs immunosuppresseurs. En outre, les MSC augmentent les niveaux de cytokines anti-inflammatoires suivies d'une régulation positive de Treg et Th2. Les MSC libèrent également des facteurs neurotrophiques (NGF, BDNF et CNTF) pour améliorer la survie cellulaire et la fonction neurale [120].

2.12 Physiopathologie de la SEP

2.12.1 La gaine de myéline

La myéline est une structure membranaire multilamellaire hautement spécialisée qui entoure les axones du SN en couches concentriques successives, semblable au papier enroulé en spirale autour d'un tube. Elle est Générée par les cellules de Schwann dans le SNP et les ODs dans le SNC [121]. La membrane de myéline isole les axones et facilite la conduction rapide des potentiels d'action le long des fibres. Contrairement à la plupart des membranes biologiques, la myéline contient une très forte proportion de lipides (70-80% du poids sec) et une faible quantité de protéines (20-30%). Le cholestérol est présent dans un rapport molaire beaucoup plus élevé dans la myéline que dans d'autres tissus du corps [122]. Les principaux composants de protéines de la myéline du SNC sont les protéines basiques de la myéline (MBP), les protéines protéolipidiques (PLP) et les protéines basiques oligodendrocytaire associées à la myéline (MOBP). Il existe d'autres composants comme les glycoprotéines oligodendrocytaire de la myéline (MOG) et les glycoprotéines associées à la myéline (MAG) mais avec des proportions faibles (**Figure 21**).

Le MBP constitue environ 30% des protéines de la myéline. Son poids moléculaire est de 18,5 kDa. Il se localise à la surface intracellulaire de la membrane de myéline et contribue à stabiliser la gaine de myéline. Le MBP est utilisé comme marqueur pour les ODs myélinisés [123]. Les premières études ont profité de sa grande solubilité et de sa facilité de purification. Ainsi, l'injection de MBP ou de peptides contenant des parties de séquence MBP donne lieu à la maladie auto-immune EAE [124]. L'induction d'EAE n'est pas exclusive à MBP.

Un autre composant majeur de la myéline est la **PLP** qui constitue environ 50% de la protéine de myéline totale. Le PLP a un poids moléculaire de 25-30 kDa et se trouve dans le SNC et dans le SNPer. Le PLP est une protéine transmembranaire qui est hautement hydrophobe, rendant souvent difficile les procédures d'immunisation contre l'EAE. Le PLP est encéphalitogène et l'injection de cette protéine provoque une démyélinisation auto-immune chez les rongeurs [124], elle a pour fonction des effets subtils sur le compactage de la myéline et des effets majeurs sur la prolifération, la différenciation et la survie des ODs [125]. Pendant de nombreuses années, la MBP et la PLP étaient les seules protéines utilisées pour induire l'EAE.

Le **MOBP** a été estimé comme le troisième constituant de la myéline le plus abondant du SNC. Il joue un rôle dans le compactage ou la stabilisation de la myéline et module la croissance radiale de l'axone et de la myéline. Le MOBP était situé exclusivement dans les ODs du SNC, alors que le MBP et le PLP apparaissaient à la fois dans le SNC et dans le SNPer [126]. Le MOBP recombinant purifié inoculé à

des souris SJL/J produit une maladie du SNC. Il peut induire une EAE chez la souris et il a été proposé d'avoir un rôle dans la pathogenèse de la SEP [127]. L'évaluation clinique, histologique et immunohistochimique de l'EAE induite par le MOBP n'a révélé aucune différence significative par rapport à un peptide encéphalitogène du PLP. L'EAE induite par le MOBP montre une évolution clinique sévère incluant une grave paralysie des membres postérieurs des souris EAE et se caractérise par une importante infiltration des LT CD₄⁺ et une moindre présence de LT CD₈⁺ et de microglie/macrophages autour des vaisseaux et dans la substance blanche du SNC [127].

Avec des techniques biochimiques et moléculaires plus sophistiquées, il a été possible d'identifier et de purifier les protéines mineures telles que la **MOG** qui a fait l'objet de nombreuses études sur la SEP et l'EAE. Le MOG a un poids moléculaire de 25 kDa et ne représente que 2,5% de la myéline totale de la matière blanche du SNC. MOG est présent sur la surface externe de la gaine de myéline [128]. La fonction de MOG dans le SNC est supposée être une «molécule d'adhésion» assurant l'intégrité structurale de la gaine de myéline. MOG a suscité un intérêt pour les études sur la SEP et l'EAE, car non seulement la protéine est spécifique du SNC, mais elle est également exprimée à la surface des ODs matures et de la myéline, ce qui en fait une cible idéale de la réponse immunitaire. Donc, MOG a été identifié comme un antigène cible dans l'induction de l'EAE [129]. Il s'agit d'un antigène unique pour l'induction de la démyélinisation auto-immune en ce qu'il provoque à la fois une inflammation médiée par les LTs et une démyélinisation.

Une autre protéine d'intérêt dans l'EAE et la SEP est la **MAG**, c'est une protéine glycosylée transmembranaire de type I avec un poids moléculaire de 100 kDa. Elle est présente à la fois dans le SNC et le SNPer. Dans le SNC, MAG est situé sur la membrane interne de la myéline en contact étroit avec l'axone. Compte tenu de sa structure, il a été proposé que MAG agisse comme une molécule d'adhésion et de signalisation entre les ODs/myéline et les axones. Ainsi, elle joue un rôle dans les interactions gliales-axonales. MAG s'est avéré être important pour le maintien du contact entre la myéline et les axones; son absence entraîne une réduction du calibre axonal. Ce peptide soluble se trouve dans le LCR et en quantités accrues dans la myéline de patients atteints de SEP, suggérant une association avec la démyélinisation. Elle est la glycoprotéine la plus importante dans la myéline mais elle ne représente que 1% des protéines totales de myéline [130].

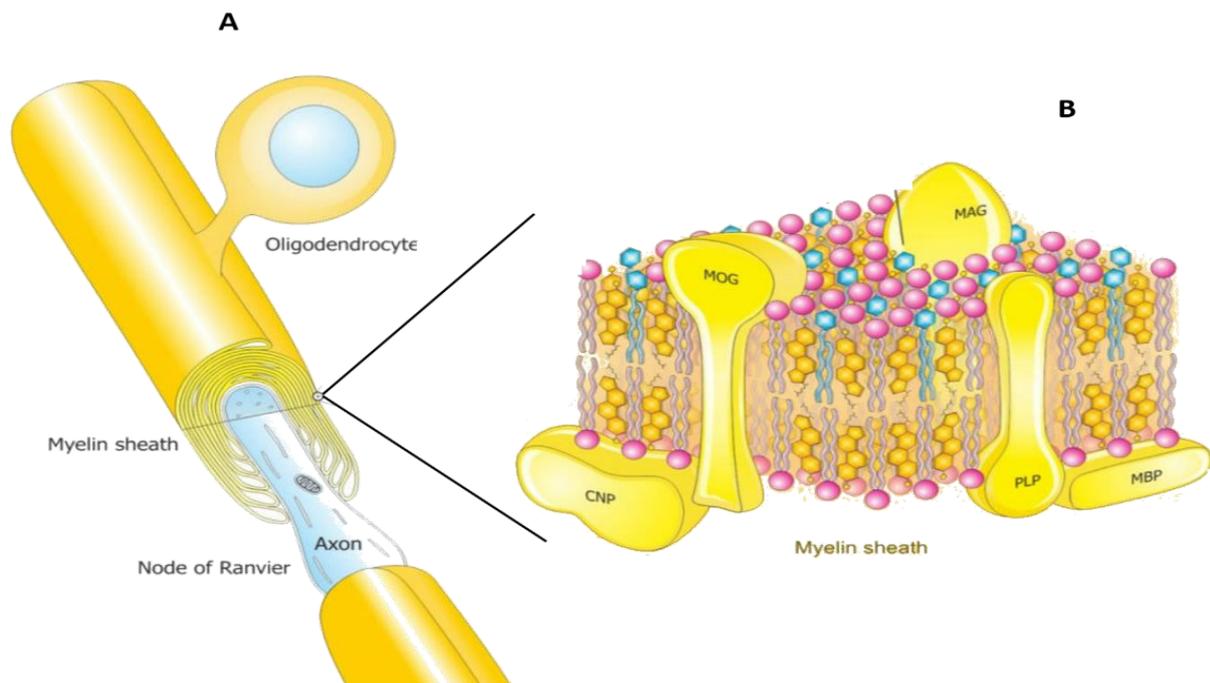


Figure 21 : Les composants de la myéline du SNC: (A) l'architecture; (B) Composition moléculaire 3D. Les protéines sont marquées en jaune et le cholestérol en orange, Adapté et modifié de *Podbielska et al* [131] avec la permission de Future Médecine Ltd. Abréviations supplémentaires: MAG, glycoprotéine associée à la myéline; MBP, protéine basique de la myéline; MOG, glycoprotéine de l'oligodendrocyte de myéline; PLP, protéine protéolipide

2.12.2 Processus de myélinisation

Le processus de myélinisation consiste à la migration des CPOs dans la substance blanche où ils se différencient en ODs matures et commencent à exprimer un sous-ensemble de protéines associées à la myéline. Les stades successifs de maturation des CPOs matures sont identifiés par des marqueurs spécifiques au type de cellule [132] (**Figure 22**). Dans le SNC, un seul OD peut produire jusqu'à 40 segments de myéline sur plusieurs axones. La communication réciproque entre les ODs, les neurones et les astrocytes joue un rôle clé dans la formation de nouvelles gaines de myéline [133].

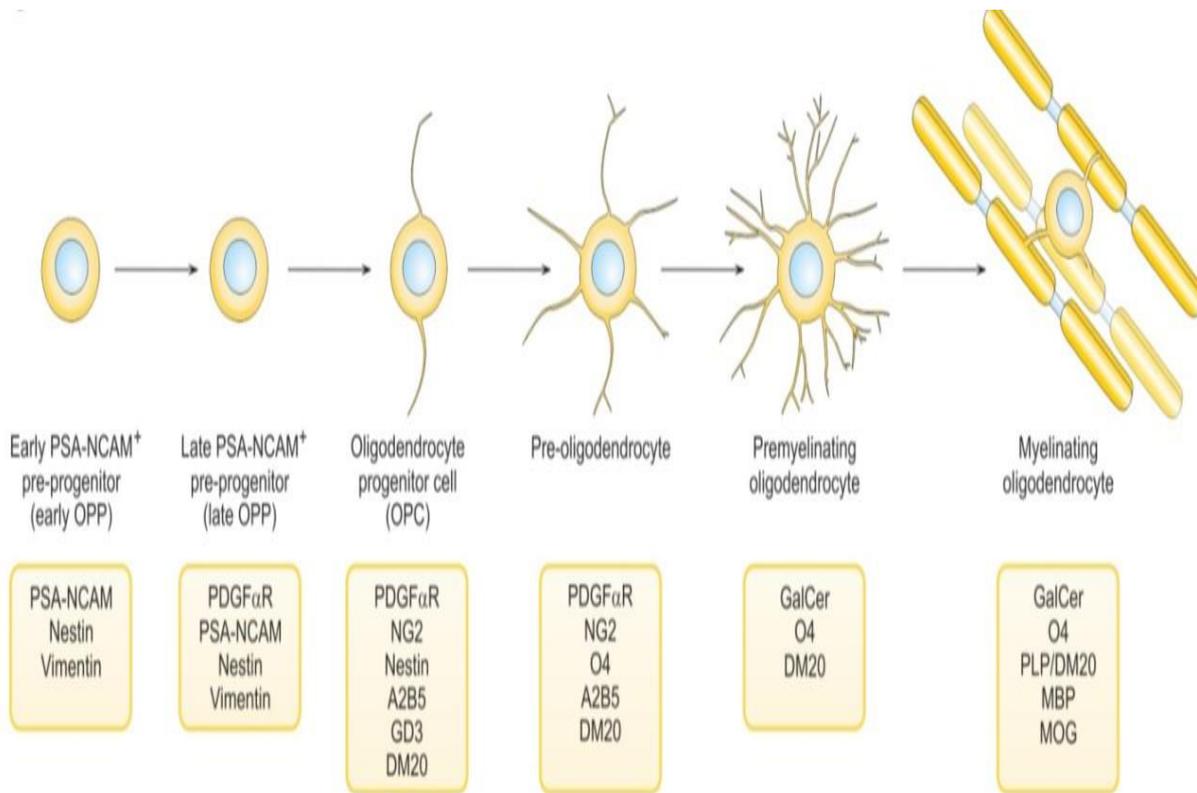


Figure 22 : Stades séquentiels de la maturation des ODs et les marqueurs spécifiques pour la différenciation de chaque lignée. La différenciation des CPOs en ODs matures est associée à l'acquisition des protéines apparentées à la myéline. Les cellules gliales myélinisées, les ODs du SNC forment la gaine de myéline en enveloppant les axones. Les régions axonales myélinisées sont interrompues par des régions non myélinisées (nœuds de Ranvier). D'après [132].

2.12.3 Mécanisme de la démyélinisation

La démyélinisation est l'une des lésions qui caractérisent la SEP. Elle touche la substance blanche, la substance grise et le cortex. Plusieurs acteurs interviennent dans la formation des lésions. Le dogme prévalant a été que les cellules CD₄⁺Th1, Th17 libèrent des cytokines et des médiateurs de l'inflammation qui peuvent causer des lésions tissulaires, bien que les cellules CD₄⁺Th2 puissent être impliquées dans la modulation de ces effets. La démyélinisation inflammatoire dans l'EAE dépend des lymphocytes T CD₄⁺ qui réagissent aux protéines de la myéline, y compris la MBP et la MOG [134]. Néanmoins à côté de cette composante CD₄⁺, des données récentes suggèrent que des sous-ensembles de LT supplémentaires jouent un rôle important dans l'immunopathologie de la SEP: LT CD₈⁺ et LTrég CD₄⁺ CD25⁺. Les LT CD₈⁺ sont des cellules cytotoxiques et sont retrouvés au sein des lésions chroniques de SEP en plus grande proportion que les LT CD₄⁺ qui prédominent dans les lésions aiguës [135]. Dans la SEP, ils induisent des lésions au sein du SNC notamment les lésions axonales. Ces cellules reconnaissent le HLA-I qui est présente à la surface des CPA, or en cas d'inflammation,

les neurones, les astrocytes et les ODs expriment à leur surface le HLA-I qui sera en fait les cibles potentielles pour la lyse par les LT CD₈⁺. Ces derniers s'activent par l'interaction entre le TCR et l'antigène HLA-I porte par la CPA et conduisent à la destruction des cellules cibles selon plusieurs voies:

- **La voie FasL/Fas:** le Fas Ligand qui se trouve à la surface des LT CD₈⁺ interagit avec le récepteur Fas qui se trouve à la membrane des cellules cibles. Cette interaction va induire l'activation d'une cascade de caspases dans la cellule cible et la mener à l'apoptose.

- **La voie perforine/granzyme:** les perforines et les granzymes sortent par exocytose du LT CD₈⁺. La perforine forme des pores au niveau de la membrane de la cellule cible et permet aux granzymes d'y entrer qui va provoquer l'activation d'une cascade de caspases dans les cellules cibles et leur apoptose.

- **La voie TNF- α :** la cytokine TNF- α participe à la lyse des cellules cibles

En outre, d'autres types de cellules contribuent à la pathogenèse de la SEP, les cellules B ou NK ont également été étudiées. Les cellules B qui sont des cellules sécrétrices d'anticorps chez 95% des patients atteints de SEP, on retrouve dans le LCR des anticorps Immunoglobuline G (IgG), cela suggère que le système humoral est impliqué dans la physiopathologie de la SEP [136]. Les traitements utilisés dans la SEP comme le Rituximab qui est un anticorps monoclonal anti-CD20 montrent que les LB ont un rôle important dans la maladie (**Figure 23**).

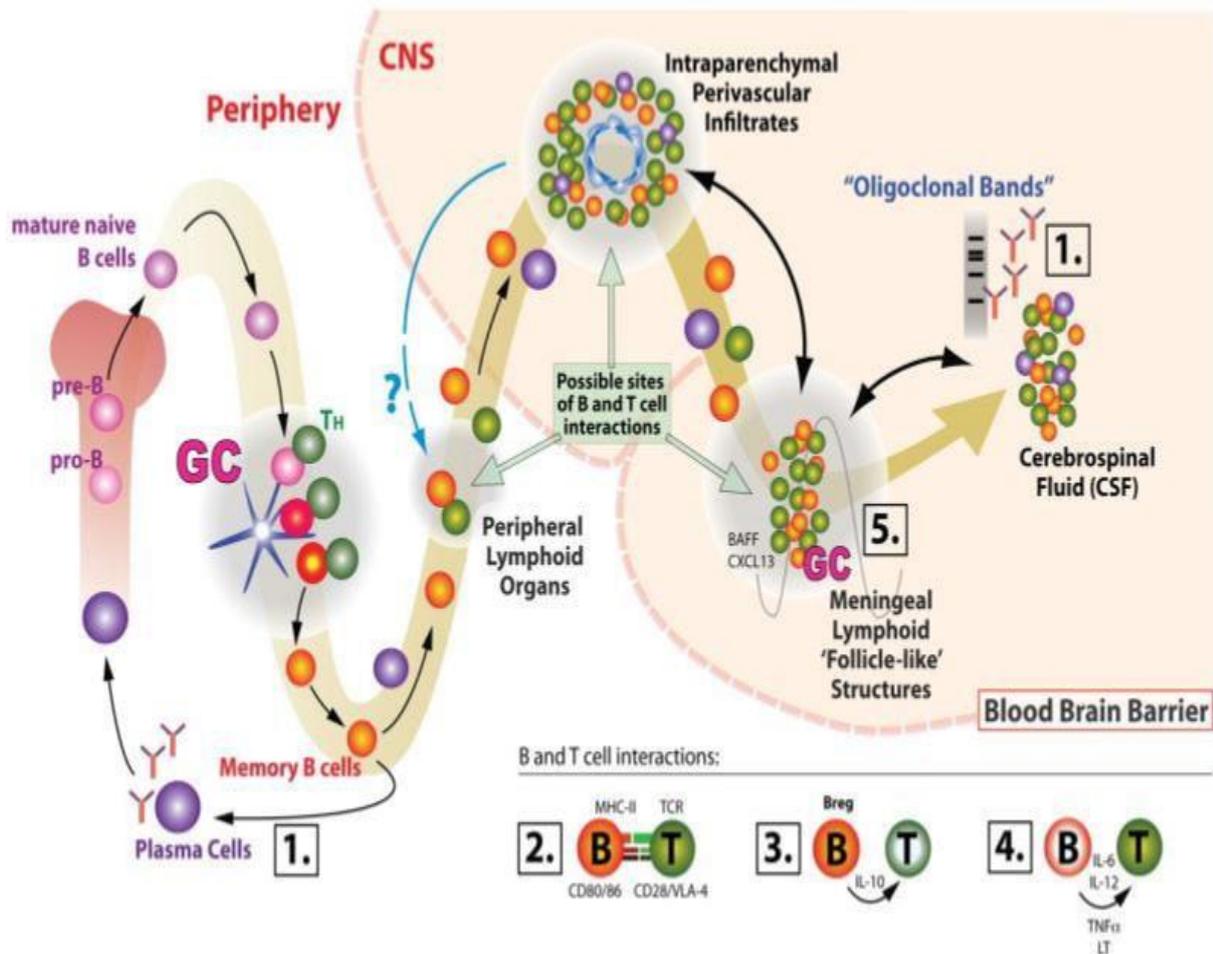


Figure 23 : Développement, migration et le rôle des LBs dans la SEP. Les cellules B sont formées dans la moelle osseuse (MO). Elles quittent la MO pour se diriger vers les OLS où ils subissent la maturation soit elles se différencient en plasmocytes sécrétrices d'anticorps, soit en cellules mémoires. Ces derniers ont la capacité de répondre très rapidement aux pathogènes et peuvent présenter efficacement l'antigène aux LT lors d'une réponse secondaire et se différencier en plasmocytes. Les LBs activent les LTs auto-réactifs qui pénètrent ensuite dans le SNC où on trouve des infiltrats de $LTCD_4^+$, $LTCD_8^+$ et LB. Dans le LCR, on observe des LBs, des plasmocytes qui synthétisent des IgG. D'après [137].

La démyélinisation se déroule en plusieurs étapes :

2.12.3.1 Activation des cellules immunitaires

En périphérie, les Pathogen Associated Molecular Patterns (PAMPs) reconnus comme des «signaux de danger» activent les CPAs notamment les DCs via des récepteurs de type TLR. Après la liaison de l'antigène sur le récepteur, les DCs activées commencent à produire des Interférons de type I (IFN-I). Cette sécrétion permet aux $LTCD_4^+$ d'interagir avec la DC par l'intermédiaire de la molécule HLA-II qui reconnaît le récepteur des LTs (TCR) (signal 1) dans l'OLS. Cependant, l'activation des cellules T nécessite également des signaux supplémentaires. L'interaction

avec HLA et TCR induit l'activation du ligand CD154 se trouvant sur la surface des cellules T, qui se lie à son récepteur CD40 de la DC. Cette interaction induit une surexpression de CD80 et CD86 sur la surface de DC qui interagit avec CD28 et l'antigène 4 des lymphocytes T cytotoxiques (CTLA4) sur la surface des cellules T (Signal 2). CD28 est associé à l'activation des LTs, alors que CTLA4 (CD158) est plus régulatrice [138] **(Figure 23A)**. Après le signal 2, la DC commence à produire des cytokines importantes, qui se lient aux récepteurs sur la surface cellulaire des cellules T et les conduisent à sécréter différentes cytokines. En fonction du signal reçu, le précurseur LT CD4⁺ naïf se différencie selon quatre voies: LTh1, LTh2, LTh17 et iTreg (LTreg induit) [139, 140].

Ces différenciations sont contrôlées par les cytokines produites par les cellules de l'immunité innée, la sécrétion d'IL-10, d'IL-12 et d'IL-4 ou d'une combinaison d'interleukine IL6/ IL-1/ IL-2 favorise la différenciation en Th3, Th1, Th2 et Th17 respectivement [139] **(Figure 24B)**.

L'IL-12 sécrétée par les DCs active les cellules NK qui, une fois activées, produisent l'IFN- γ , ce qui va engendrer avec l'IL-12 la différenciation des LT CD4⁺ en Th1. Les cellules Th1 activées vont alors sécréter une grande quantité d'IFN- γ , d'IL-2 et TNF- α qui sont des cytokines pro-inflammatoires [141]. Des études ont démontré qu'une augmentation de l'activité de la maladie est corrélée à une augmentation d'IFN- γ et d'IL-12 dans le LCR de patients SEP et que l'injection de l'IFN- γ rend la maladie plus agressive [142, 143]. Lors d'une étude sur des souris EAE, il a été démontré que la déficience en IFN- γ ou d'IL-12 ne protège pas ces souris contre l'induction de l'EAE [141].

L'IL-6 produite par les cellules de l'immunité innée, associée au TGF- β , permet la différenciation des LT CD4⁺ en cellules type Th17 qui sécrètent l'IL-17, 21 et 22. *Komiyama et al* ont constaté que les souris déficientes en IL-17 étaient résistantes à l'induction de l'EAE [144]. Il a été aussi démontré une expression des récepteurs IL-17R et IL-22R sur les cellules endothéliales de la BHE et que l'IL-17 et l'IL-22 étaient capables de déstabiliser les jonctions serrées entre les cellules endothéliales de la BHE, in vitro et in vivo [145]. Ainsi, les LTh17 jouent un rôle important dans la physiopathologie de la SEP. Les LT reg sont des cellules qui aident à supprimer l'activité des lymphocytes, soit auto-immune, soit en fin de réaction immunitaire. L'action suppressive des LTreg est médiée par la cytokine anti-inflammatoire IL-10. Il a été démontré que la fonction de Treg est dérégulée chez les patients atteints de SEP. Les LTreg expriment à leur surface des marqueurs extracellulaire CD25 et des facteurs de transcriptions FoxP3. Chez les souris EAE, Treg contrôle la maladie [146].

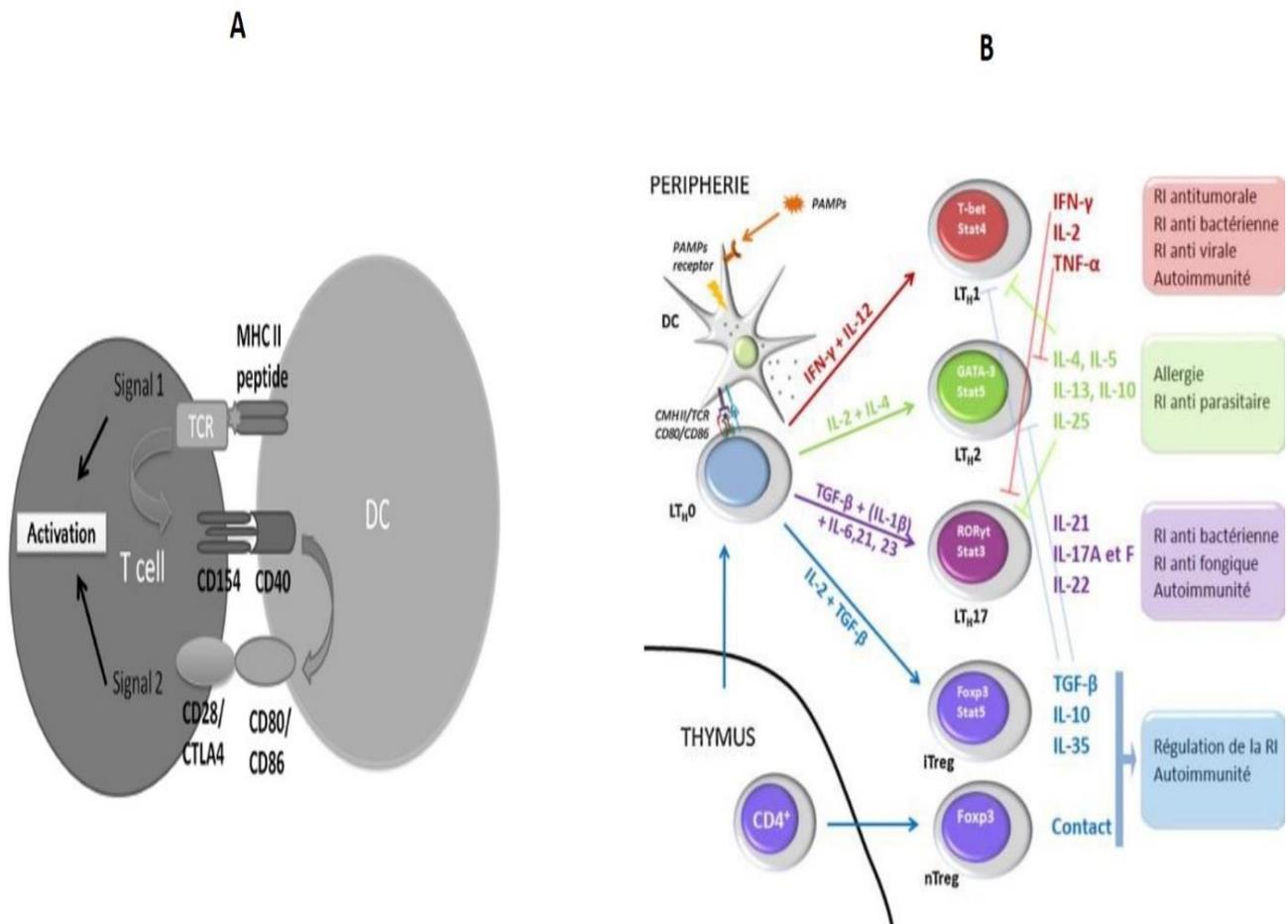


Figure 24: Différenciation des lymphocytes T CD4⁺ naïfs en lymphocytes T helper. A: Après la liaison de l'antigène sur le récepteur, les DC activées commencent à produire des IFN-I. Cette sécrétion permet aux LT CD4⁺ d'interagir avec la DC par l'intermédiaire de la molécule HLA-II qui reconnaît le TCR (signal 1) dans l'OLS. Cependant, l'activation des cellules T nécessite également des signaux supplémentaires. L'interaction avec HLA et TCR induit l'activation du ligand CD154 se trouvant sur la surface des cellules T, qui se lie à son récepteur CD40 de la DC. Cette interaction induit une surexpression de CD80 et CD86 sur la surface de DC qui interagit avec CD28 et l'antigène 4 des lymphocytes T cytotoxiques (CTLA4) sur la surface des cellules T (Signal 2). CD28 est associé à l'activation des LT, alors que CTLA4 (CD158) est plus régulatrice [138]. B: Les PAMPs sont des particules associées à des agents pathogènes reconnus comme des signaux de danger par la DC, présentatrice d'antigène. Une fois les DCs sont activées, le LT CD4⁺ naïf est activée à son tour via la liaison de TCR avec CMH II se trouvant sur les DC. En fonction de la reconnaissance TCR/CMHII-peptide, des molécules de co-stimulation CD80/CD86 et des cytokines sécrétées, le LTCD4⁺ naïf va se différencier en 4 voies: LTh1, LTh2, LTh17 ou iTReg. Ces LTs se différencient par leur facteur de transcription et par les cytokines qu'ils sécrètent et donc par leur action anti-inflammatoire pour LTh2, pro-inflammatoire pour LTh1 et LTh17 et régulatrice pour iTReg. D'après [138, 139].

2.12.3.2 Transmigration des cellules immunitaires vers le SNC

Les LTs activés par voie périphérique pénètrent dans le parenchyme du SNC en traversant la BHE et dans le plexus choroïde en traversant la barrière hémato-céphalorachidien (BCR). Les jonctions serrées entre les cellules endothéliales de la BHE et les cellules épithéliales du BCR limitent l'accès des cellules immunitaires au SNC [147]. Cependant, les cellules T activées et mémoires peuvent migrer dans le SNC, car elles expriment des molécules d'adhésion, des récepteurs de chimiokines et des intégrines qui permettent à ces cellules de franchir facilement ces barrières [148]. Le passage des lymphocytes activés à travers la BHE s'effectue en trois étapes: L'attachement et l'enroulement des leucocytes sur la surface endothéliale vasculaire initient ce processus qui est médié par les sélectines présentes à la fois sur les lymphocytes et les cellules endothéliales et les contre-récepteurs glucidiques. Pendant l'enroulement, les leucocytes interagissent également avec les chimiokines, qui sont produites sur la surface endothéliale. La stimulation des chimiokines induit une régulation positive des molécules d'adhésion de la famille des intégrines tels que LFA-1 (leucocyte function associated antigen-1) et VLA-4 (very late activation antigen-4), qui vont se fixer respectivement à ICAM (intercellular adhesion molecule) et VCAM (vascular cell adhesion molecule) sur la surface des cellules endothéliales et ceci conduit à leur adhérence ferme à l'endothélium vasculaire. Ce processus conduit finalement à la transmigration des leucocytes vers le SNC [149] (**Figure 25**). La surexpression de métalloprotéinase MMP notamment MMP-2 et MMP-9 caractérise la SEP. Ces enzymes clivent les jonctions serrées des cellules endothéliales de la BHE qui facilitera la traversée des LTs à travers la barrière et favorise la dissémination d'autres cellules immunitaires dans le SNC. Elles dégradent aussi la matrice extracellulaire qui permet aux LT de migrer dans la substance blanche [150].

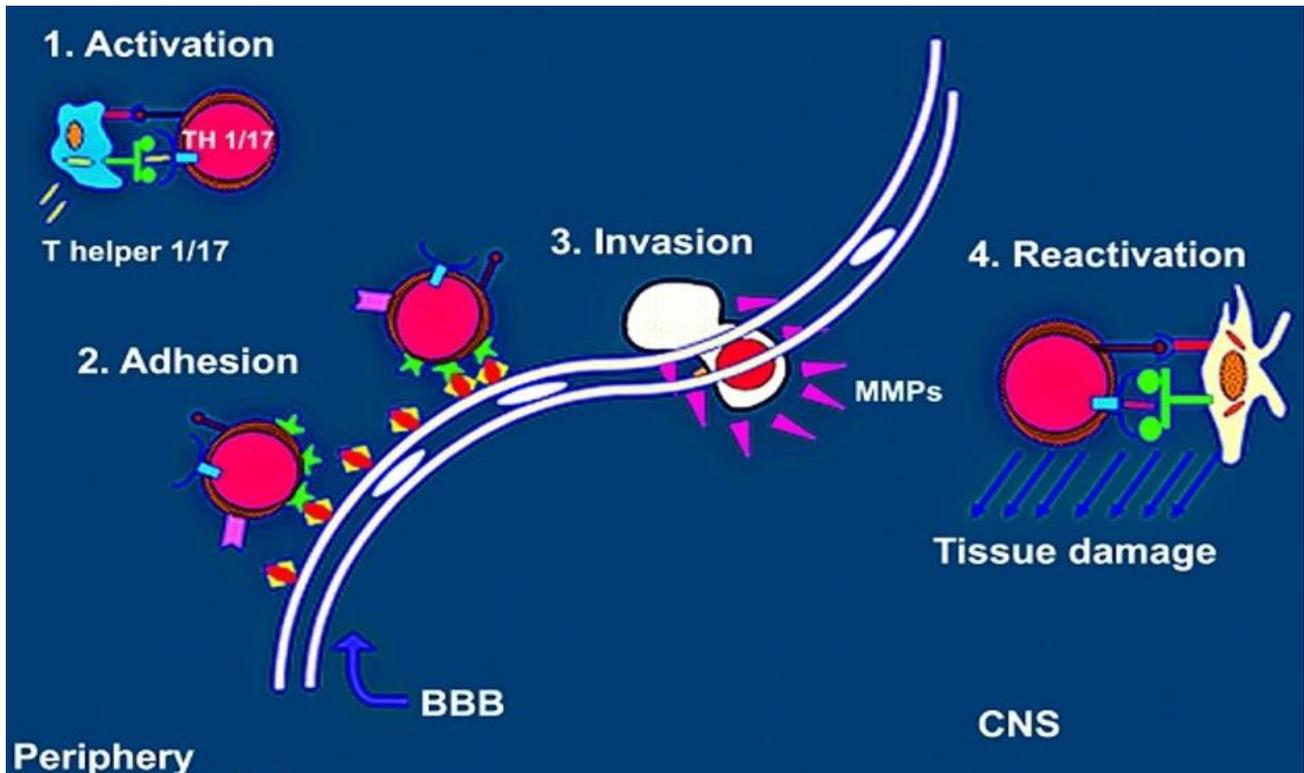


Figure 25 : Passage des lymphocytes activés à travers la BHE. Les lymphocytes T autoréactifs activés expriment sur leur surface des molécules adhésives qui leur permettent de se lier à la BHE. Dans le même temps, les lymphocytes T activés produisent des enzymes métalloprotéinase matricielles (MMP) qui permettent la création d'ouvertures dans la BHE, perturbant ainsi sa semi-perméabilité et permettant par conséquent l'activation des lymphocytes T activés dans le parenchyme cérébral. Lorsque ces lymphocytes dans le SNC rencontrent la protéine basique de la myéline (MBP) présentée par la microglie dans le rôle des cellules présentatrices d'antigène du SNC, les lymphocytes T autoréactifs sont réactivés et initient la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires qui contribuent à une détérioration supplémentaire de la semi-perméabilité de l'EBB et déterminer la formation de lésions inflammatoires [151].

2.12.3.3 Mécanismes des lésions du tissu neural

Dans le SNC, les LTs sont réactivés par les CPA du SNC (macrophages/microglies) ce qui entraîne la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IFN γ). Les macrophages et les microglies jouent un rôle important dans le développement des lésions du SNC. Ils sont activés par les cytokines sécrétées par les LTs. Ils produisent un large éventail de molécules toxiques, telles que des enzymes protéolytiques et lipolytiques tels que MMP, des cytokines cytotoxiques, des excitotoxines et des espèces d'oxygène réactifs (ROS) ou des intermédiaires de NO ce qui entraîne une souffrance axonale et une démyélinisation. Pour la lésion axonale, les ROS et les NO semblent avoir une importance particulière [152]. RANTES et IL-10 sont sécrétées aussi par les cellules microgliales et macrophages, ces molécules permettent l'activation des LTCD $_8^+$ et LB qui

produisent des anticorps dirigés contre la myéline contribuant ainsi à sa destruction (**Figure 26**). Les cellules T sont également essentielles au développement des lésions de la SEP. Les LT CD_4^+ et CD_8^+ peuvent tous deux exprimer des ligands pour les récepteurs de la mort. Parmi ceux-ci, le ligand inducteur de l'apoptose (TRAIL), le ligand Fas (FasL), le $TNF-\alpha$ ont été décrits comme médiateurs des lésions neuronales et des ODs [153]. Les $LTCD_8^+$ sont plus fréquents dans les lésions de la SEP que les $LT CD_4^+$, et les cellules CD_8^+ peuvent reconnaître l'antigène HLA-I présenté sur les neurones et les ODs et tuer les cellules cibles [154]. Les antigènes cibles de la réponse immunitaire humorale dans la SEP sont encore largement inconnus, mais il est suggéré que les cibles primaires des anticorps sont les protéines de la gaine de myéline, comme la MBP, la MOG et la PLP [155]

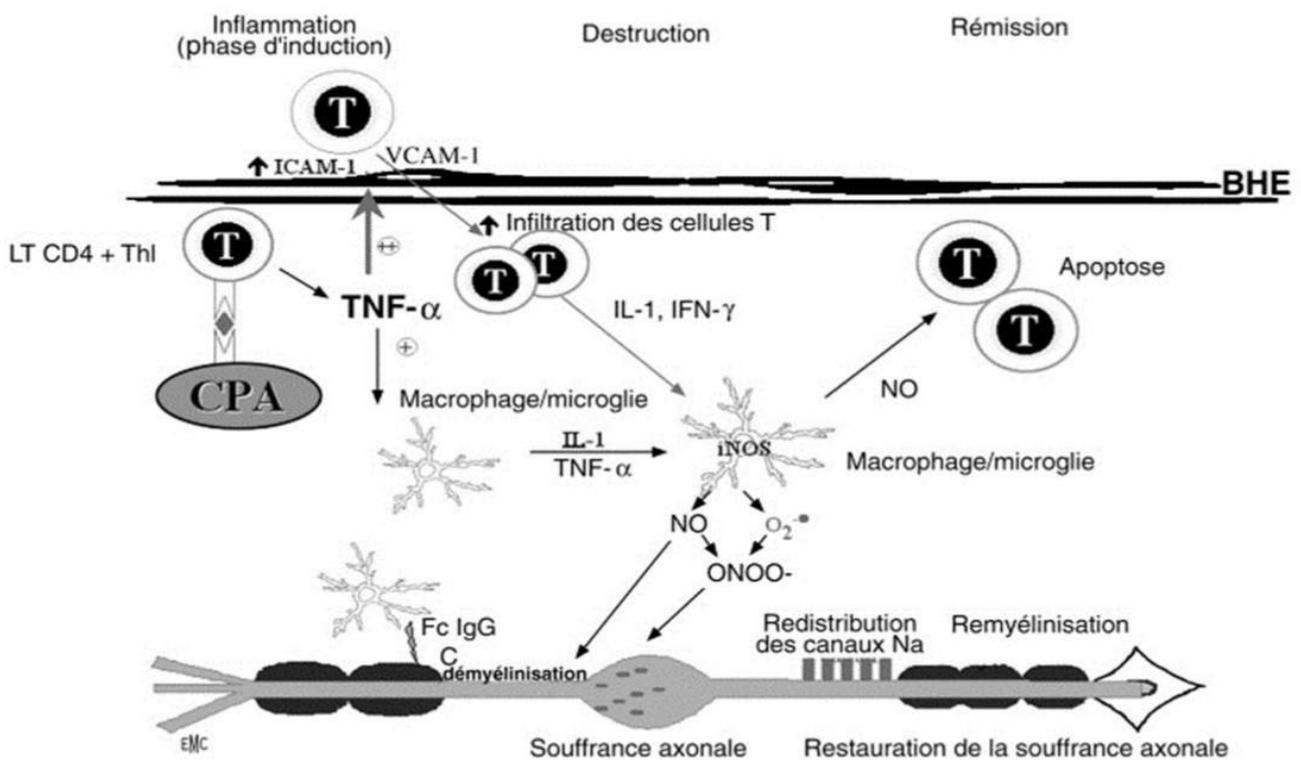


Figure 26: Mécanismes lésionnels du tissu neuronal: Les LT migrent à l'intérieur du cerveau où ils sont réactivés par les CPA du SNC (macrophages, microglie) et sécrètent des cytokines pro-inflammatoire comme le $TNF-\alpha$ et l'IL-1. Ces dernières vont favoriser la surexpression de la forme inducible du nitrique oxyde synthase (iNOS) entraînant la libération de NO et de radicaux libres, ce qui conduit à la démyélinisation. Des mécanismes compensateurs sont instaurées (redistribution des canaux sodiques, remyélinisation spontanée) pour rétablir la conduction nerveuse altérée par la démyélinisation. D'après [95].

2.12.4 Remyélinisation

La démyélinisation altère les neurones et la conduction nerveuse. Pour la restaurer,

deux mécanismes sont mis en place: la redistribution des canaux sodiques et la remyélinisation spontanée.

2.12.4.1 La redistribution des canaux sodiques

Les canaux sodiques se regroupent au niveau du nœud de Ranvier dans les axones myélinisés, l'influx nerveux saute d'un nœud à un autre permettant une conduction saltatoire et rapide. En revanche dans les axones démyélinisés, ces canaux ne sont plus regroupés, ils sont distribués tout au long de l'axone démyélinisés afin de maintenir une conduction lente sur cette partie et cela crée des troubles de conductions (bloc de conduction) (**Figure 26**).

2.12.4.2 La remyélinisation spontanée.

La remyélinisation est un processus qui implique plusieurs étapes et qui est déclenché en réponse à la démyélinisation. Le rétablissement clinique de la maladie est associé à la remyélinisation et à la réparation de l'EAE, comme on l'a observé chez les souris, les rats et les cobayes. Une caractéristique de la remyélinisation est la présence et la division de CPO endogènes identifiées par l'expression de NG2 et la différenciation en ODs matures qui migrent vers les zones démyélinisantes pour myéliniser les axones exposés. La coordination entre différents types de cellules est essentiels pour que le mécanisme de la remyélinisation réussisse [156]. Il a été démontré que les molécules du facteur de croissance telles que le facteur de croissance hépatocytaire (HGF), le facteur de croissance fibroblastique basique (bFGF) et le facteur de croissance endothélial vasculaire A (VEGF) influencent la migration cellulaire et la différenciation des cellules précurseurs in vitro [157]. Chez les souris EAE C57BL/6, le nombre d'OPC diminue ou ne se développe pas en OD matures [158], bien que l'on ne sache pas si cela est la cause ou l'effet d'une maladie chronique. Après la maturation des ODs, le processus de la remyélinisation des axones commence, les ODs matures étendent leur corps cellulaire et initient la synthèse de la membrane de la myéline et ses protéines associées. Plusieurs couches de myéline sont enroulées autour de l'axone jusqu'à ce que la remyélinisation soit complète [159] (**Figure 27**).

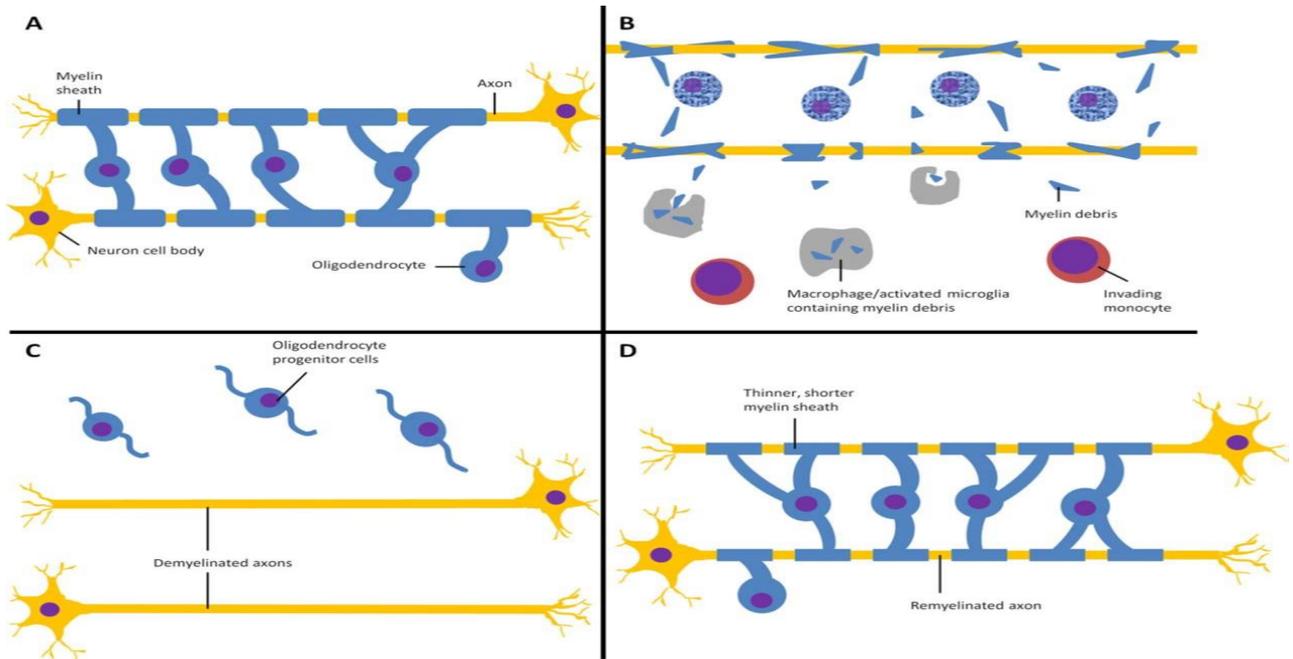


Figure 27 : Changements dynamiques de la myélinisation axonale au cours de la progression de la SEP. A: Neurones dans le SNC avec des axones myélinisés par des ODs. B: destruction immunopathogène de la gaine de myéline et phagocytose des débris de myéline résultants par les macrophages et la microglie activée: CPO migrant vers un site de démyélinisation. D: Les ODs matures remyélinisent les axones exposés. D'après [159].

Chapitre 3 : Les modèles scientifiques

Les approches in vitro et les modèles scientifiques expérimentaux animaux (rongeurs, primates...) sont nécessaires pour n'importe quelle étude, car du point de vue éthique, il est impossible de tester les traitements mis au point sur l'Homme. De plus, même si cette étude sur l'Homme était possible, le volontariat serait peu efficace du fait du nombre peu important de volontaires et des risques encourus, notamment pour les éventuels volontaires sains. Il est donc interdit de transférer des cellules T pathogènes suspectes dans un bénéficiaire humain sain. En effet, les lésions du SNC sont inaccessibles aux chercheurs. Les biopsies ne sont pas recevables que dans de rares cas. Ainsi, la recherche pour la SEP dépend donc, plus que les autres études de pathogénèse sur les droits des modèles animaux appropriés

3.1 Modèles in vitro

Les approches in vitro sont cruciales pour étudier le rôle des cellules du SNC, permettant des manipulations qui ne peuvent être facilement réalisées in vivo.

3.1.1 Culture des microglies

Les microglies, macrophages résidents du SNC, surveillent constamment le parenchyme cérébral et réagissent rapidement aux changements du micro environnement pour défendre le SNC contre les maladies infectieuses, l'inflammation, les traumatismes, l'ischémie, les tumeurs cérébrales et la neurodégénérescence [160]. Les microglies peuvent être isolées chez plusieurs espèces dont les souris [161], les rats [162], les singes rhésus [163] et les humains [164]. La microglie humaine peut être isolée post mortem, à partir de matériel chirurgical ou de cerveau fœtal, ce qui soulève des considérations éthiques. Puisque les microglies primaires tendent à croître lentement et ne prolifèrent pas facilement, des lignées cellulaires de microglies humaines immortalisées ont été créées. Un exemple est la lignée cellulaire HMO6 générée à partir du cerveau fœtal humain en utilisant un vecteur rétroviral codant pour v-myc. Cette lignée cellulaire exprime des antigènes spécifiques des microglies/macrophages et possède également un profil de régulation des gènes de cytokines comparable [165].

3.1.2 Culture des neurones

Plusieurs lignées cellulaires neuronales sont disponibles pour étudier les mécanismes de la lésion axonale dans la SEP. Ainsi, diverses sources de cultures de cellules neuronales primaires sont largement disponibles et comprennent des cultures neuronales primaires

d'hippocampe embryonnaire de rongeur [166], et de cortex [167], ainsi que celles dérivées des cellules souches pluripotentes de rats [168] et de singes rhésus [169]. Compte tenu de la difficulté à générer des cellules primaires à partir de l'être humain, plusieurs lignées cellulaires neuronales ont été générées, bien qu'ils aient aussi leurs limites dans la croissance et l'expression des marqueurs neuronaux matures. Cela peut être surmonté par des stratégies de différenciation. Par exemple, la lignée cellulaire de neuroblastome SH-SY-5Y peut être différenciée en ajoutant de l'acide rétinoïque au milieu [170, 171]. La lignée cellulaire corticale humaine HCN [172] et la lignée cellulaire NT2 [173] peuvent être différenciées en présence de facteur de croissance dérivé du cerveau mais elles ne parviennent pas à exprimer tous les marqueurs cellulaires matures. Un autre inconvénient de la lignée cellulaire HCN est la prolifération lente qui nécessite des facteurs de croissance coûteux.

3.1.3 Culture des ODs

Les ODs sont les cellules formant la myéline, présente dans le SNC sous forme des cellules préprogénitrices, pro-oligodendrocyte immatures, ainsi que les ODs matures formant la myéline. Dans la SEP, le plus important est de maintenir la myéline et la remyélinisation suite à des dommages, donc, le développement de stratégies pour aider la remyélinisation repose sur la manipulation des ODs in vitro. Ces modèles sont également essentiels pour examiner les mécanismes de dégradation des ODs tels que l'apoptose et le stress oxydatif. Les ODs de rongeurs primaires peuvent être maintenus pendant plusieurs semaines in vitro, et les CPOs peuvent être différenciées pour obtenir les différentes étapes de maturation [174]. Une méthode générale pour isoler les ODs repose sur leur capacité à ne pas adhérer aux plaques de culture. En manipulant un flacon de cellules isolées du SNC, les microglies adhérentes et les astrocytes peuvent être séparés des ODs flottant librement [175]. Les ODs primaires humains peuvent être obtenus post mortem. Plus récemment, des progéniteurs d'ODs ont été obtenus à partir de cellules sanguines de cordon ombilical humain différenciées [176]. Pour obtenir un nombre suffisant de cellules, des lignées cellulaires d'ODs ont été créées [177]. Deux exemples communément utilisés sont les lignées cellulaires OLN 93 et Oli-neu. La lignée cellulaire OLN 93 est dérivée de culture primaire de cerveau de rat et peut être différenciée en OD immature dans des conditions de milieu spécifique [178]. En revanche, l'Oli-neu est une cellule précurseur oligodendrogliale de souris qui est mise en culture pour examiner les interactions neurones-glie [179]. Ainsi, plusieurs sources d'OD sont disponibles dont certaines sont capables de se différencier en OD matures formant de la myéline.

3.1.4 Culture des astrocytes

Les cultures primaires d'astrocytes peuvent être obtenues à partir de divers matériaux de départ, notamment le tissu cérébral de souris [180], de rats [175] et humains [181]. Habituellement, des homogénats de cerveau entier de rats ou de souris nouveau-nés sont utilisés. Les astrocytes peuvent jouer un rôle actif au cours de la dégénérescence et de la démyélinisation en contrôlant l'inflammation locale dans le SNC, en provoquant une lésion des ODs et des axones, et une cicatrisation gliale. Ils pourraient également être bénéfiques en créant un environnement permissif pour la remyélinisation et la migration, la prolifération et la différenciation des CPOs [182]. D'autre part, les astrocytes pourraient contribuer à la régénération et à la remyélinisation en sécrétant des facteurs de croissance importants, tels que le facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF), le facteur de croissance insulino-1 (IGF-1) et le facteur de croissance fibroblastique basique (bFGF) [183]. Diverses cellules souches peuvent être différenciées en fonction d'une lignée astrocytaire [184]. Les astrocytes stimulés sont une source pertinente de cytokines pro-inflammatoires telles que IL-1b, IL-6 ou TNF- α [185] mais des résultats contradictoires existent [186]. La pertinence des astrocytes dans la pathologie de la SEP a récemment été examinée [187]. Jusqu'aujourd'hui, la contribution réelle des astrocytes à la SEP reste à clarifier.

3.2 Modèles in Vivo

Il existe plusieurs modèles expérimentaux de démyélinisation qui, dans une certaine mesure, reflètent l'hétérogénéité de la SEP et sont donc considérés comme appropriés pour l'étude de la pathogenèse de la SEP. Ces modèles comprennent des modèles à médiation immunitaire, induits par des virus et induits par des toxines. L'EAE est, de loin, le modèle le plus exploité pour l'étude de divers aspects de l'auto-immunité dans la pathologie de la SEP.

3.2.1 Encéphalomyélite Auto-immune Expérimentale (EAE)

Depuis 1947, lorsque *Walt et ses collègues* ont suggéré que l'EAE est un modèle expérimental approprié pour la SEP, de nombreux projets de recherche ont utilisé ce modèle pour étudier les mécanismes physiopathologiques sous-jacents de la SEP et tester de nouvelles thérapies [188]. L'EAE est caractérisée par une réaction auto-immune contre les protéines de la myéline dans le SNC. Deux protocoles distincts sont utilisés pour induire l'EAE, l'administration de LT actives qui agissent spécifiquement contre les antigènes de la myéline ou, plus fréquemment, l'administration

de peptides dérivés de la myéline, qui à leur tour, provoquent une réaction immunitaire contre des protéines antigéniques spécifiques. Différents types de peptides, tel que la MBP, PLP, MOG, et plusieurs de leurs épitopes encéphalitogène sont utilisés pour induire l'EAE [189].

Les peptides sont généralement administrés par injection sous-cutanée, solubilisés dans une solution adjuvante complète de Freund, qui fonctionne comme un dépôt d'antigènes pour une libération prolongée et continue des peptides actifs. Cependant, en 2002, il a été souligné que cet adjuvant exerce certaines activités inhibitrices sur la pathologie EAE, suggérant qu'il devrait être utilisé avec prudence [190]. Plus récemment, il a été montré que l'EAE peut être induite même sans l'adjuvant de Freund [191]. Trois populations de cellules lymphocytaires médient l'induction des types EAE, Th1 et Th17 des cellules CD_4^+ et des lymphocytes T CD_8^+ , les lymphocytes CD_4^+ étant les principaux médiateurs. Après avoir pénétré dans le SNC, ces cellules ciblent les protéines de la myéline et les ODs matures, provoquant la dégradation de la myéline, les dommages axonaux et l'apoptose des ODs [192]. L'addition de la toxine pertussis au mélange d'injection facilite la migration des lymphocytes à travers la BHE [193]. La migration des lymphocytes T dans le cerveau s'accompagne généralement d'une infiltration et d'une activation des monocytes et/ou macrophages [194]. De plus, la microglie résidente et les astrocytes répondent activement à l'agression et subissent également une activation. Il a été démontré que tous ces types de cellules produisent et libèrent des médiateurs inflammatoires, tels que les chimiokines et les cytokines, contribuant ainsi à l'atteinte axonale et à la démyélinisation [194]. Dans le modèle EAE, le pic de démyélinisation est atteint 10-15 jours après l'injection, principalement confiné à la moelle épinière, bien qu'un certain degré de démyélinisation soit également détecté dans le nerf optique, le cortex cérébral et le cervelet [195, 196]. De plus, les lésions axonales et la paralysie généralisée se développent progressivement avec la démyélinisation [197]. Plus précisément, la paralysie commence à partir de la queue, puis affecte les membres postérieurs, et compromet finalement les membres antérieurs. Les études impliquant l'EAE ont joué un rôle important dans l'identification et la délimitation de plusieurs aspects de la biologie de la SEP: l'inflammation, la surveillance immunitaire et les lésions tissulaires à médiation immunitaire. Ce modèle est donc idéal pour étudier les mécanismes pathologiques sous-jacents à la progression de la maladie et à la neurodégénérescence ainsi que le développement de thérapies pour la neuroprotection. De plus, ce modèle expérimental a directement mené au développement de trois médicaments approuvés pour la SEP, l'acétate de glatiramère, la mitoxantrone et le natalizumab [198]. Le choix des animaux utilisés pour les expériences a une profonde influence sur la susceptibilité à la maladie, la gravité et l'évolution de l'EAE. Il existe différents types d'EAE, chacun affichant certains aspects de la SEP. Le premier choix d'animaux pour l'étude de la SEP était un modèle EAE

généralisé chez le rat. En effet plusieurs souches de rat, y compris Lewis, Dark Agouti (DA) et Brown Norway montrent un taux de reproductibilité élevé dans les caractéristiques fonctionnelles et histopathologies [199].

3.2.1.1 Modèles primates

Considérant la ressemblance génétique et immunologique avec les humains, les primates non humains fournissent des modèles avantageux de la SEP. Les plus employés dans la recherche sont les marmousets communs et les singes rhésus. La caractéristique histologique de ce modèle est la présence d'inflammation et de grandes lésions démyélinisantes conduisant à de graves dommages de la substance blanche, suivie d'une neurodégénérescence, cependant, la moelle épinière n'est pas affectée [200]. Les lésions démyélinisantes de la substance grise ne sont pas présentes dans le modèle de l'EAE rhésus; par conséquent, il ne convient pas à la recherche sur la SEP [201]. Dans ce modèle d'EAE, les changements histologiques observés ressemblent aux formes aiguës de la SEP plutôt qu'aux formes chroniques de la SEP. Le marmoset EAE constitue un bon modèle pour étudier la SEP en raison de la ressemblance des systèmes immunitaires [202]. Le singe rhésus et le marmoset commun sont deux modèles qui nécessitent des adjuvants différents pour l'induction de l'EAE avec une progression divergente de la maladie [203]. Bien que l'évolution de la maladie chez les singes rhésus est plus proche de celle de l'homme que celle des marmousets, les singes rhésus ne présentent qu'une EAE aiguë [204], alors que les marmousets développent une forme rémittente d'EAE [202].

3.2.1.2 Modèle de rat Lewis

Le rat Lewis a été utilisé pour les études EAE depuis les années 1960 [205]. Cette souche est extrêmement sensible à l'EAE, et surtout lorsqu'elle est induite par les antigènes de la myéline du cobaye [206], qui se sont révélés être des encéphalitogènes puissants comparatives aux antigènes de la myéline du rat [205]. En général, parmi les auto-antigènes, les protéines de la myéline telles que la MBP et la MOG se sont révélées être des épitopes encéphalitogènes plus puissants que la protéine protéolipide (PLP), qui n'induit pas d'EAE chez les rats Lewis [207]. De plus, la MBP obtenue chez des sujets humains, de lapin ou bovins s'est révélée inadéquate pour l'induction de l'EAE [208]. Il existe de nombreuses preuves, après immunisation avec des antigènes du SNC mélangés avec du CFA, des rats Lewis développent une forme monophasique aiguë de la maladie [209]. Dans cette souche, après rétablissement spontané, l'EAE ne peut plus être induite [210]. De plus, il n'y a pas de différence entre les sexes pour induire une maladie.

Le travail *pionnier et al* utilisant la MBP de cobaye mélangé avec du l'adjuvant de Freund complet (CFA) et injecté avec la toxine pertussis, induit une EAE aiguë caractérisée par une inflammation massive corrélée avec des signes cliniques [211]. Plus tard, la toxine de pertussis a été exclue des adjuvants utilisés car elle cause la souffrance des animaux. Bien que la démyélinisation ne soit pas une caractéristique importante après l'induction active avec des antigènes de myéline, il a été rapporté qu'une induction avec MOG chez le rat entraîne une perte sévère de la myéline accompagnée de lésions axonales [212]. Au contraire, la sensibilisation avec la MOG à différentes doses d'adjuvant de Freund incomplet (IFA) ne provoque pas d'EAE chez les rats Lewis; cependant, quand il est injecté avec des cytokines pro-inflammatoires [213] ou un facteur de croissance, tel que VEGF [214], les rats ont montré un très reproductible démyélinisation inflammatoire, même dans la substance grise, où des lésions corticales EAE ont été observées [215]. En outre, la PLP/CFA induit une démyélinisation inflammatoire, principalement dans la moelle épinière, [216]. Une démyélinisation sévère avec inflammation à travers le SNC, avec des résultats fonctionnels minimaux, a été observée dans l'EAE passive, avec un transfert adoptif de cellules T spécifiques de S100b [217].

3.2.1.3 Modèles de souris

Bien que l'immunisation des rats sensibles n'ait pas besoin de la toxine pertussis pour l'amplification de la réponse immunitaire, les souris sont plus souvent utilisées dans les expériences d'EAE, car Les souris sont moins chères à maintenir et sont faciles à manipuler génétiquement [218], les modèles transgéniques et knock-out sont largement utilisés [219]. Pour le développement actif de la maladie EAE, les souris doivent être induites avec CFA et la toxine pertussis. Les souris diffèrent par leur sensibilité aux antigènes spécifiques. Il existe trois modèles de souris utilisés dans les expériences d'EAE: des modèles de souris SJL/J, des souris transgéniques et des souris C57BL/6.

i Modèle de souris SJL/J

Zamvil et ses collaborateurs [220] étaient capables d'induire l'EAE chez des souris SJL/J en utilisant à la fois des peptides dérivés de MBP et des clones de LT réactifs à la MBP. La souris SJL/J est sensible à l'immunisation par PLP, MOG et MBP [218, 221]. La souris SJL/J est le modèle de souris le plus fiable et reproductible pour l'induction EAE [222] où la maladie peut être induite avec certains antigènes de myéline (PLP) sans toxine pertussis [218]. Cette souche est utile dans l'étude de la démyélinisation médiée par les LTs, ainsi que l'évaluation des causes par les macrophages qui contrôlent les derniers stades de la maladie chronique. Elle représente la forme

SEP-RR de la maladie. Les jeunes souris SJL/J mâles immunisées avec PLP sont relativement résistantes à l'EAE, alors que les souris SJL/j mâles et femelles plus âgées sont plus sensibles et développent des lésions de démyélinisation[223]. En outre, l'EAE passive peut également être induite chez les souris SJL/J, il est accompli par un transfert adoptif de lymphocytes actifs par la myéline à partir de souris immunisées avec ces antigènes encéphalitogènes de la myéline. Les cellules T provenant de souris SJL/J sont plus encéphalitogènes que celles provenant d'autres modèles.

ii Souris transgéniques

Des souris transgéniques qui ont des récepteurs de cellules T (TCR) spécifiques pour la MBP ont été les premières à être générées, et il a été montré qu'elles développaient une maladie paralytique spontanée chez les souris PL/J et B10 PL [224]. Betteli et ses collaborateurs ont généré un modèle transgénique TCR de classe II pour étudier l'EAE chez la souris B6 en l'induisant par MOG₃₅₋₅₅ [225]. Un autre modèle de souris transgénique utilisé était une souche de souris Knock-in de cellules B (IgH MOG, également connu sous le nom TH) qui contient une fréquence élevée de cellules B sécrétrices d'anticorps anti-MOG dans le répertoire périphérique. Lors d'une immunisation active avec des MOG₃₅₋₅₅, ce modèle animal développe une EAE avec des lésions inflammatoires typiques, a une fréquence plus élevée que leurs homologues non transgéniques [226] (**Tableau 1**). Cependant, il présente certains inconvénients tels que l'hétérogénéité clonale des populations de cellules T et la génération, après immunisation, de plusieurs lignées de lymphocytes T auxiliaires (T helper) sans possibilité de délimiter un sous-ensemble de cellules T spécifique.

Plus récemment, Jager et ses collaborateurs ont développé un modèle permettant la génération de différents sous-ensembles T auxiliaires pour induire l'EAE [227]. Dans ce modèle, les cellules T CD₄⁺ isolées ont été stimulées en utilisant des anticorps contre CD3 et CD28, cultivées avec diverses combinaisons de cytokines pour générer des sous-groupes Th1, Th2, Th17 et Th9 qui ont ensuite été transférés à des animaux hôtes naïfs. Ces dernières expériences ont en outre permis de délimiter le rôle central des sous-ensembles Th1/Th17 dans la pathogénèse de la maladie.

De plus, Anderson et ses collaborateurs ont créé un modèle de souris transgénique TCR CD₄⁺ en utilisant MOG₃₅₋₅₅ pour induire l'EAE chez des souris non obèses diabétiques NOD qui affichait à la fois les cellules T CD₄⁺ et CD₈⁺ MOG₃₅₋₅₅ réactives. Chez ce modèle, les LT CD₈⁺ seuls peuvent induire une névrite optique et une EAE légère avec un début retardé, tandis que les LT CD₄⁺ seuls étaient capables d'induire une EAE sévère et prédominaient dans les lésions lorsque les deux types cellulaires étaient présents, soutenant ainsi le rôle central des LT CD₄⁺ dans la pathogénèse de la maladie [228].

Le développement de modèles de souris transgéniques TCR au cours des 20 dernières années a largement aidé l'étude des réponses des LT spécifiques à l'antigène.

iii Modèle de souris C57BL/6

MOG₃₅₋₅₅ est exprimé à des niveaux relativement bas sur la surface des gaines de myéline; cependant, il s'avère être encéphalitogène chez les souris C57BL/6 [189]. L'administration de la toxine *pertussis* est nécessaire pour l'induction de la maladie avec MOG₃₅₋₅₅/CFA chez la souris C57BL/6, qui développent une maladie EAE de nature chronique [229]. L'évolution de la maladie dépend de la quantité de *Mycobacterium tuberculosis* dans le CFA [222] et aussi de la toxine *pertussis* [219]. L'EAE passive peut également être induite chez la souris C57BL/6. Les jeunes souris C57BL/6 développent une forme monophasique aiguë de l'EAE, tandis que les mâles d'âge moyen développent une EAE chronique sévère [230].

Bien que plusieurs peptides pourraient induire une réponse ex vivo des cellules T, seul MOG₃₅₋₅₅ était capable d'induire directement l'auto-immunité du SNC, et l'administration concomitante de la toxine pertussique (TP) a été en mesure d'améliorer l'apparition et la gravité de la maladie. Cependant, Bérard et ses collaborateurs [231] ont rapporté que la dose élevée de peptide et d'adjuvant induit une EAE chronique non-rémittente chez les souris C57BL6/J, tandis que des doses plus faibles de peptide/adjuvant pourraient favoriser une évolution RR, suggérant ainsi le dosage des peptides est essentiel pour le type de maladie développé lors de l'immunisation par MOG₃₅₋₅₅. L'EAE immunisé par MOG₃₅₋₅₅ a permis d'obtenir un nombre croissant de preuves sur le rôle du système immunitaire en particulier les LBs [232], les monocytes [233], les LTCD₈⁺ [234] et les cellules T CD₄⁺ [235] dans la pathogenèse de l'EAE et la SEP.

3.2.2 Modèle de démyélinisation induite par la cuprizone.

Ce modèle est basé sur l'administration à des animaux de laboratoire de molécules bioactives tel que la cuprizone qui cible spécifiquement les ODs provoquant leur dégénérescence, conduisant finalement à une démyélinisation sévère dans le cerveau [236]. La cuprizone, bis-cyclohexanone oxaldihydrazone, est un agent chélateur du cuivre neurotoxique. Il est aujourd'hui utilisé principalement chez la souris. Ses effets délétères sur le cerveau des rongeurs ont été découverts par le travail pionnier de Carlton en 1966 [237]. Il a été suggéré que les rats ne développent pas de démyélinisation avec la cuprizone aussi régulièrement et de manière reproductible que les souris [238]. Cependant, des études récentes montrent que les rats Wistar, en réponse à la cuprizone, développent une démyélinisation généralisée du cortex, du corps calleux et

du cervelet [239] suggérant que les rats, comme les souris, conviennent aux études longitudinales. C57BL/6 est la souche de souris la plus largement utilisée pour l'induction de la SEP à médiation par la cuprizone. Dans cette souche, une dose minimale du composé est suffisante pour provoquer une pathologie cérébrale hautement reproductible avec des effets secondaires périphériques limités, tels qu'une perte de poids et une toxicité hépatique. La cuprizone est administrée par voie orale pendant 5-6 semaines à des souris C57BL/6 âgées de 8-10 semaines [240]. Ce processus de démyélinisation est caractérisé par une apoptose sélective et progressive des ODs matures, une pathologie axonale, l'activation des astrocytes et des microglies, l'infiltration des macrophages [241]. L'inflammation est caractérisée par la production de cytokines, d'interleukines, de TNF- α et d'enzyme métabolisant l'acide arachidonique (AA), et par la production consécutive de lipoxines, de thromboxane et de prostaglandines pro-inflammatoires qui jouent un rôle actif dans la sévérité de la démyélinisation [242, 243]. Une BHE intacte, sans signe d'infiltration lymphocytaire, a été observée dans le modèle cuprizone [244]. L'interruption de l'alimentation en cuprizone après 6 semaines d'intoxication continue, immédiatement après le pic de démyélinisation, permet une remyélinisation spontanée. Ces modèles sont indispensables pour étudier les processus de remyélinisation chez l'animal [245]. De plus, ces modèles assurent une bonne reproductibilité et une localisation anatomique bien définie de la zone de démyélinisation. Cependant, il n'y a pas d'activité immunitaire dans ce modèle (**Figure 28**).

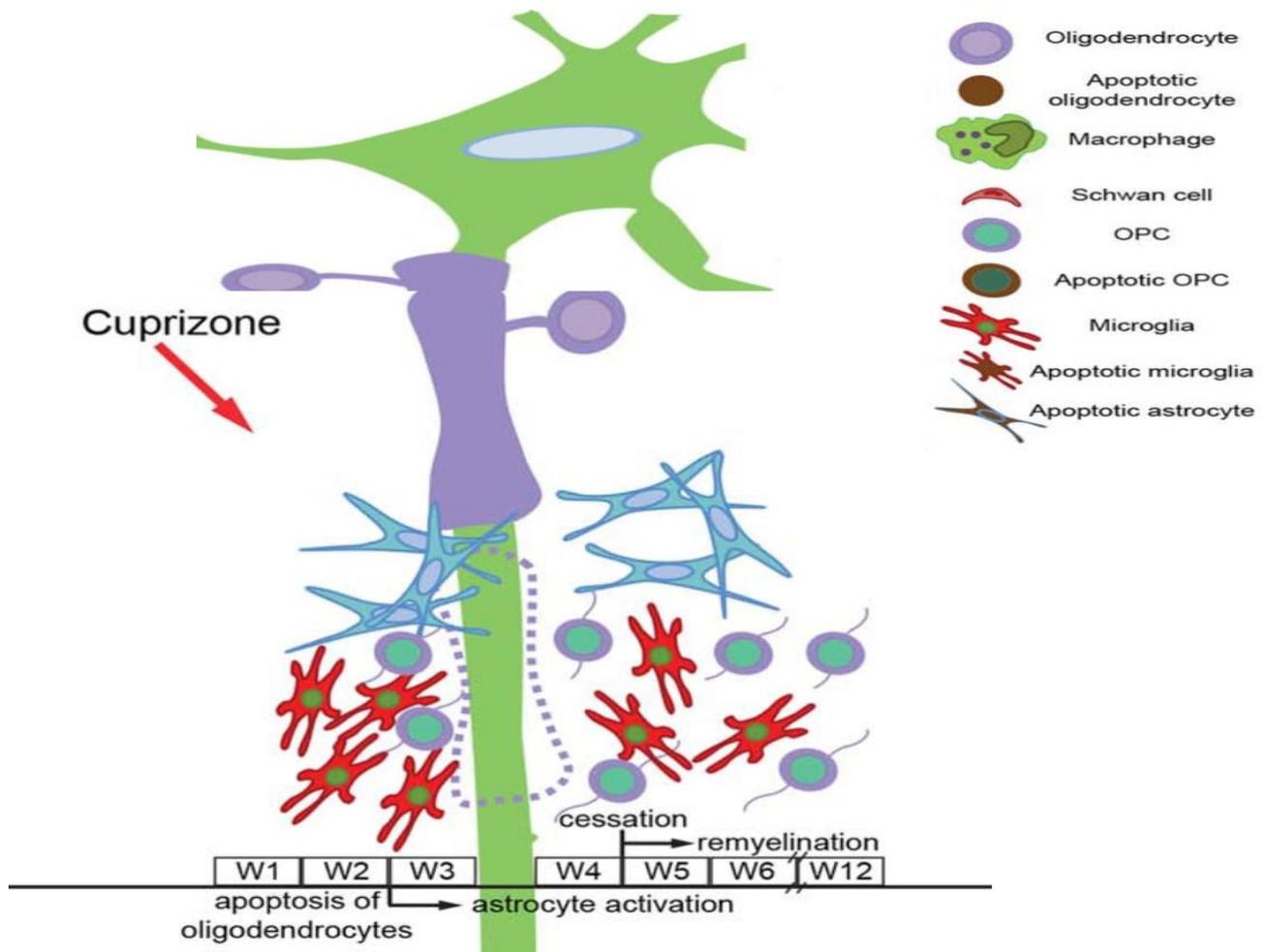


Figure 28 : Représentation schématique des modèles de démyélinisation induits par la cuprizone. L'intoxication par la cuprizone conduit à l'apoptose des ODs. L'activation de la microglie commence 2 semaines après le traitement par cuprizone et diminue progressivement avec le processus de remyélinisation. L'activation des astrocytes persiste tout au long de la maladie. La remyélinisation spontanée survient après l'arrêt de l'intoxication par la cuprizone. D'après [246]

3.2.3 Modèle de démyélinisation induite par le virus de l'encéphalomyélite murine de Theiler (TMEV)

Compte tenu de la pertinence des facteurs infectieux contribuant à la SEP, le virus jouent un rôle dans l'initiation et la progression de cette maladie [247]. Le virus TMEV a été découvert par Max Theiler qui l'a isolé du SNC de souris spontanément paralysées [248] et établie plus tard comme un modèle d'infection virale neurotrope de la SEP par Lipton et a été largement utilisée [249]. Ce modèle est induit seulement chez la souris. À l'exception des preuves publiées en 2005, les rats ne semblent pas développer de démyélinisation cérébrale [250]. Chez la souris, la susceptibilité au TMEV est modulée par des facteurs génétiques. Plusieurs locus polymorphes de susceptibilité ont été identifiés dans le génome de la souris au sein des principaux gènes du complexe d'histocompatibilité

(CMH) et du gène codant pour la chaîne bêta du récepteur des LTs. Ces locus modulent la sévérité de l'infection à TMEV et la durée de la persistance virale dans le cerveau [251]. Deux types principaux de TMEV sont connus, le premier est très agressif et provoque une neuropathologie extrêmement sévère entraînant la mort en 1 semaine (induite par GDVII et la souches FA de TV), l'autre est moins agressif et non mortel (induit par les souches DA et BeAn) [252]. Le résultat clinique des animaux infectés dépend des souches de souris. Par conséquent, il a été suggéré que les souches de souris SJL/J, DBA/1 et 2, SWR, PL/J et NZW sont très sensibles, alors que C3H, CBA, AKR et C57BL/6J, C57BL/10 et C57/L sont résistants à l'inoculation intracérébrale de TMEV [253]. En général, l'infection à TMEV de souches sensibles entraîne la maladie du SNC, qui comprend une phase aiguë précoce de la maladie qui apparaît 3 à 12 jours après l'infection et une maladie démyélinisante chronique tardive qui commence 30 à 40 jours après l'infection primaire [254]. Pendant la phase aiguë, les dommages axonaux précède la démyélinisation, ce modèle de démyélinisation à l'envers est une caractéristique qui a également été observée durant la phase chronique de la maladie [255]. Il a été proposé que la lésion axonale provoque le système immunitaire à recruter des médiateurs pro-inflammatoires qui génèrent la perte de myéline (Figure 28). La phase chronique est caractérisée par une démyélinisation inflammatoire comprenant des cellules T et des monocytes/macrophages, ainsi qu'une prolifération microgliale dans le tronc et le thalamus et une inflammation périvasculaire dans la moelle épinière associée à des déficits fonctionnels, tels que l'ataxie et le paralysie spastique [256]. Plus tard, pendant les stades progressifs de la phase chronique de la maladie, dans les zones de démyélinisation, on peut trouver des gonflements axonaux [257]. La souche C57BL/6J de souris développe la maladie aiguë précoce, associée à une réaction immunitaire plus rapide et plus forte, ce qui est considéré comme crucial pour l'élimination complète du virus et la résistance à la démyélinisation [258]. Les similitudes entre ce modèle et la SEP peuvent être observées, bien que les rechutes manquent dans TMEV. Le piège de ce modèle est que les expériences prennent du temps et que la démyélinisation et la remyélinisation surviennent simultanément. La TMEV ne provoque pas de pathologie chez les humains et il peut induire une maladie démyélinisante inflammatoire uniquement chez la souris. Cet aspect a soulevé la question de savoir s'il est rationnel ou non d'utiliser un agent pathogène non humain pour caractériser une maladie humaine, telle que la SEP (**Figure 29**).

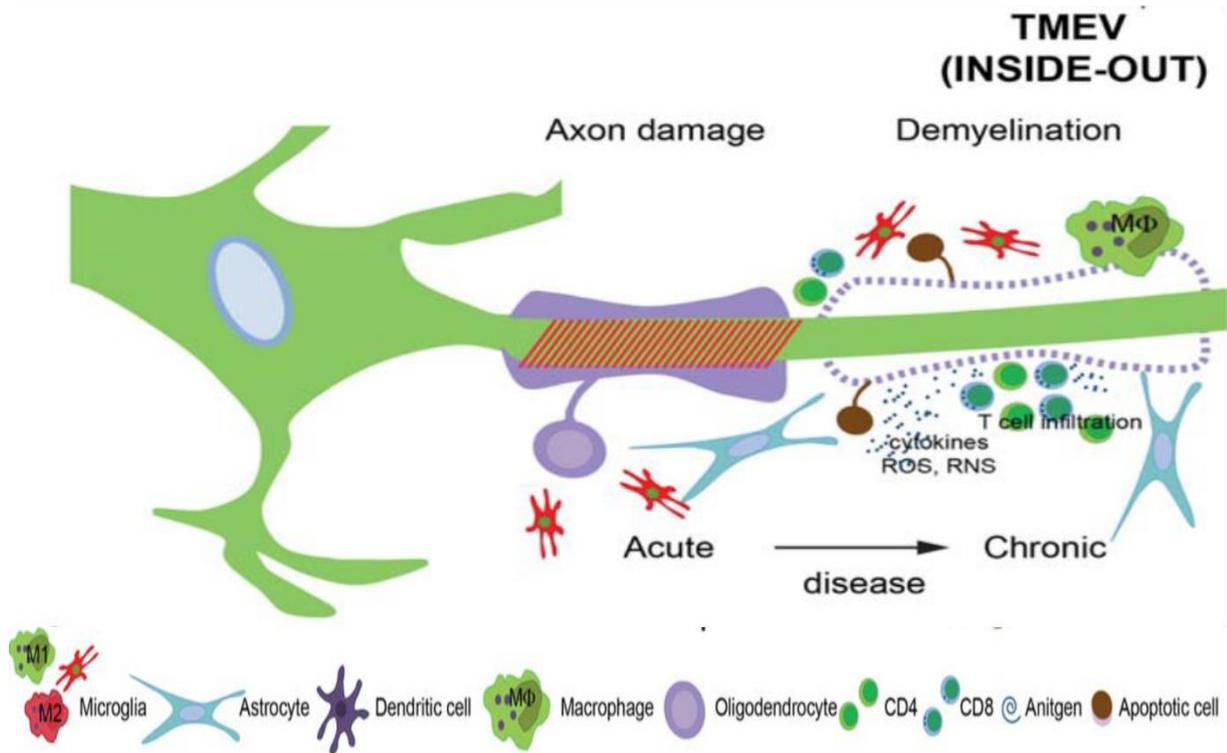


Figure 29: Aperçu schématique de la démyélinisation induite par le virus. L'infection à TMEV induit des lésions axonales qui précèdent la démyélinisation; ce modèle de démyélinisation à l'envers est une caractéristique qui a également été observée pendant la phase chronique de la maladie. Les dommages axonaux recrutent des cellules immunitaires qui sécrètent des médiateurs pro-inflammatoires pour générer la démyélinisation. D'après [246]

Tableau 1 : Caractéristique des différents modèles in vivo de la SEP

Modèle in vivo	Mécanisme	Application	Cellules impliquées	Valeur translationnelle	Réf.
SJL/J	Immunsation avec PLP ₁₃₉₋₁₅₁	Étude de la neuro inflammation et de l'activation du système immunitaire	CD8, CD4, Th17, monocytes, macrophage B cells, Treg cells	SEP récurrente-rémittente, étude du taux de rechute, testant des agents thérapeutiques	[224, 259, 260]
C57BL/6J	Immunsation avec MOG ₃₅₋₅₅			SEP progressive primaire, SEP progressive secondaire, testant des agents thérapeutiques	[231, 233]
Souris transgénique	Clone de lymphocyte T (2D2) réagit spécifiquement à MOG ₃₅₋₅₅ , ou souche de souris knock-in de chaîne lourde de cellules B (IgH MOG)			Étude in vitro de l'activation et de la fonction des cellules immunitaires	[227, 228]
TMEV	Infection par TMEV	Étude des lésions axonales et de la démyélinisation induite par l'inflammation	Macrophage/ microglie, oligodendrocyte, astrocytes and CD4, CD8	SEP progressive primaire, étude des lésions cérébrales, du tronc cérébral et de la moelle épinière, étude de nouvelles approches thérapeutiques ciblant les molécules d'adhésion, dégénérescence axonale	[261, 262]
cuprizone	Alimentation de C57BL / 6J avec 0,2% cuprizone pendant 6 semaines	Étude du processus de la dé et remyélinisation	Oligodendrocyte, astrocytes, microglie	Essais thérapeutiques conçus pour réprimer la démyélinisation ou accélérer la remyélinisation	[245]
lysolécithine	Injection de lysolécithine aux souris SJL/J				[263]

3.3 Signes et scores cliniques de la maladie

L'EAE chez la souris est caractérisée par une paralysie ascendante débutant à la queue [264], suivie d'une paralysie des membres postérieurs et des membres antérieurs, évaluée à l'aide d'une échelle de 5 points [265]. L'évolution de la maladie de l'EAE dépend du protocole d'immunisation, de la souche animale et de l'espèce. Les premiers signes de maladie neurologique dans l'EAE monophasique aiguë sont généralement observés entre 10 et 17 jours après l'immunisation. Le transfert adoptif de LT encéphalitogènes induit la maladie un peu plus tôt que la maladie active, c'est-à-dire 5-7 jours après le transfert cellulaire. Les signes cliniques de la maladie sont enregistrés sur une échelle de 0 à 5 (**Tableau 2**). En plus des signes typiques d'EAE, la maladie neurologique peut être détectée en surveillant le dysfonctionnement de la vessie, ainsi que les changements de comportement. Avant le début de l'EAE, des changements de poids sont observés et peuvent être utiles, mais pas cohérents, pour prédire l'apparition [266]

Tableau 2 : scores cliniques

Score EAE	Déficit neurologique
0	En bonne santé
0.5	Paralysie partielle de la queue
1	Paralysie complète de la queue ou queue molle
1.5	Paralysie complète de la queue et paralysie partielle d'un membre postérieur
2	Paralysie complète de la queue et paralysie partielle des deux membres postérieurs
2.5	Paralysie partielle d'un membre postérieur et paralysie complète d'un membre postérieur
3	Paralysie complète des deux membres postérieurs sans faiblesse des membres antérieurs
4	Paralysie complète des membres antérieurs
5	Mort

Chapitre 4 : La mélatonine

La mélatonine ou N-acétyl-5-méthoxytryptamine (**Figure 30**) est une hormone hautement lipophile sécrétée pendant la nuit par la glande pinéale (également appelée épiphyse) qui est composée de deux types de cellules: les pinéalocytes (qui produisent principalement de la mélatonine) et les cellules neurogliales [267]. Il est à noter que la glande pinéale n'est pas le seul site de synthèse de la mélatonine, elle peut être synthétisée par d'autres organes et tissus comme les globules rouges, le tractus gastro-intestinal, la rétine ou les plaquettes [268]. L'existence de la mélatonine a été suspectée pour la première fois en 1917 dans des expériences montrant que les mélanocytes de grenouille deviennent plus légers lorsqu'ils sont exposés aux extraits pinéaux, et il a été formellement démontré en 1958 par *Lerner et al* [269]. La mélatonine joue un rôle important dans la régulation du rythme circadien, du sommeil et de l'humeur, mais des preuves supplémentaires soutiennent son rôle dans l'immunomodulation, la reproduction, la croissance tumorale et le vieillissement [270]. Généralement, on suppose que dans ces tissus, la mélatonine produite a une fonction locale et ne contribue pas à la mélatonine circulante dans une large mesure

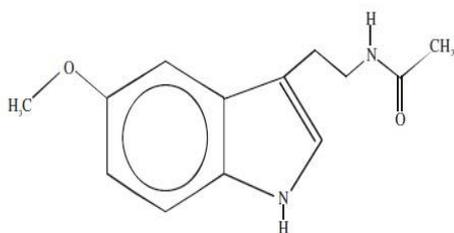


Figure 30 : structure de la mélatonine [271]

4.1 Biosynthèse de la mélatonine

Chez tous les mammifères, la synthèse de la mélatonine se fait dans les pinéalocytes à partir de L-tryptophane qui est d'abord converti en 5-hydroxytryptophane (5-HTP) par l'enzyme tryptophane hydroxylase mitochondriale avant d'être décarboxylé par un acide aminé décarboxylase, conduisant ainsi à la 5-hydroxytryptamine (5-HT ou sérotonine). La concentration en sérotonine reste élevée pendant la journée avant de diminuer dès le début de l'obscurité. L'étape suivante est cruciale dans la régulation de la synthèse de la mélatonine. La conversion de la 5-HT en mélatonine se fait en deux étapes successives: en premier lieu, elle implique l'acétylation de la sérotonine en N-acétyl sérotonine (NAS), une réaction qui est catalysée par l'arylalkylamin N-acétyl transférase (AA-NAT) et utilise l'acétyl coenzymeA comme cofacteur. L'activité de L-tryptophane hydroxylase et de la NAT présentent des variations qui suivent le rythme lumière/obscurité avec un pic au cours de la nuit, induisant les variations circadiennes en concentration du 5-HT et de la NAS et au final de la

mélatonine. Le rythme endogène de la synthèse de la mélatonine suit le rythme de l'AA-NAT qui constitue l'enzyme limitante de cette voie de biosynthèse rythmique [272].

Le second étape NAS est méthylé par l'hydroxy-indole-O-méthyl-transférase (HIOMT) pour conduire à la mélatonine [273]. Contrairement à l'AA-NAT, l'activité de l'HIOMT est plus stable [274]. La sécrétion de la mélatonine est inhibée en présence de lumière et stimulée lorsqu'il fait sombre. La mélatonine n'est pas stockée dans la glande pinéale mais elle est facilement sécrétée dans le sang et le LCR en raison de sa nature lipophile [275] (**Figure 31**).

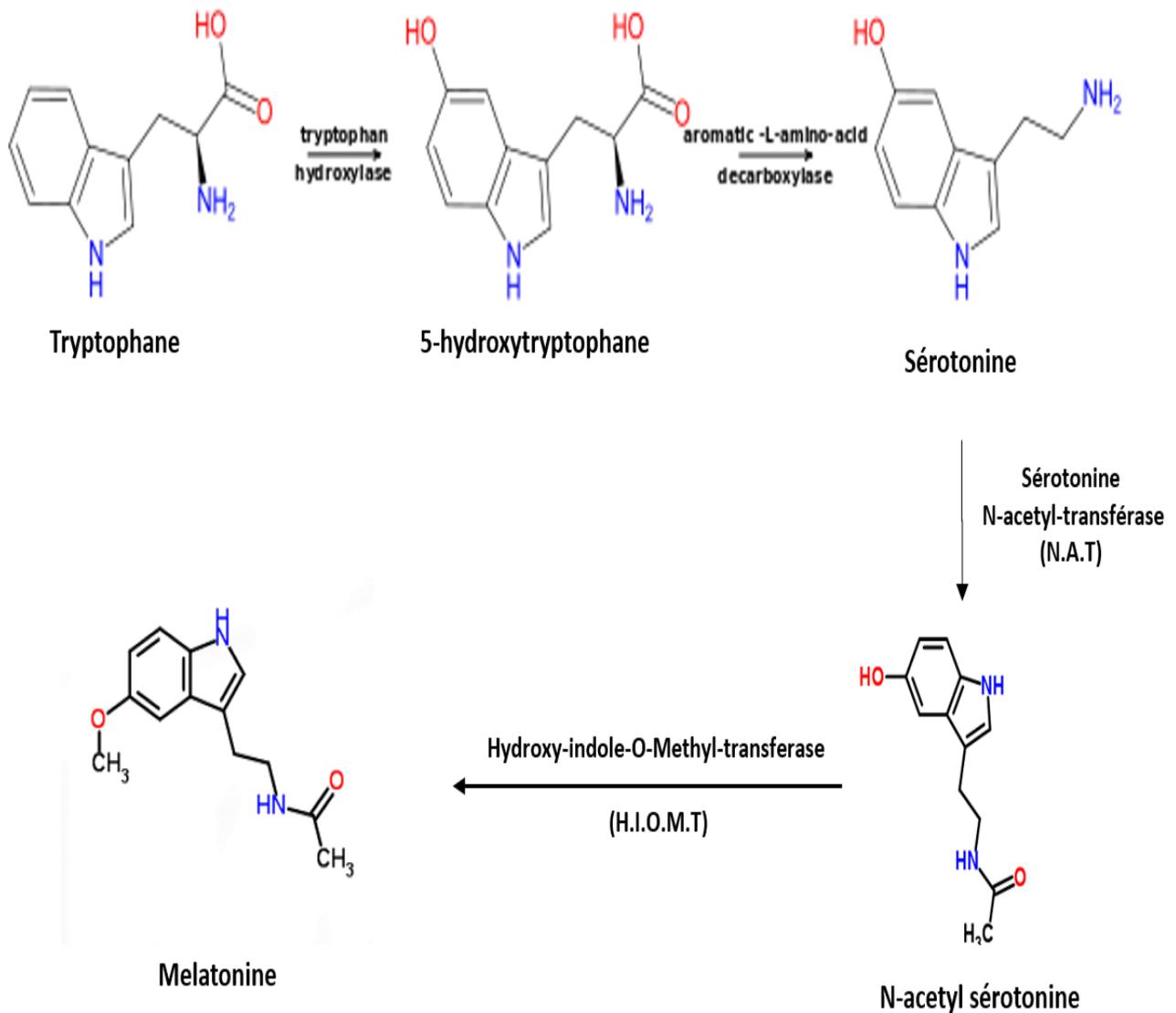


Figure 31: Voie biosynthétique de la mélatonine et des enzymes impliquées. Le tryptophane est prélevé dans le sang et converti en sérotonine en plusieurs étapes. La conversion de la sérotonine en N-acétylsérotonine est la principale cible de la régulation de la production de mélatonine. La mélatonine est ensuite libérée dans la circulation pour atteindre les cibles périphériques et dans le fluide cérébrospinal influençant les régions du cerveau adjacent.

4.2 Pharmacocinétique et catabolisme de la mélatonine

Une fois synthétisée, la mélatonine est libérée par les pinéaloctes dans le sang pour atteindre ses cibles périphériques et dans le fluide cébrospinal influençant ainsi les régions du cerveau adjacent. La mélatonine circulante possède une demi-vie courte, de l'ordre de 30 min [276, 277]. Il existe plusieurs voies métaboliques pour la mélatonine dont le métabolisme principal se situe au niveau du foie en hydroxylant la mélatonine en position 6 pour donner 6-hydroxymélatonine principalement par l'isoforme CYP1A2 du cytochrome P450, cela lui augmente l'hydrophilie de la molécule pour faciliter son élimination [278]. Le 6-hydroxymélatonine est ensuite éliminée par les reins sous forme d'un sulfate ou d'un glucuronide [279], la forme sulfatée constitue un bon marqueur de la sécrétion de la mélatonine par la glande pinéale. Chez l'homme, le rythme de la mélatonine est fréquemment évalué par un dosage de cette forme sulfatée. D'autre voie métabolique se fait au niveau du cerveau qui est différent de celui observé au niveau hépatique. La mélatonine est transformée d'abord en N1-acétyl-N2-formyl-5-méthoxykynuramine (AFMK) qui, sous l'action de l'arylamine formidase ou l'hémopéroxydase subit une déformylation et conduit à la N-acétyl-5-méthoxy-kynurénamine (AMK) [280]. La voie mineure se fait au niveau des yeux qui aboutissent soit par O-déméthylation à la N-Acétyl sérotonine, soit par N-désacylation à la 5-méthoxytryptamine, soit encore à des métabolites tricycliques de type β -carboline tels que la pinoline. Le stockage de cette hormone est impossible, ainsi toute la mélatonine synthétisée est aussitôt libérée (**Figure 32**).

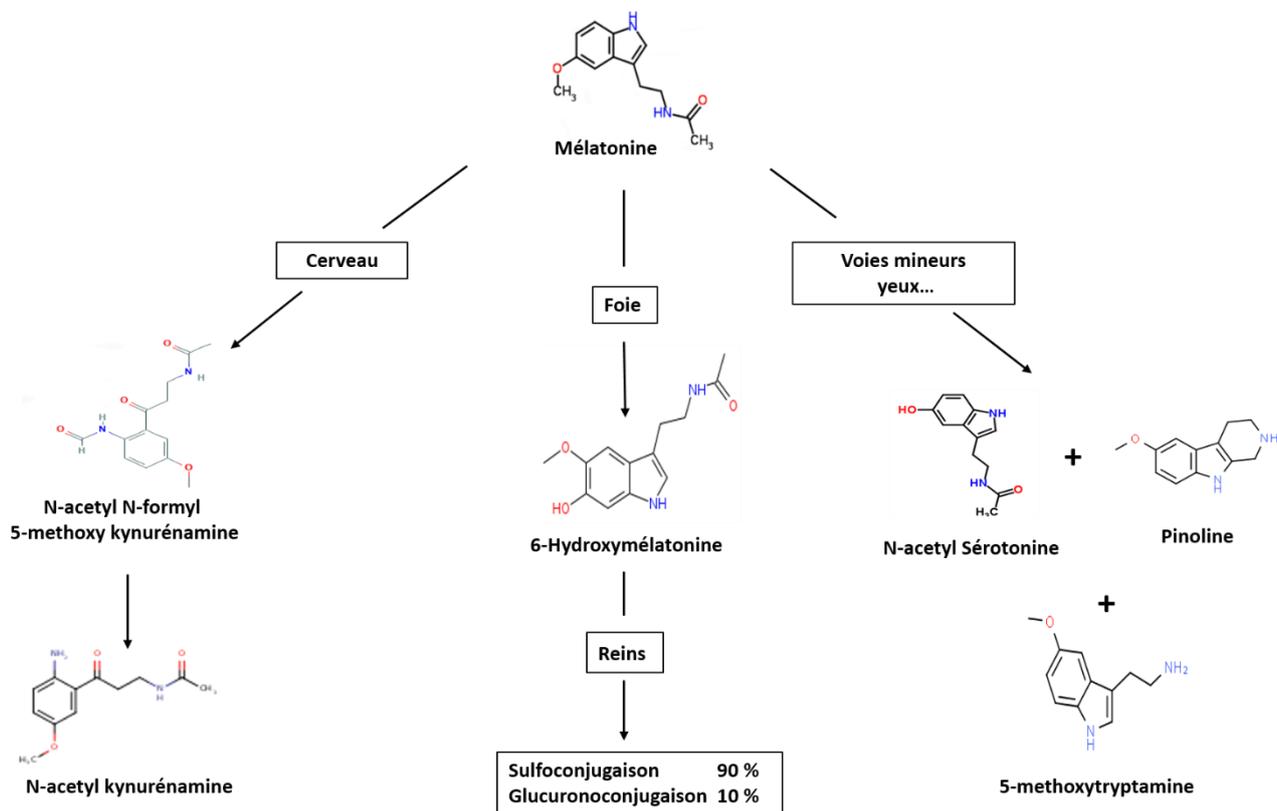


Figure 32 : Différentes voies métabolique de la mélatonine. Le métabolisme principal se situe au niveau du foie en hydroxylant la mélatonine en position 6 pour donner 6-hydroxymélatonine la voie mineure se fait au niveau des yeux qui aboutissent soit par O-déméthylation à la N-Acétyl sérotonine, soit par N-désacylation à la 5-méthoxytryptamine, soit encore à des métabolites tricycliques de type β -carboline tels que la pinoline. D'autre voie métabolique qui conduit à la N-acétyl-5-méthoxy-kynurénamine par des processus oxydatifs enzymatiques ou non au niveau du cerveau.

4.3 Récepteurs de la mélatonine

IL a été démontré que la plupart des effets biologiques de la mélatonine sont médiés par les récepteurs couplés aux protéines G. La mélatonine active deux récepteurs transmembranaires, MT1 (codé par MTNR1A) et MT2 (codé par MTNR1B) [281]. MT1 et MT2 diffèrent l'un de l'autre non seulement par leur structure mais aussi par leur localisation: MT1 est fortement exprimé dans le noyau supra chiasmatic, l'hippocampe, le noyau accumbens, l'amygdale, le substantia nigra, l'hypothalamus et le cervelet, alors que MT2 est exprimé préférentiellement dans la rétine et à moindre degré dans l'hippocampe et le cortex cérébral [282]. Un troisième récepteur membranaire a été décrit et nommé MT3. Cependant, MT3 s'est avéré plus tard la quinone réductase II, une enzyme qui participe à la protection des cellules contre le stress oxydatif [283]. L'activation de MT1 déclenchée par la mélatonine module un grand nombre de voies de signalisation. La mélatonine bloque la synthèse de l'AMPC, l'activité de la protéine kinase A et la fixation des éléments sensibles

à l'AMPc. D'autre part, l'activation de MT1 conduit à la phosphorylation de ERK1/2, MEK 1/2 et JNK. L'activation de MT2 aurait des effets biologiques similaires [284]. Les récepteurs intracellulaires de la mélatonine ont également été décrits, mais ils ont ensuite été identifiés comme étant la calmoduline, la calréticuline et la tubuline, et leur contribution aux effets biologiques de la mélatonine est largement inconnue [282]. La mélatonine a également été décrite comme un ligand de haute affinité pour le récepteur rétinoïde orphelin alpha (ROR- α) [285], mais cette découverte est restée controversée [286]. Des preuves supplémentaires accumulées au fil des années suggèrent que la mélatonine est un ligand pour le récepteur ROR- α d'affinité modérée [287]

Outres ses interactions avec les récepteurs membranaires et nucléaire, la mélatonine a des effets anti-vieillessement non médiés par les récepteurs en raison de sa capacité à neutraliser les radicaux oxygénés libres (ROS) toxiques qui sont produits lors du métabolisme de l'oxygène et sont associés au dommage et au vieillissement tissulaire [288].

4.4 Physiologie de la mélatonine

La mélatonine a été liée à plusieurs rôles physiologiques tels que le rythme circadien, le sommeil, la fonction immunitaire, la reproduction sexuée, le métabolisme, la dépression, l'homéostasie gastro-intestinale, les os, la physiologie cardiovasculaire et la régulation de la douleur. L'effet le plus connu de la mélatonine concerne la régulation des rythmes biologiques [289]. Elle possède aussi des propriétés antioxydant, anti-vieillessement et oncostatiques [290, 291]. Seules les fonctions de la mélatonine appartenant à la fonction immunitaire sont décrites.

La mélatonine possède des propriétés neuroprotectrices, régulatrices et immunomodulatrices stimulant le système immunitaire et inhibant des réponses immunitaires exacerbées [292]. Une glande pinéale fonctionnelle est nécessaire au développement des organes lymphoïdes primaires et à la fonction immunitaire [293]. Des fonctions immunitaires altérées ont été observées après la pinéalectomie chez diverses espèces, et ceci a été normalisé avec l'administration de mélatonine [294]. En outre, des preuves indirectes ont été recueillies à partir de la corrélation des rythmes diurnes de la mélatonine avec la prolifération et la fonction des cellules immunitaires, telles que les lymphocytes [292]. Des niveaux plus élevés de mélatonine sont associés à une augmentation des cellules immunitaires [295]. Il a été démontré que la mélatonine augmente la synthèse du complexe majeur d'histocompatibilité-II (CMH-II) ce qui augmente la présentation de l'antigène aux cellules T [296]. Dans différentes conditions inflammatoires, la mélatonine réduit la production de plusieurs cytokines pro-inflammatoires, en particulier le TNF- α , l'IL-1 β , l'IL-6 et l'IFN- γ , chez des modèles murins

et chez l'homme [297]. En particulier, l'administration chronique de mélatonine induit une réponse des LT CD₄⁺(Th2) et réduit la réponse des LT CD₄⁺ (Th1) en augmentant la production d'IL-10 et en diminuant la production du TNF- α [298]. La mélatonine diminue la réponse des cellules T CD₄⁺ CD25⁺ régulatrices chez les patients atteints de cancer [299]. Elle augmente également l'expression in vitro de FoxP3, le facteur transcriptionnel Treg caractéristique, dans les cellules mononucléées du sang périphérique des patients atteints de lupus érythémateux systémique.

4.5 Mélatonine et SEP

La majorité des maladies auto-immunes telles que la SEP sont chroniques, elles imposent un fardeau sur la qualité de vie de l'individu et le système de soins de santé. La production de mélatonine peut être altérée chez les patients atteints de SEP montrant des rythmes altérés et une diminution des taux nocturnes de mélatonine sérique [300]. La mélatonine joue un rôle important dans la modulation immunitaire et la preuve la plus solide soutenant ce rôle a été fournie par l'observation que les souris pinéalectomisées montrent des thymus, des rates et des lymphnodes réduites, ainsi que des signes de déficits immunitaires [301]. Cependant, les effets de la mélatonine sur la réponse immunitaire sont contradictoires, allant de la stimulation à la suppression de la réponse immunitaire [302]. Certaines études ont montré que les niveaux de mélatonine sont inversement corrélés avec la sévérité de SEP [303]. *Alvarez-Sanchez et al* ont montré que la mélatonine limite le développement d'EAE en bloquant la différenciation des LT17 (Th17) via son récepteur MT1, par suite la production d'IL-17 qui est une cytokine pathogène diminue. Ils ont également signalés que la mélatonine supprime l'infiltration des LT1 (Th1) dans le SNC. Aussi, ils ont rapporté que l'effet de la mélatonine était lié à l'expression de CD44 qui est un récepteur membranaire impliqué dans le recrutement de cellules immunitaires dans des sites enflammés [304]. La mélatonine augmente le niveau de la production de l'IL-10, cytokine anti-inflammatoire, produite par les cellules Treg 1 et favorise la différenciation de ces cellules en se liant sur le récepteur MT1 [305]. Elle a également augmenté la sécrétion d'IL-27 par les cellules dendritiques, une cytokine connue pour induire la sécrétion d'IL-10 par les cellules Treg 1 [306]. Un autre mécanisme d'action potentiel de la mélatonine dans l'EAE était la diminution de l'infiltration des LT dans le SNC associée à la réduction de l'expression des chimiokines (CCL9, CCL20) et du cytokine l'IL-6 [307]. Ces études montrant une dysfonction mitochondriale chez les patients atteints de SEP, associée à une diminution du taux de mélatonine. *Kang et al* ont rapporté que la mélatonine était bénéfique dans l'EAE des rats. Cet effet bénéfique était médié par la régulation négative de la molécule d'adhésion cellulaire ICAM-1, réduisant ainsi les infiltrats cellulaires dans le SNC [308] (**Figure 33**). La perturbation du sommeil est une plainte

fréquente des patients atteints de SEP qui peut conduire à une fatigue diurne. *Melamud et al* ont analysé la relation entre les niveaux de mélatonine et les troubles du sommeil chez les sujets malades, ainsi que l'effet du traitement par l'IFN- β . Bien qu'aucune association n'ait été trouvée entre la mélatonine et les habitudes de sommeil, de faibles niveaux de mélatonine ont été détectés chez 13 patients atteints de SEP avant le traitement par IFN- β . Notamment, après l'initiation du traitement, il y avait une augmentation marquée de la mélatonine atteignant des niveaux comparables à ceux des contrôles en bonne santé [309]. Les effets de la mélatonine ont été évalués sur différentes fonctions de l'organisme. Chez l'homme et chez l'animal. Elle a tendance à être vendue et considérée comme une molécule miracle capable de remédier à beaucoup de maux dans quelques pays (Liban, États-Unis, Argentine, Pologne) tels que le trouble de sommeil. En France, la mélatonine n'est pas autorisée à être vendue sur le marché, cependant, elle est consacrée pour la recherche et elle est intervenue dans de nombreuses maladies neuronales et endocriniennes. Les résultats obtenus chez l'animal sont parfois probants mais ça ne nous permet pas pour l'instant de les transposer à l'homme.

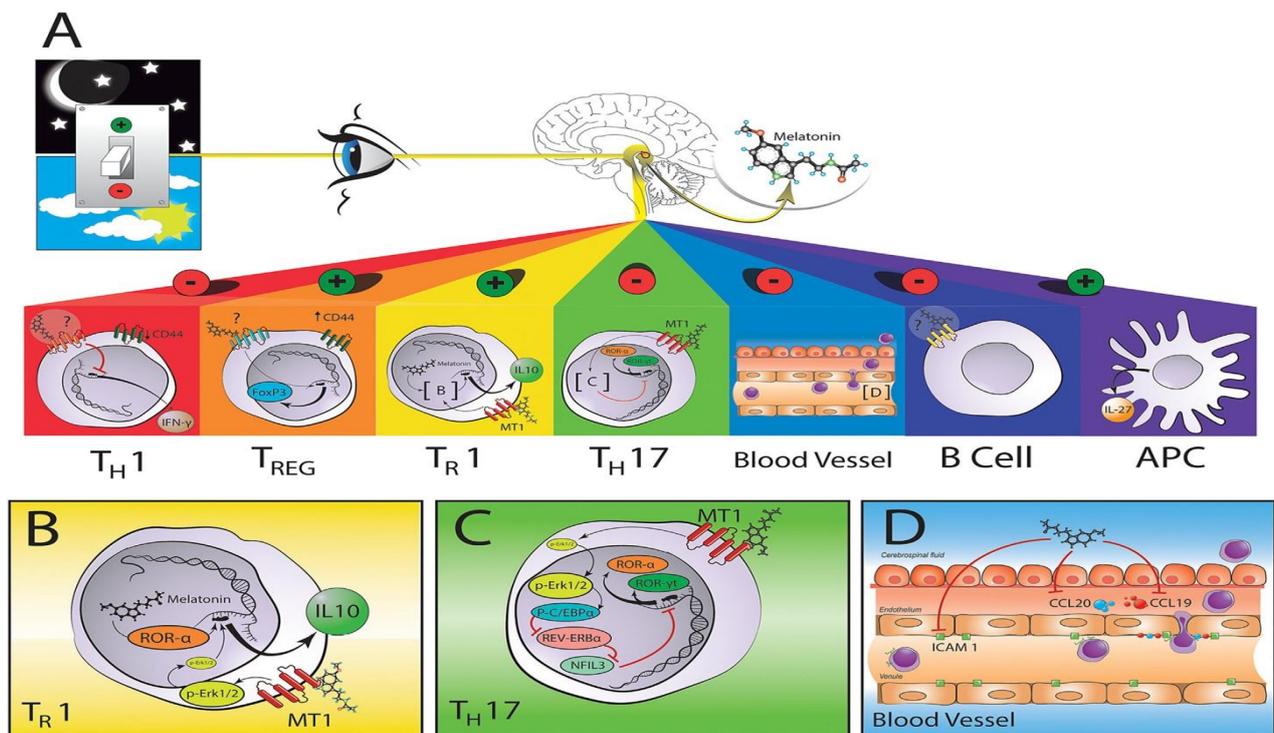


Figure 33 : Effet de la mélatonine dans la SEP. A: La synthèse et la libération de la mélatonine est stimulée par l'obscurité et inhibé par la lumière. L'information photonique de la rétine est transmise à la glande pinéale à travers le noyau supra chiasmatique de l'hypothalamus et le SN sympathique. La mélatonine affecte la fonction des lymphocytes T auxiliaires 1 (Th1) en diminuant l'expression de CD44. En plus, la mélatonine supprime la génération des lymphocytes T auxiliaires 17 Th17 via son récepteur membranaire MT1. (B) D'autre part, la mélatonine stimule les cellules Treg1 à produire IL-10 grâce à l'activation de MT1-Erk1 / 2 et de ROR- α (C). La mélatonine exerce un effet anti-inflammatoire en potentialisant le recrutement et/ou la fonction des Tregs FoxP3+ dans le SNC et la sécrétion d'IL-27 par les DCs. Enfin, la mélatonine diminue la sécrétion de CCL20 et de CCL19, ainsi que l'expression d'ICAM-1 dans les vaisseaux sanguins associés aux lésions de SEP. D'après [307]

Chapitre 5: Le métabolisme cellulaire

Le métabolisme est le terme général qui sert à désigner toutes les réactions chimiques exécutées par les cellules pour produire de l'énergie nécessaire à la fonction vitales de l'organisme. Pour être en bonne santé, il faut maintenir un équilibre entre la demande et l'offre d'énergie. Les sources d'énergie qui entrent en compétition sont: le glucose et les lipides en particulier les acides gras et les corps cétoniques [310]. Le corps est capable d'utiliser préférentiellement les carburants glucidiques et lipidiques et peut passer rapidement d'un combustible à l'autre, qu'on appelle une flexibilité métabolique [311]. L'un des principales enzymes responsable de la flexibilité métabolique chez les mammifères et les êtres humains est le complexe de pyruvate déshydrogénase ou PDC.

5.1 PDK et PDC

Le Pyruvate déshydrogénase kinase ou PDK est une enzyme kinase qui est impliqué dans la régulation de l'oxydation du glucose [312]. Jusqu'à présent, quatre isoformes tissulaires de PDK (PDK 1-4) ont été identifiées dans les mitochondries de mammifères [313]. Les PDKs sont constitués de deux sous-unités: une sous-unité α avec activité kinase et un β qui est une sous unité régulatrice et sont impliqués dans la régulation de l'oxydation du glucose, qui pourrait finalement affecter le métabolisme du glucose dans l'ensemble du corps [314].

Le PDC est une enzyme exprimée entièrement dans le noyau et formé de trois enzymes mitochondriales (E1 à E3) dont leur structure est distincte l'une de l'autre mais elles fonctionnent interdépendamment: pyruvate déshydrogénase (E1), dihydrolipoyl transactylase (E2), et dihydrolipoyl déshydrogénase (E3), L'enzyme E1 est la première enzyme du PDC, il catalyse la première étape irréversible de la réaction PDC qui convertit le pyruvate en acétyl-CoA, donc, le PDC joue un rôle prédominant dans la régulation du métabolisme des mammifères et représente le point de non-retour de l'utilisation des glucides [315]. Le PDC est normalement actif dans la plupart des tissus à l'état bien nourri. L'activité du PDC est fermement contrôlée afin que les tissus puissent s'adapter à différentes sources d'énergie. PDK4 est l'un des régulateurs de l'activité de PDC [316].

Le glucose est la principale source d'énergie pour la plupart des tissus, lorsqu'il y a abondance de glucides, Le PDK4 est inhibé alors que le PDC est dephosphorylé et activé par le pyruvate déshydrogénase phosphatase (PDP) pour faciliter l'oxydation du glucose et la formation de malonyl-CoA qui supprime l'oxydation des acides gras à longue chaîne (LCFA) et pour que les tissus utilisent le glucose comme source d'énergie [317]. En revanche, dans des conditions de famine, le PDK4 est activé, il phosphoryle le PDC qui devient inactif provoquant ainsi le blocage de l'oxydation du glucose par suite la catalyse du pyruvate en acétyl-CoA est supprimée et le métabolisme se déplace alors vers l'utilisation de la graisse [318]. L'inhibition de PDK4 peut bénéficier à des tissus spécifiques tels que

le muscle squelettique, le foie et le cœur mais la régulation positive de PDK4 est bénéfique dans le tissu adipeux blanc chez les obèses et rongeurs résistants à l'insuline [317]. PDC et PDK occupent des positions centrales dans le métabolisme énergétique cellulaire et joue un rôle important dans le passage du métabolisme du glucose au métabolisme des LCFA. Ainsi, l'altération de l'expression des PDKs en particulier PDK4 a une énorme influence sur l'état de santé de l'organisme (**Figure 34**).

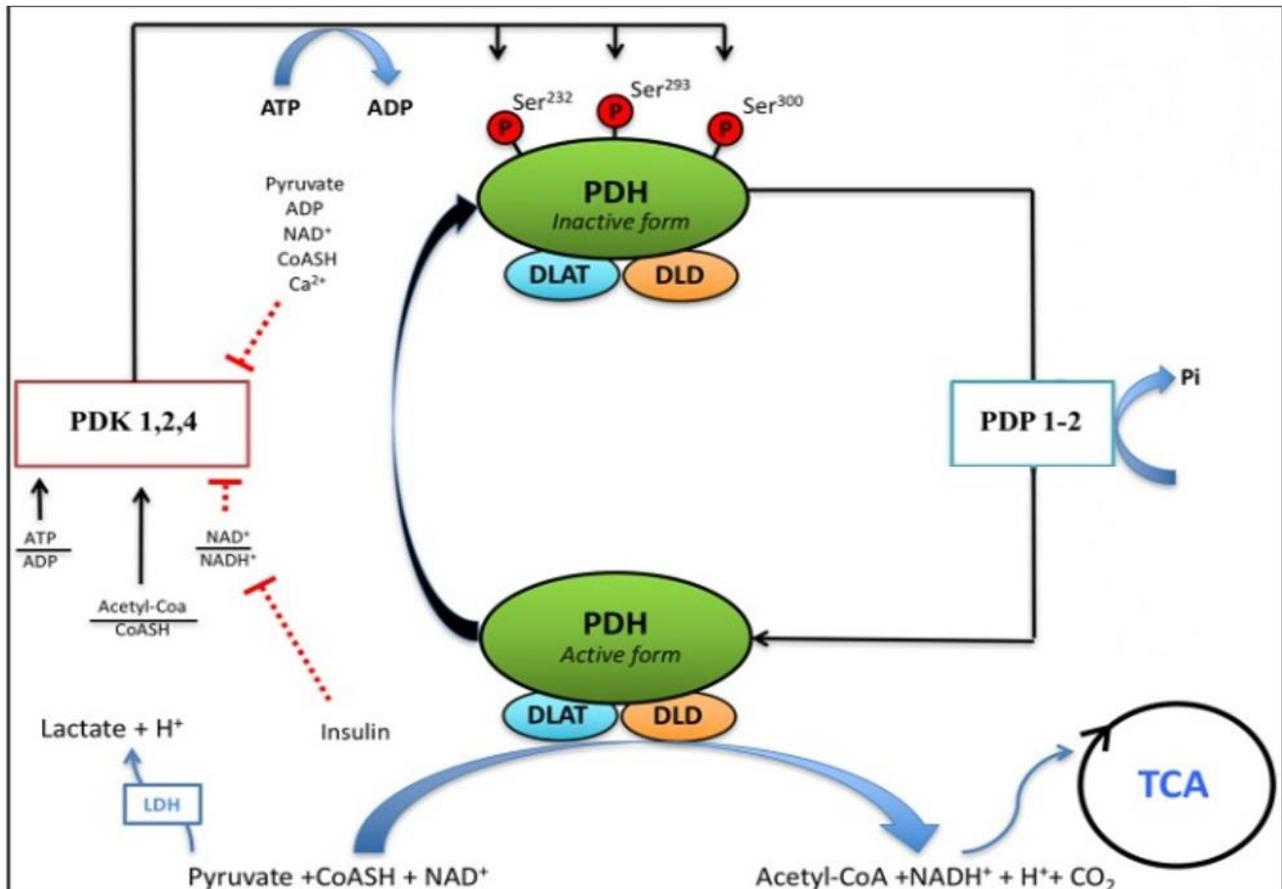


Figure 34 : Représentation schématique de la régulation du métabolisme du glucose par le PDC et le PDK. L'activité de la PDC est fortement inhibée par PDK en la phosphorylant et renforcée par la déphosphorylation par le PDP. PDC catalyse la décarboxylation irréversible du pyruvate en acétyl-CoA, qui peut être oxydé par le cycle de l'acide tricarboxylique (TCA). D'après [319].

5.2 Le N-acétyl aspartate ou NAA

Le NAA, un métabolite spécifique du SN, est synthétisé à partir d'aspartate et d'acétyl-CoA dans les neurones, il peut être exporté vers des oligodendrocytes où il est métabolisé par l'enzyme aspartoacylase, pour former de l'acétyl-CoA, dont l'utilisation est suggérée pour la myélinisation et la remyélinisation [320]. Le NAA semble être un lien clé dans les caractéristiques biochimiques distinctes du métabolisme du SNC [321]. Cependant, son rôle n'a pas été entièrement élucidé. Des

études antérieures ont confirmé que les taux de NAA du cerveau diminuent chez les personnes atteintes de SEP, ce qui suggère que la dysfonction mitochondriale peut précéder la neurodégénérescence [322]. De plus, la réduction de l'NAA a été corrélée avec la progression de la maladie et le déclin neurologique chez les patients atteints de SEP [323].

5.3 Voie métabolique PDC-dépendant

Les altérations métaboliques dans la SEP ont été étudiées en relation avec les processus physiopathologiques multiples liant la fonction mitochondriale, la myéline et l'inflammation [324]. Parmi les voies métaboliques, la synthèse des lipides est un processus critique pour la remyélinisation car les lipides et le cholestérol sont des composants clé de la myéline et que leur synthèse accrue est liée au mécanisme thérapeutique des médicaments contre la SEP [325]. L'inhibition de la synthèse du cholestérol entraîne une hypomyélinisation et une myélinisation retardée chez la souris [326]. Les ODs et les astrocytes absorbent le glucose et le lactate de leurs vaisseaux sanguins périphériques pour générer des métabolites nécessaires à la formation de la myéline par les ODs [327] et pour fournir de l'énergie aux neurones [328]. Aussi, le glucose doit être converti par la voie de glycolyse en pyruvate afin de fournir un support métabolique aux fonctions de l'axone [329, 330]. D'autre part, le lactate issu du sang ou des astrocytes est utilisé par les ODs comme un substrat principal pour générer l'ATP et les acides gras nécessaires à la synthèse de la myéline [331]. Au cours de la remyélinisation, dans les ODs, le pyruvate qui provient du lactate ou de la conversion du glucose est transféré dans la matrice mitochondriale des ODs et est d'abord converti en acétyl-CoA par l'intermédiaire de l'enzyme PDC mitochondriale qui relie la glycolyse au métabolisme oxydatif pour fournir de l'ATP et des métabolites nécessaires à la synthèse de l'AG [332]. Par la suite, l'acétyl-CoA entre dans le cycle de Krebs pour donner du citrate qui pourrait être transféré au cytosol des ODs [332] où il est reconverti en acétyl-CoA qui se transforme en acide gras et en énergie sous forme d'ATP nécessaires à la synthèse du cholestérol, un constituant principal de la myéline pendant la myélinisation [331]. La biosynthèse du cholestérol se produit principalement (~95%) dans le cerveau grâce à une enzyme 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-coenzyme-A réductase (HMGCR) [333]. Des études ont montré que HMGCR a été diminué au pic de la maladie EAE aiguë [334]. Les connaissances actuelles concernant les voies métaboliques impliquées dans la remyélinisation sont controversées et mal comprises (**Figure 35**)

5.4 β -oxydation peroxysomale

La remyélinisation par les ODs nécessite la synthèse d'AG à partir du pyruvate importé dans les mitochondries oligodendrocytaire alors que le maintien de la myéline après la myélinisation nécessite la dégradation d'AG. Cette dégradation se fait dans le peroxysome par la voie β -oxydation [331]. Ce dernier processus est un processus en plusieurs étapes qui impliquent des enzymes différents de celles qui se trouvent dans les mitochondries. En fait, les AG entrent d'abord dans la cellule via des transporteurs protéiniques d'acide gras y compris FAT/CD36 qui sont présents à la surface des cellules [335]. Bien que les produits finaux provenant de la β -oxydation au niveau du peroxysome et de la mitochondrie soient différents, la β -oxydation peroxisomale peut produire de l'acétyl-CoA à partir de LCFA. Les AGs sont convertis en acétylcarnitine qui est ensuite exporté du peroxysome vers le cytosol où il peut être converti en acétyl-CoA pour être utilisé à nouveau comme substrat dans la synthèse des acides gras et du cholestérol [336]. L'acétyl-CoA produit à partir de la β -oxydation ne peut pas être converti en lactate mais il a été suggéré que le pyruvate importé dans les peroxysomes pourrait produire du lactate [337]. Considérons que l'inhibition de la synthèse des AGs par la voie dépendante de PDC conduit à l'accumulation de pyruvate, il semble que ce niveau élevé de pyruvate provoqué par la suppression de l'activité de PDC augmente la β -oxydation peroxysomale. Conformément, l'administration de pyruvate s'est avérée augmenter la β -oxydation peroxysomale, qui a également besoin de NAD^+ provenant de la conversion du pyruvate en lactate [337]. Par conséquent, l'accumulation de lactate est obtenue non seulement par la suppression de la consommation de pyruvate par le PDC, qui à son tour réduit la conversion du lactate en pyruvate grâce à un feedback négative mais également par les peroxysomes (**Figure 35**).

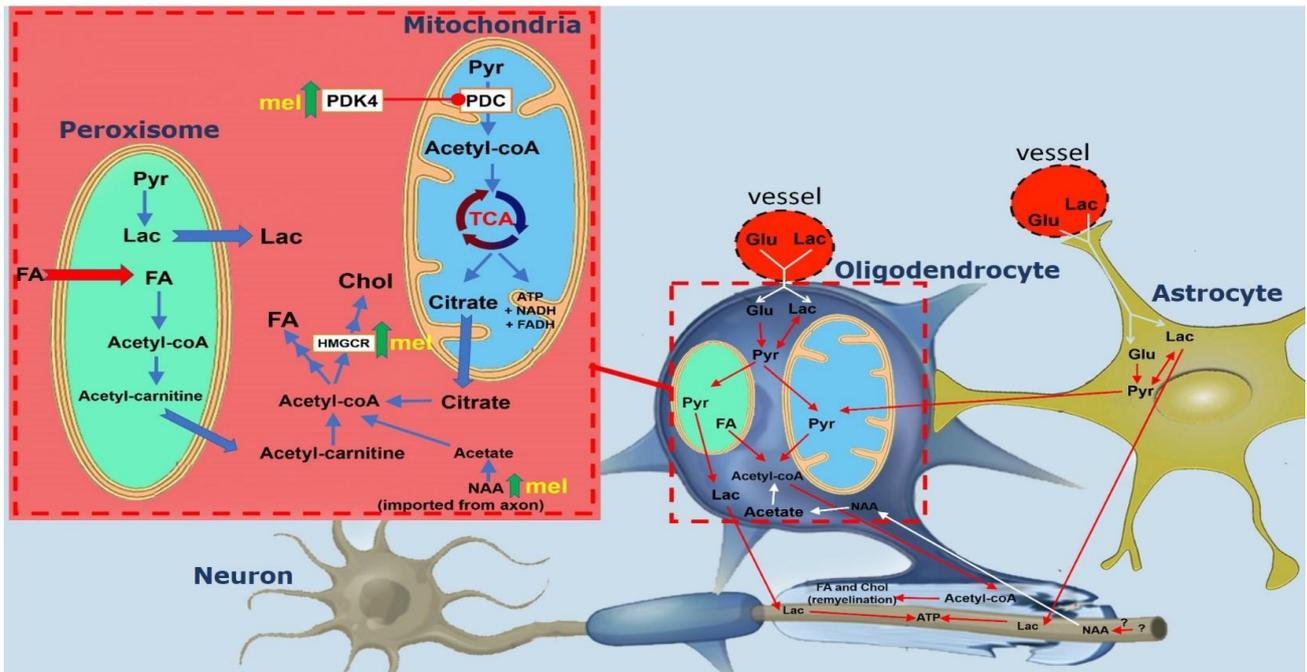


Figure 35 : Représentation schématique du métabolisme du glucose au niveau des ODs au cours de la remyélinisation.

Le pyruvate est converti dans les mitochondries par le PDC pour produire de l'acétyl CoA, qui génère du citrate par le cycle de KREBS. Le citrate est ensuite utilisé pour produire des acides gras et du cholestérol dans le cytosol nécessaire à la synthèse du cholestérol qui est un constituant principale de la myéline. PDK4 est l'un des régulateurs de l'activité de PDC. Les NAA axonaux sont transférés dans des ODs et sont convertis en acétate puis en acétyl-CoA, un substrat pour la synthèse des acides gras et du cholestérol.

5.5 Les mitochondries et leur rôle dans la neurodégénérescence de la SEP.

5.2.1 Les mitochondries

Les mitochondries ont uniquement une double expression génomique de protéines qui proviennent à la fois de l'ADN nucléaire et mitochondrial (ADN mt) [338]. Les mitochondries sont des organites responsables de la bioénergétique cellulaire via le cycle de Krebs (avec la production de NADH et FADH) et la phosphorylation oxydative (OXPHOS), pour la bioénergétique cellulaire avec production secondaire d'ATP [339]. Les mitochondries jouent un rôle crucial dans l'homéostasie du calcium, la signalisation cellulaire, l'apoptose et la croissance cellulaire [340]. Des études récentes ont montré que le dysfonctionnement mitochondrial est impliqué dans la pathologie de la SEP [340]. Le dysfonctionnement de la mitochondrie et le stress oxydatif sont les caractéristiques pathologiques des troubles neurodégénératifs [341]. Par conséquent, les défauts mitochondriaux dans les axones de la SEP peuvent entraîner un blocage de la conduction et une altération du cytosquelette médié par le calcium [340]. Les caractérisations neuropathologiques de la dysfonction mitochondriale dans la SEP impliquent des changements dans l'ADN mitochondrial et des fonctions anormales des

protéines mitochondriales, une augmentation de la formation de radicaux libres et du stress oxydatif, l'apoptose [341]. La substance blanche périplaque, autour des lésions en développement, contient des ROS probablement causé par des macrophages, des microglies et les astrocytes. La pathologie mitochondriale est le premier signe ultrastructural de lésion du SNC et, bien qu'elle précède les changements de la morphologie axonale [342]. La mitochondrie augmente dans les axones à la suite de la démyélinisation en réponse aux changements dans les besoins énergétiques dues à la redistribution des canaux sodiques. Cependant, l'augmentation de la densité des mitochondries dans les lésions de SEP pourrait contribuer à la formation de radicaux libres et exacerber les lésions tissulaires en cours [343], le changement du nombre de mitochondries chez les souris non traitées et traitées à la mélatonine reste à déterminer. Dans le modèle murin de la SEP, les déficits bioénergétiques mitochondriaux, y compris une diminution du niveau et de l'activité du PDC, ont précédé la manifestation pathologique de la maladie [344]. De plus, le déséquilibre ionique ainsi qu'une exposition excessive accrue aux cytokines pro-inflammatoires favorisent la pathogenèse de la SEP en altérant l'homéostasie mitochondriale Ca^{2+} et bloquent le développement et la maturation des ODs [341]. Enfin, l'autophagie des mitochondries perturbées est principalement réalisée par le processus de l'axe PINK1-Parkin [341]. Il a été constaté que des mutations dans ces gènes déclenchent la pathogenèse de la SEP [341] **(Figure 36)**

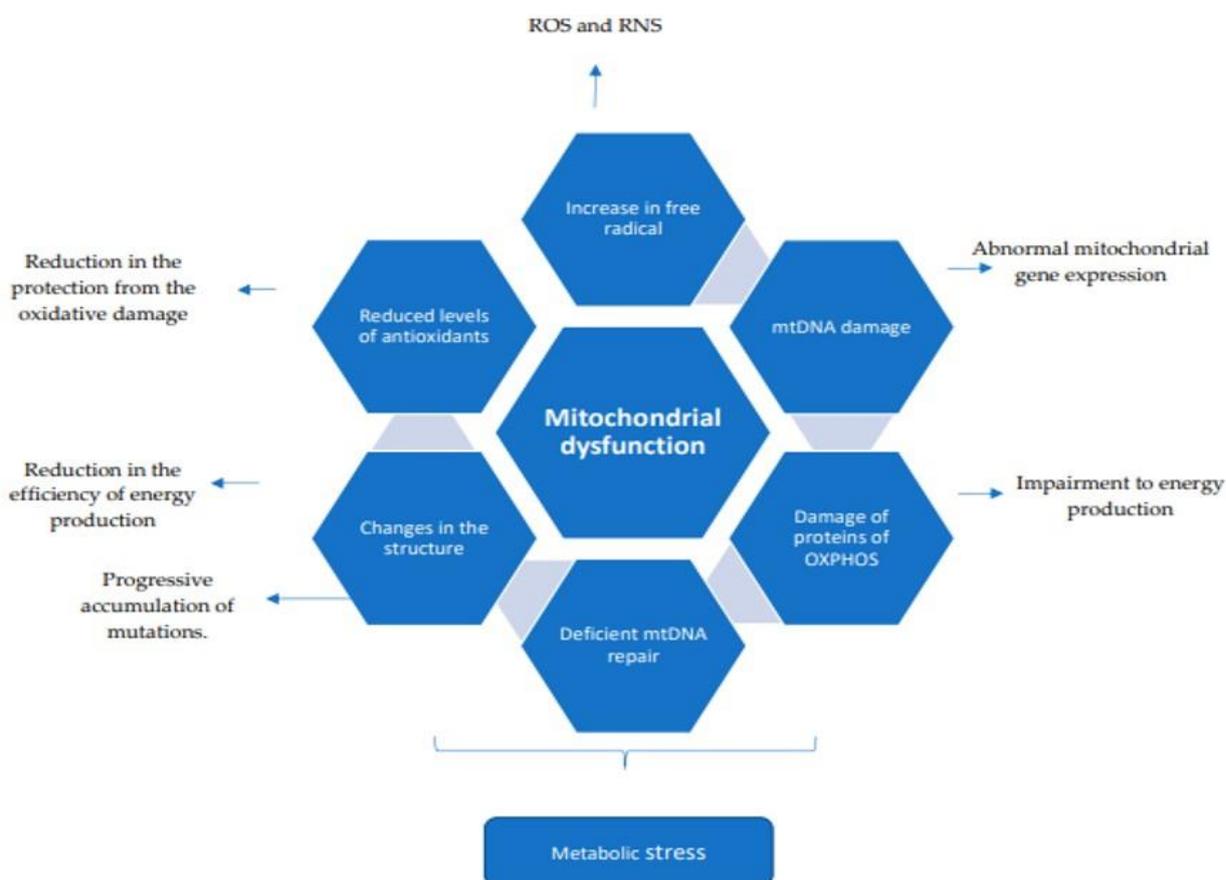


Figure 36 : Neuroinflammation chronique conduisant à un dysfonctionnement mitochondrial [345]

5.2.2 Mécanisme de dysfonctionnement mitochondrial perpétuant la lésion du SNC dans la SEP.

Le cerveau a un taux métabolique élevé et consomme 20% de l'énergie totale produite dans le corps humain, qui est principalement utilisée dans la neurotransmission (plus de la moitié de celle consommée pour maintenir l'équilibre ionique et le potentiel membranaire) et le flux axoplasmique (pour conduire des impulsions nerveuses); ces fonctions dépendent en grande partie de la machinerie mitochondriale [346, 347]. La transmission du signal neurologique est due à la propagation de la dépolarisation membranaire à travers le neurone, et le gradient électrochimique est créé par la Na^+/K^+ ATPase, allouée dans les nœuds de Ranvier. Les oligodendrocytes sont non seulement responsables de la gaine de myéline, mais libèrent également du lactate pour le neurone comme source d'énergie. Avec l'inflammation chronique et la destruction de la myéline, il y a redistribution des canaux ioniques. Par conséquent, il y a plus de consommation d'ATP par l'augmentation du nombre de Na^+/K^+ ATPase. Dans le but d'équilibrer le rapport et la demande d'énergie, les mitochondries entament des modifications compensatoires (augmentation du nombre et de la taille, modification de la localisation dans le neurone et de sa morphologie). En parallèle, l'inflammation chronique crée un environnement de stress oxydatif secondaire à la libération de ROS par les macrophages et la microglie et augmente le glutamate libéré en réponse aux dommages neuronaux. Le $\text{TNF-}\alpha$ endommage le processus OXPHOS par des mécanismes régulés par Ca^{2+} [348]. Avec les dommages cumulatifs progressifs mitochondriaux (altération de l'ADN mt et augmentation de l'hétéroplasmie, dysfonctionnement des sous-unités OXPHOSP, altération des protéines qui régule la migration de l'organite du corps neuronal vers l'axone), une altération significative de la production d'énergie se développe [349]. Si la production d'ATP est compromise, la Na^+/K^+ -ATPase n'est pas capable de conserver le gradient après un potentiel d'action, ce qui conduit à une accumulation de Na^+ dans le cytoplasme des neurones. Cela force le canal $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ à transférer du Ca^{2+} à l'intérieur de la cellule, activant la cascade Ca^{2+} dépendante de l'apoptose, ce qui entraîne la mort neuronale, la dégénérescence wallérienne et un dysfonctionnement neurologique irréversible [343, 348, 350-352]. Ce processus est représenté sur la **(Figure 36)**.

Le processus dégénératif progressif initié dans l'axone peut se poursuivre vers le corps neuronal et les dendrites, atteignant également les neurones présynaptiques et postsynaptiques [353]. L'échec chronique à fournir de l'énergie au tissu augmente le stress oxydatif dans un cercle vicieux qui augmente les dommages mitochondriaux [349]. Il est important de mentionner que les dommages à l'ADN mitochondrial sont amplifiés au cours du processus d'expansion des clones (avec délétions ou

mutations), modifiant les niveaux d'hétéroplasmie du tissu [349, 354]. Ce processus augmente l'incapacité à fournir un apport énergétique approprié aux tissus, contribuant à la mort des cellules [355].

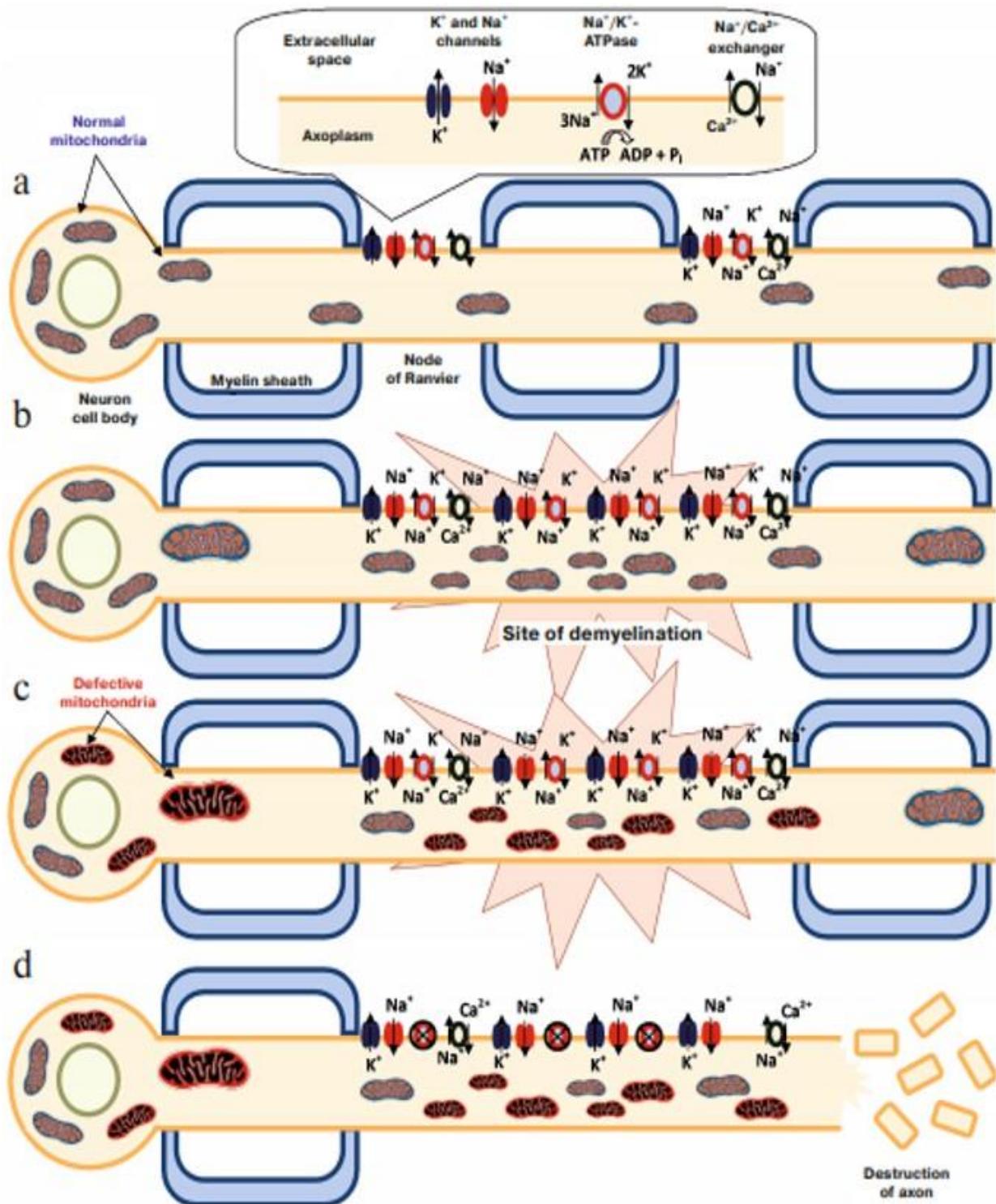


Figure 36 : Le rôle des mitochondries dans le processus de neurodégénérescence. a. Nerve normal. b. Site de démyélinisation avec modification secondaire de la distribution des canaux ioniques dans le nerf. c. Modification structurelle et fonctionnelle des mitochondries causée par le stress oxydatif. d Cascade d'apoptose activée par Ca^{2+} [346]

But du travail

La SEP constitue la première cause de handicap non traumatique chez l'adulte jeune dans le monde entier. La thérapie actuelle utilise des médicaments qui suppriment les attaques immunologiques sans supprimer tout le système immunitaire. La mélatonine s'est révélée d'être un candidat neuroprotecteur puissant pour réduire la perte de la myéline. Le but de ce travail est d'étudier la pathologie moléculaire impliquée dans la SEP et l'effet de la mélatonine sur cette maladie.

Dans un premier temps, nous avons voulu faire une étude clinique composée de 23 patients atteints de SEP et 23 sujets sains. L'objectif de ce travail a été d'examiner la corrélation clinique entre la mélatonine sérique et la proCT et aussi d'étudier la formation osseuse en mesurant le taux d'ostéocalcine (OCN) chez les patients atteints de SEP.

Dans un second temps, nous avons voulu faire une étude expérimentale sur des souris C57BL/6 EAE. L'objectif de ce travail a été d'évaluer l'effet de la mélatonine sur :

- (1) Le métabolisme osseux et le risque d'ostéoporose tout en évaluant le taux sérique de la vitamine D, du calcium, du PTH et de l'OCN
- (2) Les mécanismes immunitaires en mesurant le niveau des cytokines pro-inflammatoires (TNF- α et IL-1 β) et celui des cytokines anti-inflammatoires (IL-10 et IL-4) dans le cerveau de souris EAE.
- (3) Les voies métaboliques impliquées dans le métabolisme cérébral et la remyélinisation tout en mesurant les concentrations cérébrales d'acétate, de NAA, du lactate, le niveau de PDK4, l'activité de PDC ainsi que le niveau des protéines constitutives de la gaine de myéline tels que la MOG, la MBP, la MOBP et le niveau de l'enzyme HMGCR nécessaire à la formation du cholestérol qui entre aussi dans la formation de la myéline.

II Matériels et méthodes

II.1 Déclaration éthique

Cette étude a été approuvée par le Comité régional d'éthique pour la recherche médicale à l'Université Yāsūj des sciences médicales, Yāsūj, Iran. En outre, il a été réalisé conformément à la déclaration d'Helsinki. Un consentement de chaque participant a été obtenu.

II.2 Plan d'étude et participants

23 personnes en bonne santé et 23 patients atteints de SEP ont participé dans cette étude. Tous les patients étaient des sujets nouvellement diagnostiqués, selon les critères de McDonald. L'âge et le sexe des patients atteints de SEP ont été choisis au hasard, cependant les sujets sains volontaires ont été choisis en fonction de l'âge et du sexe. Les patients qui sont de type progressif primaire et secondaire, les patients en phase aiguë de la maladie et ceux sous traitement (tous types de médicaments) ont été exclus de l'étude.

II.3 Quantification des hormones sériques par le test ELISA

Des échantillons de sang de patients atteints de SEP et des patients sains ont été prélevés de préférence à la même date. Le sérum obtenu a été utilisé pour doser les taux de mélatonine et de pro calcitonine en utilisant le kit ELISA (Sigma Aldrich).

II.4 Modèle animal in vivo

II.4.1 Animaux Expérimentaux.

Des souris femelles C57BL/6 adultes (âgées de 6 à 8 semaines, pesées de 20 à 25 g) ont été achetées de l'Institut Pasteur, Téhéran, Iran. Les souris ont été maintenues et logées dans des conditions expérimentales de température et d'humidité constantes au Centre d'élevage. Le Comité institutionnel de protection et d'utilisation des animaux (IACUC) de l'Université de Yāsūj a approuvé toutes les procédures expérimentales et l'utilisation des animaux dans cette étude. Les procédures expérimentales sur les animaux ont été effectuées conformément aux directives du ministère iranien de l'agriculture, conformément aux dispositions de la déclaration d'Helsinki (révisée au Brésil en 2013) et de la directive du Conseil des Communautés européennes (86/609 / CEE). Tous les efforts ont été déployés pour réduire le nombre d'animaux et leur souffrance.

II.4.2 Induction de l'EAE

Des souris C57BL/6 ont été immunisées avec le peptide glycoprotéique oligodendrocytaire de la myéline MOG₃₅₋₅₅, acheté auprès des laboratoires de Hooke (Lawrence, MA, USA). MOG₃₅₋₅₅ (MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGK) a été émulsifié avec l'adjuvant complet de Freund (CFA, Sigma Aldrich) qui est enrichie par des bacilles de Kock. Bref, au jour 0, chaque souris a été anesthésiée avec de l'isoflurane (Abbott Labs, USA), injectée avec 10µl d'émulsion de MOG₃₅₋₅₅ par voie sous-cutanée sur le flanc puis injecté avec 200ng de toxine pertussique (PTX, Hooke Laboratories, Lawrence, MA, USA) par voie intrapéritonéale, dilué au PBS stérile. Au jour 3, une seconde injection de 200ng de PTX a été administrée comme rappel.

II.4.3 Évaluation clinique des souris EAE

Les souris ont été évaluées et notées grâce à des signes cliniques de la maladie par au moins 2 investigateurs du jour 7 au jour 30 après l'immunisation en utilisant une échelle de 0 à 5 points [356] comme suit: 0= pas de maladie clinique; 0.5, paralysie partielle de la queue; 1.0, paralysie complète de la queue ou queue molle; 1.5, paralysie complète de la queue et paralysie partielle d'un membre postérieur; 2.0, paralysie complète de la queue et paralysie partielle des deux membres postérieurs; 2.5, paralysie partielle d'un membre postérieur et paralysie complète d'un membre postérieur; 3.0, paralysie des deux membres postérieurs sans faiblesse des membres antérieurs; 4.0, les membres postérieurs et une paralysie des membres antérieurs; 5.0 mort de l'animal.

II.4.4 Traitement des animaux

Les souris ont été réparties au hasard en 4 groupes suivant : (A) souris traitées avec la solution saline tamponnée au phosphate PBS témoin (Ctrl) (n=8); (B) souris EAE traitées au PBS (Ctrl) (n=8); (C) souris EAE traitées à la mélatonine à faible dose (Low Mel) à des niveaux physiologiques de 476 µg/kg/jour (n=8), (D) des souris EAE traitées à la mélatonine à haute dose (EAE+Mel) (n=8) à des niveaux physiologiques de 10 mg/kg/jour. Pour être cliniquement pertinent, le traitement a été administré par voie intrapéritonéale (i.p) pendant 13 jours consécutifs (du jour 18 à 30), à partir du jour de l'apparition des symptômes cliniques où le score ≥ 3 jusqu'au sacrifice. Avant le traitement, les animaux ont été pesés et la mélatonine a été fraîchement préparée en la dissolvant dans du PBS avec du diméthylsulfoxyde à 5% (DMSO).

II.4.5 Préparation de l'échantillon

Les souris ont été profondément anesthésiées et des échantillons de sang ont été prélevés par ponction cardiaque. Après centrifugation (2500 tr/min, 10 min), le sérum de chaque souris a été mis dans un tube eppendorfs et congelé à -80°C jusqu'à l'analyse ultérieure. Les souris ont ensuite été sacrifiées par dislocation cervicale et les tissus cérébraux ont été rapidement excisés, immédiatement congelés sur de la glace sèche et stockés à -80°C jusqu'à ce que des tests supplémentaires soient effectués.

II.4.6 Quantification des cytokines par dosage immuno enzymatique (ELISA)

Les taux sériques de proCT, PTH, calcium, 25-hydroxy vitamine D, cytokines pro-inflammatoires IL-1 β et TNF- α et anti-inflammatoire IL-4 et IL-10 ont été mesurés en utilisant un kit ELISA conformément aux instructions du fabricant (R & D Systems, Minneapolis, MN et Abcam, États-Unis).

II.5 Western blotting

Les échantillons de cerveau ont été homogénéisés sur de la glace et lysés dans un tampon de lyse contenant du Tris-HCl 50 mM (pH 7,5), NaCl 150 mM, acide désoxycholique à 0,5%, Nonidet P40 à 1%, SDS 0,1%, PMSF 1 mM et 100 mg/ml leupeptine. La teneur en protéines a été mesurée en utilisant un kit d'analyse de protéines colorimétriques Bio-Rad (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Une quantité égale de protéine totale (40 μ g) a été résolue sur un gel de polyacrylamide de dodécylsulfate de sodium à 8-15% puis transférée sur une membrane de nitrocellulose. Les membranes ont été bloquées pendant 1 heure dans une solution de lait écrémé à 5%, puis incubées avec des anticorps primaires dirigés contre la glycoprotéine oligodendrocytaire de la myéline (MOG; 1:500, Abcam, USA), protéine basique oligodendrocytaire associée à la myéline MOBP; 1:500, Abcam), protéine basique de la myéline (MBP; 1:500, Abcam), isoforme 4 de la pyruvate déshydrogénase kinase (PDK4, 1:600, Abcam) et β -actine (1:1000, Santa Cruz Biotechnology Inc., États-Unis) sur un agitateur à 4°C pour une nuit. Après lavage, les anticorps secondaires appropriés aux espèces conjugués à la peroxydase de raifort ont été incubés à la température ambiante. Les protéines immunoréactives ont été détectées avec un système de détection de transfert Western par chimiluminescence amélioré. La densité relative des bandes de protéines a été analysée par densitomètre à l'aide de My Image (SLB, Séoul, Corée) et quantifiée par un logiciel d'analyse d'image pour la documentation du gel (LabWorks Software Version 3.0, UVP Inc., CA, USA)

II.6 PCR en temps réel

L'ARN total a été isolé à partir d'homogénats cérébraux au moyen du Tri-Reagent (Sigma-Aldrich, Zwijndrecht, Pays-Bas), selon le protocole du fabricant. Ensuite, l'ADNc a été synthétisé avec un kit de transcription inverse d'ADNc de grande capacité en utilisant des amorces aléatoires (Applied Biosystems, USA). La PCR quantitative en temps réel (qRT-PCR) a été réalisée par le système de PCR en temps réel Step One (Applied Biosystems). La PCR en temps réel a été réalisée avec Real Q Plus 2x Master Mix Green (Ampliqon, Danemark) selon les instructions du fabricant. Les séquences d'amorces utilisées étaient les suivantes: PDK4 F, CCGCTTAGTGAACACTCCTTC et R, TCTACAAACTCTGACAGGGCTTT; HMGCR F TGATTGGAGTTGGCACCAT et R, TGGCCAACACTGACATGC. La spécificité des produits de PCR a été confirmée par l'analyse de la courbe de fusion (données non présentées). Les conditions de la PCR étaient les suivantes: activation initiale à 95°C pendant 15 min, puis 35 cycles d'amplification consistant en une dénaturation à 95°C pendant 15s, un recuit à 57°C pendant 30s et une extension à 72°C pendant 30s. Les changements relatifs dans les niveaux d'expression des gènes ont été déterminés par la méthode CT comparative (Δ CT). Toutes les réactions ont été effectuées en triple en utilisant la β -actine comme contrôle interne pour la normalisation.

II.7 Évaluation du lactate cérébral et du N-acétylaspartate (NAA) par chromatographie liquide à haute performance (HPLC).

Les échantillons d'homogénat de cerveau ont été centrifugés à 40 000 g pendant 15 min, les surnageants placés dans un bain de glace et neutralisés à pH 4-5 avec de l'hydroxyde de potassium (KOH), puis les culots ont été pesés pour analyse. Les échantillons ont été centrifugés pendant 15 minutes supplémentaires à 40000g pendant 15 minutes pour sédimenter le précipitant, le perchlorate de potassium (KClO₄), qui s'est formé après neutralisation avec du KOH. Les surnageants ont été retenus et filtrés (0,2 μ m) avant la lyophilisation. Les mesures chromatographiques du lactate cérébral et du NAA ont été effectuées avec un système de chromatographie liquide à haute performance (HPLC) smartline KNAUER équipé d'un micro dégazeur, d'un système LPG, d'un détecteur UV-VIS (2550 a été réglé à 220 nm) et d'un MZ ODS-C18. (250 mm \times 4,6 mm, 5 μ m) colonne. Les calculs chromatographiques ont été effectués en utilisant un système EZCHROM élite. La détermination du lactate et du NAA a été effectuée par HPLC selon les méthodes décrites par Kehr [357] et Shannon [358] respectivement. La précision et l'applicabilité de la méthode proposée pour l'extraction et la détermination du lactate et de l'NAA dans le cerveau ont été étudiées en utilisant la méthode d'addition standard.

II.8 Détermination de l'activité PDC

La PDC existe sous deux formes: la forme «active» déphosphorylée et la forme «inactive» phosphorylée. L'inter-conversion entre ces deux formes peut facilement modifier le flux à travers ce complexe. Par conséquent, il est approprié de mesurer les deux activités afin d'exprimer le changement de l'activité du PDC en tant que résultat plus précis.

Les activités PDC actives ou totales ont été mesurées au jour 18 dans les homogénats de cerveaux décongelés par la glace de tous les groupes, comme décrit précédemment [359-361]. L'activité de PDC a été déterminée par la production de $^{14}\text{CO}_2$, à partir de pyruvate. Pour maintenir le PDC actif, on a ajouté le tampon d'homogénéisation contenant du dichloroacétate (inhibiteur des PDH kinases) et du fluorure de sodium (inhibiteur des PDH phosphatases).

Pour mesurer l'activité PDC « totale », on a ajouté de PDH phosphatase 1 purifiée à des homogénats décongelés et incubée pendant 30 min pour déphosphoryler le PDC. L'activité PDC est exprimée en tant que munits/mg de protéine.

II.9 Analyse statistique

Les résultats sont présentés sous forme de moyenne avec des barres d'erreur indiquant l'erreur type de la moyenne (moyenne \pm SEM). Il n'y avait aucune preuve d'écarts significatifs par rapport à la distribution normale ($P > 0.05$, test de shapiro-wilk). Le logiciel Graph Pad Prism (Version 6.01, San Diego, CA, USA) a été utilisé pour effectuer des analyses statistiques. Après évaluation de la normalité, le test T non apparié a été utilisé pour analyser les données cliniques et les scores EAE. De plus, la relation entre la mélatonine et pro CT a été examinée par le coefficient de corrélation de Pearson. Une analyse de la variance à deux voies (ANOVA) et une analyse de la variance à un facteur avec le test de correction de serre Geisser, suivies du test de comparaisons multiples de Turkey, ont été utilisées pour voir l'effet de la quantité de la mélatonine sur la maladie. Une ANOVA ordinaire à un facteur suivie du test de comparaison multiple de Turkey, avec une seule variance regroupée, a été utilisée pour analyser les données expérimentales. Tous les tests statistiques étaient bilatéraux et le niveau de signification était fixe à $p < 0.05$. La signification est indiquée par * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ et **** $p < 0,0001$

III *Résultats*

PUBLICATION N°1

Le traitement à la mélatonine réduit le risque de l'ostéoporose et normalise la formation osseuse dans la sclérose en plaques.

Majid Ghareghani^a, **Linda Scavo**^{b,c}, Damien Arnoult^c, Kazem Zibara^b, Naser Farhadi^a

a Cellular and Molecular Research Center, Faculté de médecine, Université des sciences médicales de Yasuj, Yasuj, Iran

b ER045, PRASE, Laboratoire de cellules souches, Département de biologie, Faculté des sciences.

c INSERM U 1197, Laboratoire de cellules souches, transplantation et immunoregulation, Villejuif, France.

Fundamental and Clinical pharmacology, **publié.**

Introduction 1

La sclérose en plaques (SEP) est une maladie auto-immune inflammatoire dans laquelle la gaine de myéline est détruite, par conséquent, les neurones se dégènèrent et meurent. La SEP se caractérise par des plaques démyélinisées dans le système nerveux central (SNC) touchant environ 2.5 millions de personnes dans le monde [362]. Malgré des décennies d'études, les causes de la SEP sont encore inconnues. La mélatonine est une hormone sécrétée par la glande pinéale pendant la nuit selon un rythme circadien et ses niveaux sont inversement corrélés à la sévérité de la maladie [309]. Elle est lipophile et traverse la barrière hémato-encéphalique avec une grande efficacité [363]. La mélatonine s'est révélée d'être un candidat neuroprotecteur puissant pour réduire la perte de la myéline [301]. Les taux sériques de mélatonine diminuent chez les patients atteints de SEP présentant également un risque d'ostéoporose caractérisé par une réduction de la masse osseuse et une détérioration de l'architecture osseuse. Une étude récente a montré une possible corrélation entre la proCT et la mélatonine chez les patients atteints de SEP [364], mais l'effet de la mélatonine/proCT sur les facteurs de risque d'ostéoporose n'a jamais été exploré. La procalcitonine (proCT) a été rapportée comme biomarqueur de l'inflammation systémique et des maladies auto-immunes [365]. Cependant, ses changements chez les patients atteints de SEP n'ont pas bien explorés.

Dans ce travail, nous avons d'abord examiné, à l'aide d'ELISA, si les taux sériques de proCT étaient corrélés aux taux de mélatonine chez les patients atteints de SEP. Nous avons ensuite exploré l'effet de la mélatonine à une dose de 10 mg/kg sur le métabolisme osseux dans un modèle de souris expérimental d'encéphalomyélite auto-immune (EAE) et chez les patients atteints de SEP. Ainsi, nous avons observé que le taux sérique de la mélatonine est inversement corrélé à celui de la proCT et que la mélatonine diminue les scores neurologiques chez les souris EAE. Elle réduit aussi le taux de proCT et celui de l'hormone parathyroïdienne PTH, augmente le taux de la 1,25-dihydroxyvitamine D, du calcium et de l'Ostéocalcine (OCN). Ces résultats indiquent que la mélatonine améliore la gravité de la maladie, normalise les métabolites osseux qui a pour conséquent de diminuer l'ostéoporose.

**SHORT
COMMUNICATION**

Melatonin therapy reduces the risk of osteoporosis and normalizes bone formation in multiple sclerosis

Majid Ghareghani^{a†}, Linda Scavo^{b,c†}, Damien Arnoult^c,
Kazem Zibara^{b*}, Naser Farhadi^{a*}

^aCellular and Molecular Research Center, Faculty of Medicine, Yasuj University of Medical Sciences, Yasuj, Iran

^bERO45, PRASE, Laboratory of stem cells, Biology department, Faculty of Sciences, Lebanese University, Beirut, Lebanon

^cINSERM U 1197, Laboratory of stem cells, transplantation and immunoregulation, Villejuif, France

Keywords

biomarker,
melatonin,
multiple sclerosis,
osteoporosis,
procalcitonin

Received 18 August 2017;
revised 22 November 2017;
accepted 24 November 2017

*Correspondence and reprints:
naserfarhadi42@yahoo.com,
kzibara@ul.edu.lb

†Equal contribution

ABSTRACT

Multiple sclerosis (MS) is a common autoimmune and neurodegenerative disease of the central nervous system. Serum levels of melatonin decrease in MS patients who are also at risk of osteoporosis. Procalcitonin (proCT) has been reported as a biomarker of systemic inflammation and autoimmune disease; however, its changes in MS patients have not been well explored. This study investigated, using ELISA, the clinical correlation between serum melatonin and proCT in MS patients. We then assessed the effect of melatonin (10 mg/kg) therapy on bone metabolism and osteoporosis in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) model of MS and in MS patients. Data showed a significant increase ($*P < 0.05$) in serum levels of proCT in MS patients, inversely correlated ($r = -0.945$; $P = 0.0001$) with melatonin levels, compared to healthy participants. On the other hand, melatonin therapy ameliorated EAE severity by significantly decreasing ($*P < 0.05$) mean clinical scores, compared to control EAE mice. In addition, serum levels of proCT significantly ($**P < 0.01$) increased in EAE mice, compared to controls, which was significantly ($*P < 0.05$) reduced by melatonin. Moreover, EAE-induced decrease in 25-hydroxyvitamin D, calcium, and osteocalcin (OCN) in EAE mice, compared to controls, was significantly ($*P < 0.05$) increased by melatonin. Finally, OCN serum levels were found to be significantly decreased ($*P < 0.05$) in MS patients, in comparison with controls. Taken together, we suggest that proCT could be used as a diagnostic biomarker in MS patients and that melatonin normalizes bone metabolites in MS. Further clinical and experimental investigations are needed to understand bone metabolism in MS.

INTRODUCTION

Multiple sclerosis (MS) is an inflammatory disease of the central nervous system (CNS) in which axonal myelin sheath is destroyed. MS is characterized by manifestations of plaques of demyelinated areas in the CNS white matter. Despite decades of studies, the causes of MS are still unknown; however, damage caused by free radicals plays a substantial role in this

pathology, in addition to immune and inflammatory factors [1]. Moreover, the role of melatonin as an antioxidant, which crosses the blood–brain barrier (BBB) with high efficiency, has been recently approved [2]. This highly lipophilic hormone is released from the pineal gland in a circadian pattern, and its levels are inversely correlated with the severity of the disease [3]. While most studies reported neuroprotective, regulatory, and immunomodulatory activities for melatonin

[4], others reported pro-inflammatory activities [5]. Importantly, it has been described that melatonin is involved in bone healing process [6].

Procalcitonin (proCT), mainly generated by the parafollicular C cells of the thyroid and a precursor of calcitonin (CT) hormone, is involved in calcium homeostasis and counteracts parathyroid hormone (PTH) [7]. PTH is secreted in response to reduced calcium which directly stimulates osteoblasts and thereby indirectly induces osteoclasts to increase bone resorption and subsequently normalization of calcium levels [8]. However, it could be an important risk factor for osteoporosis, characterized by reduced bone mass and deterioration of bone architecture. Moreover, proCT has been recommended as a marker in systemic inflammation and autoimmune diseases, and it has been suggested that proCT measurement could be helpful in the diagnosis, prevention, monitoring, and treatment of infectious, inflammatory, and autoimmune diseases [9]. Importantly, proCT was suggested to influence a multitude of biological activities, neuronal and hormonal, associated with the hypothalamic-pituitary axis [10].

A recent study reported a possible correlation between proCT and melatonin in MS patients [11]; however, the effect of melatonin/proCT on osteoporosis risk factors has never been explored. In this study, we investigated whether serum levels of proCT were correlated with melatonin levels in MS patients. In addition, the effect of melatonin on bone metabolism was then explored in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) mouse model of MS and in MS patients.

MATERIALS AND METHODS

Clinical

Ethics statement

This study was approved by the Regional Ethics Committee for Medical Research at Yasuj University of Medical Sciences, Yasuj, Iran. In addition, it was carried out in accordance with the Helsinki Declaration. A written informed consent was obtained from each participant.

Study design and participants

Briefly, a total of 23 healthy individuals and 23 MS patients participated in this study. All patients were newly diagnosed MS subjects, according to the McDonald criteria. Age and sex were randomly selected from the patients willing to participate, and age/gender-matched healthy individuals were chosen from

volunteer healthy subjects. Patients of primary and secondary progressive type, patients in acute phase of the disease, and those under therapy (all kinds of medications) were excluded from the study.

Quantifying serum hormones by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Blood samples from MS and control patients were preferentially collected at the same date, and the obtained serum was used to assay the levels of melatonin, proCT, and osteocalcin using ELISA Kits (Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA) according to manufacturer's protocol.

In vivo animal model

Experimental animals

Adult female C57BL/6 mice (6–8 weeks old, 20–25 g) were purchased (Pasteur's Institute, Tehran, Iran). The Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) of Yasuj University approved all experimental procedures and animal use in this study. Housing of animals and experimental procedures were carried out in accordance with the guidelines of the Iranian Agriculture Ministry, which conforms to the provisions of the Declaration of Helsinki (as revised in Brazil in 2013) and of the European Communities Council Directive (86/609/EEC). All efforts were made to reduce the number of animals.

EAE induction

C57BL/6 mice were immunized with myelin oligodendrocyte glycoprotein peptide (MOG)_{35–55} purchased from Hooke Laboratories (Lawrence, MA, USA). MOG_{35–55} (MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGK) was emulsified in complete Freund's adjuvant (CFA, Sigma Aldrich), enriched Mycobacterium tuberculosis bacteria. Briefly, on day 1, each mouse was anesthetized with isoflurane (Abbott Labs, North Chicago, IL, USA), injected with 10 µL MOG emulsion subcutaneously over the flank, and injected with 200 ng of pertussis toxin (PTX, Hooke Laboratories) intraperitoneally. On day 3, a second 200 ng booster PTX injection was given.

Clinical evaluation of EAE mice

Mice were evaluated and scored for clinical signs of the disease by at least two investigators from day 7 to day 30 postimmunization using a 0–5 point scale, as follows: 0 = no clinical disease; 0.5, partial tail paralysis; 1.0, complete tail paralysis or limp tail; 1.5, complete tail paralysis and partial paralysis of one hindlimb; 2.0, complete tail paralysis and partial paralysis of both

hind limbs; 2.5, partial paralysis of one hindlimb and complete paralysis of one hindlimb; 3.0, paralysis of both hindlimbs without forelimb weakness; 4.0, hindlimb and one forelimb paralysis; 5.0, moribund/dead.

Treatment of animals

Mice were randomly divided into three groups of the following: (i) PBS-treated mice (Ctrl) ($n = 8$); (ii) PBS-treated EAE mice (EAE + PBS) ($n = 8$), (iii) melatonin-treated EAE mice (EAE + Mel) ($n = 8$) with 10 mg/kg/day. To be clinically relevant, treatment was given intraperitoneally (*i.p.*) for 13 consecutive days (from day 18 to 30), starting on the day of clinical symptom onset (score ≥ 3), until sacrifice.

Sample preparation

Mice were deeply anesthetized, and blood samples were collected via cardiac puncture. After centrifugation (700 g, 10 min), the serum was obtained and frozen at -80°C .

Quantifying cytokines by enzyme-linked immunosorbent assay

The serum levels of proCT, PTH, calcium, 25-hydroxyvitamin D, and osteocalcin were measured using ELISA kits in accordance with the manufacturer's instructions (CUSABIO, China).

Statistical analysis

Results are presented as Mean \pm SEM. GraphPad Prism (Version 6.01, San Diego, CA, USA) software was used to perform statistical analysis. After normality assessment, unpaired *t*-test was used to analyze the clinical data and EAE scores. In addition, the relationship between melatonin and proCT was examined by Pearson correlation coefficient. Ordinary one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test, with a single pooled variance, was used to analyze the experimental data. Significance is indicated by * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; and **** $P < 0.0001$.

RESULTS

ProCT serum levels are inversely correlated with Melatonin in MS patients

A total of 23 MS patients (19 women and 4 men) with a mean age of 28.02 ± 2.11 (range: 19–56 years) and 23 healthy individuals (19 women and 4 men) with a mean age of 28.52 ± 8.17 (range: 20–55 years) were included in this study. Results showed that melatonin

serum levels were significantly lower (* $P < 0.05$) in MS patients, compared to healthy controls (79.45 ± 6.61 vs. 109.3 ± 10.8 pg/mL, Figure 1a). In contrast, proCT serum levels were significantly higher (* $P < 0.05$) in MS patients, in comparison with controls (188.7 ± 13.03 vs. 82.21 ± 21.42 pg/mL, Figure 1b). Pearson's correlation demonstrated a significant inverse correlation between serum levels of melatonin and proCT in MS patients ($r = -0.945$; $P = 0.0001$), which was absent in healthy subjects.

Melatonin treatment decreased ProCT, but increased 25-hydroxyvitamin D and calcium, in an in vivo EAE animal model of MS

The effect of melatonin on neurological scores of EAE mice was determined by daily administration of melatonin (10 mg/kg) from day 18 to day 30 postimmunization. The disease course in this model exhibits a chronic progressive-relapsing phenotype. Results showed that the peak clinical score in PBS-treated mice was as high as 3.5 between 21 and 30 days, which declined in melatonin-treated mice to reach 1.5 at 30 days (Figure 2a). Therapeutic intervention with melatonin resulted in a highly significant decrease (* $P < 0.05$) in mean clinical scores (2.1 ± 0.17), when compared to PBS-treated mice (2.65 ± 0.2) (Figure 2b). Results clearly indicated that melatonin decreased EAE severity and had a beneficial role in improving EAE outcomes.

The effect of melatonin on bone metabolism was then investigated in EAE animal model of MS, using ELISA assay. Serum levels of proCT significantly (** $P < 0.01$) increased by nearly twofold in EAE mice, compared to controls (3.04 ± 0.52 vs. 6.18 ± 0.9 ng/mL) (Figure 2c). In contrast, this increase was significantly ($\#P < 0.05$) reduced by melatonin treatment, compared to EAE mice (3.42 ± 0.42 vs. 6.18 ± 0.9 ng/mL). On the other hand, although there was a slight increase in PTH serum levels in EAE mice, compared to controls, however, melatonin therapy had very slight and non-significant effect on PTH levels (Figure 2d). Furthermore, the effect of melatonin on bone metabolites was then assessed on serum concentrations of 25-hydroxyvitamin D and calcium (Figure 2e and f). Results revealed a very significant decrease in serum levels of 25-hydroxyvitamin D (132.6 ± 16.4 vs. 72.13 ± 8.5 nmol/L) and calcium (5.11 ± 0.84 vs. 1.23 ± 0.26 nmol/L) in EAE mice, compared to controls (** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$, respectively). However, administration of melatonin significantly (* $P < 0.05$) increased the concentrations of 25-hydroxyvitamin D (119.09 ± 10.06

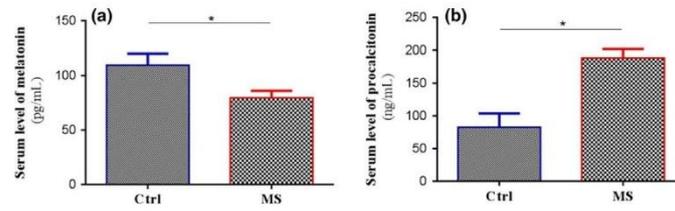


Figure 1 Circulating concentrations of serum melatonin and procalcitonin, using ELISA. (a) MS patients showed a significant decline in melatonin levels, in comparison with healthy subjects (controls). (b) Procalcitonin levels were significantly increased in the patients group, in comparison with controls. Values are reported as mean \pm SEM. Independent *t*-test was used to analyze the data. ($n = 23$ /group; * $P < 0.05$ vs. control).

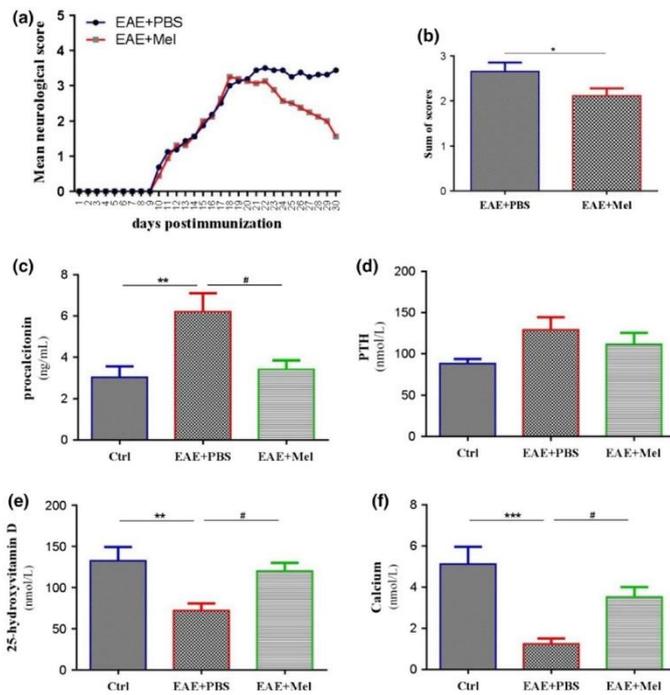


Figure 2 Effects of melatonin on serum levels of proCT, PTH, 25-hydroxyvitamin D, and calcium in EAE mouse model. (a) Neurobehavioral analysis in EAE mice displayed amelioration in disease severity in melatonin-treated mice, compared to EAE mice. Values are expressed as the Mean \pm SEM. Each group included eight mice ($n = 8$). (b) Likewise, cumulative neurological disability was significantly lower in mice treated with melatonin, compared to EAE mice. Serum was collected after 13 days of melatonin therapy and analyzed for (c) procalcitonin (proCT), (d) parathyroid hormone (PTH), (e) 25-hydroxyvitamin D, and (f) calcium, using ELISA assay. Significance is indicated by ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs. controls; # $P < 0.05$ vs. PBS-treated EAE.

vs. 72.13 ± 8.5 nmol/L) and calcium (3.52 ± 0.46 vs. 1.23 ± 0.26 nmol/L), compared to EAE mice (Figure 2e and f).

Circulating osteocalcin is reduced in EAE mice and MS patients

To investigate bone formation, circulating serum levels of osteocalcin (OCN), a marker of bone matrix synthesis, were measured. Result showed that OCN serum

levels significantly decreased (* $P < 0.05$) in EAE mice, in comparison with controls (110.5 ± 16.98 vs. 233.5 ± 36.27 ng/mL), whereas melatonin therapy induced a significant increase (* $P < 0.05$) in OCN, in comparison with EAE mice (223.02 ± 34.33 vs. 110.5 ± 16.98 ng/mL) (Figure 3a). Moreover, OCN serum levels were found to be significantly decreased (* $P < 0.05$) in MS patients, in comparison with controls (Figure 3b).

DISCUSSION

This study suggests that proCT could be a biomarker in MS patients as serum levels of proCT and melatonin were found to be inversely correlated in these patients. Recently, it has been shown that serum proCT and TNF- α , a central regulator of inflammation, were significantly higher in MS patients, compared to healthy subjects [11]. In fact, our data are in agreement with several studies, showing a decrease in metalation levels in MS patients, inversely correlated with disease severity [3,12]. In contrast, enhanced serum melatonin levels were found in cluster headache patients treated with methylprednisolone, while the level of calcitonin gene-related peptide (CGRP), a member of the calcitonin family of peptides, was significantly reduced [13]. It is worth noting that CGRP and proCT are splice variants of calcitonin-I (CALC I) gene products [14]. In fact, a recent study on CGRP-induced vasodilation in rat middle cerebral arteries suggested that melatonin may act as a physiological modulator of CGRP [15]. Finally, it was previously reported that serum proCT is a clinically important marker for systemic inflammation and sepsis in severely ill patients and could also be a potential biomarker in systemic autoimmune diseases [9].

Some studies reported osteopenia or osteoporosis in MS patients [16]. A study on bone metabolism in ovariectomized rats showed that melatonin treatment modified bone remodeling [17]. Bone metabolism was also shown to be affected by pinealectomy and long-term melatonin treatment, which influence, by an unknown mechanism, the circadian rhythm of bone metabolism by changing the serum levels of various hormones, particularly CT [18]. Moreover, it has been

confirmed that melatonin decreases bone resorption and have a bone-protecting effect [19]. This study showed, for the first time, that EAE induction causes an elevation in serum levels of proCT, which was suppressed by melatonin therapy. On the other hand, EAE induction caused a decrease in the circulating levels of vitamin D, calcium, and OCN which could be risk factors for osteoporosis in MS patients [20]. However, serum levels of these markers reverted back to nearly normal levels by melatonin therapy.

Previous studies have shown that melatonin affects osteoblasts at physiological concentrations while affecting osteoclasts at pharmacological concentrations. For instance, Sharan et al. [21] reported that melatonin at concentrations of 10 or 100 mg/kg body weight increased osteoblast numbers and bone formation. Similarly, Han et al. [22] showed that melatonin, at physiological dose of 1 μ M, stimulates osteoblast differentiation in C2C12 cells by Osterix activation and by increasing the expression of alkaline phosphatase (ALP), bone sialoprotein (BSP), and OCN genes. In accordance, our data suggested that MS promotes osteoporosis, as the rate of bone formation decreases, while melatonin at physiological concentration of 10 mg/kg/day increases bone formation by increasing OCN levels in vivo. In contrast, Zhou et al. [23] reported that melatonin at pharmacological doses from 1 to 100 μ M inhibits osteoclastogenesis in mesenchymal stem cells (MSCs).

Although bone formation and metabolism have not been investigated in MS, a population-based case-control study focused on patients newly diagnosed with clinically isolated syndrome (CIS) MS [24]. This study showed no significant differences between bone factors at this stage of MS, including bone alkaline

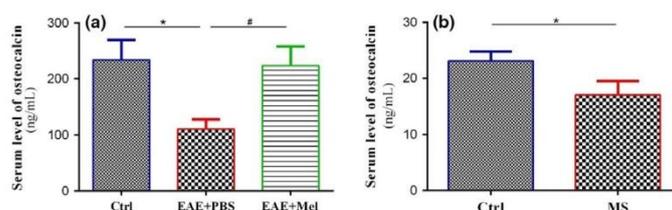


Figure 3 Circulating serum concentrations of osteocalcin (OCN), using ELISA. (a) OCN showed a significant decrease in EAE mice, compared to controls. In addition, OCN significantly increased in melatonin-treated EAE mice, compared to EAE mice. (b) OCN levels significantly decreased in MS patients, in comparison with healthy controls. Values are reported as mean \pm SEM. Ordinary one-way ANOVA and independent *t*-test followed by Tukey's multiple comparison test were used to analyze the data of panel a and b, respectively. (Panel a; *n* = 8/group and Panel b; *n* = 23/group; **P* < 0.05 vs Ctrl; #*P* < 0.05 vs EAE+PBS.

phosphatase (bALP), 25-hydroxy- and 1, 25-dihydroxyvitamin D, calcium, and parathyroid hormone (PTH). In addition, bone turnover and metabolism did not differ significantly in CIS and MS patients, compared to controls, while systemic glucocorticoids, alcohol, smoke, and other factors differed significantly between MS patients and healthy subjects. In our study, bone formation and metabolism significantly differed between EAE and control mice. In fact, we believe that the above-mentioned factors in Moen *et al.* study are confounder factors that have influenced bone formation and metabolism. Indeed, eliminating these factors in our study leads to different results and confirmed that there is a correlation between MS and bone deficit. Further experimental and population-based studies are needed to achieve a better understanding on bone metabolism in MS patients.

On the other hand, while melatonin is well studied in MS and is involved in various biological activities, its role in bone metabolism is not well understood. Melatonin and proCT were always studied separately; however, our study reported an inverse correlation between them in MS patients. We also demonstrated a beneficial role of melatonin therapy in an animal model of MS by reducing the risk of osteoporosis in EAE mice. This new finding opens the door toward studying the role of melatonin in bone metabolism and investigating proCT changes in MS patients at different stages of the disease. Finally, the response of proCT to MS medications could be used as a new biomarker in MS.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by a Cellular and Molecular Research Center of Yasuj University of medical science, Yasuj, Iran.

CONFLICT OF INTERESTS

Majid Ghareghani, Linda Scavob, Damien Arnoult, Kazem Zibara and Naser Farhadi declare that they have no conflict of interest regarding the publication of this manuscript.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

KZ and NF were responsible for concept and design of the study. MG, LS, KZ, DA, and NF were responsible for data acquisition and analysis. All authors read and approved the final version of the manuscript.

REFERENCES

- Haase C.G., Tinnefeld M., Faustmann P.M. The influence of immunomodulation on psycho-neuroimmunological functions in benign multiple sclerosis. *Neuroimmunomodulation* (2004) **11** 365–372.
- Reiter R., Tan D., Manchester L., Tamura H. Melatonin defeats neurally-derived free radicals and reduces the associated neuromorphological and neurobehavioral damage. *J. Physiol. Pharmacol.* (2007) **58** 5–22.
- Melamud L., Golan D., Luboshitzky R., Lavi I., Miller A. Melatonin dysregulation, sleep disturbances and fatigue in multiple sclerosis. *J. Neurol. Sci.* (2012) **314** 37–40.
- Guerrero J.M., Reiter R.J. Melatonin-immune system relationships. *Curr. Top. Med. Chem.* (2002) **2** 167–179.
- Carrillo-Vico A., Lardone P.J., Álvarez-Sánchez N., Rodríguez-Rodríguez A., Guerrero J.M. Melatonin: buffering the immune system. *Int. J. Mol. Sci.* (2013) **14** 8638–8683.
- Turgut M., Uslu S., Uysal A., Yurtseven M.E., Ustün H. Changes in vascularity of cartilage endplate of degenerated intervertebral discs in response to melatonin administration in rats. *Neurosurg. Rev.* (2003) **26** 133–138.
- Meisner M. Pathobiochemistry and clinical use of procalcitonin. *Clin. Chim. Acta* (2002) **323** 17–29.
- Lips P. Vitamin D deficiency and secondary hyperparathyroidism in the elderly: consequences for bone loss and fractures and therapeutic implications. *Endocr. Rev.* (2001) **22** 477–501.
- Becker K.L., Snider R., Nylén E.S. Procalcitonin in sepsis and systemic inflammation: a harmful biomarker and a therapeutic target. *Br. J. Pharmacol.* (2010) **159** 253–264.
- Ojeda M.L., Ambrosiani J., Tavares E., Maldonado R., Miñano F.J. Identification and localization of procalcitonin-like immunoreactivity in the rat hypothalamus. *Neurosci. Lett.* (2006) **408** 40–45.
- Uysal S., Meric Yilmaz F., Bogdaycioglu N., Mungan Ozturk S., Ak F. Increased serum levels of some inflammatory markers in patients with multiple sclerosis. *Minerva Med.* (2014) **105** 229–235.
- Akpınar Z., Tokgoz S., Gokbel H., Okudan N., Uguz F., Yilmaz G. The association of nocturnal serum melatonin levels with major depression in patients with acute multiple sclerosis. *Psychiatry Res.* (2008) **161** 253–257.
- Neeb L., Anders L., Euskirchen P., Hoffmann J., Reuter U. Methylprednisolone i.v. alters levels of CGRP and melatonin in cluster headache patients. *J. Headache Pain.* (2013) **14**(Suppl 1) P63.
- Linscheid P., Seboek D., Schaer D.J., Zulewski H., Keller U., Müller B. Expression and secretion of procalcitonin and calcitonin gene-related peptide by adherent monocytes and by macrophage-activated adipocytes. *Crit. Care Med.* (2004) **32** 1715–1721.
- Viswanathan M. Melatonin inhibits calcitonin gene-related peptide-induced vasodilation and increase in cAMP in rat middle cerebral arteries. *Eur. J. Pharmacol.* (2001) **415** 247–250.
- Kępczyńska K., Zajda M., Lewandowski Z., Przedlacki J., Zakrzewska-Pniewska B. Bone metabolism and vitamin D

- status in patients with multiple sclerosis. *Neurol. Neurochir. Pol.* (2016) **50** 251–257.
- 17 Ladizesky M.G., Cutrera R.A., Boggio V. et al. Effect of melatonin on bone metabolism in ovariectomized rats. *Life Sci.* (2001) **70** 557–565.
- 18 Ostrowska Z., Kos-Kudla B., Nowak M. et al. The relationship between bone metabolism, melatonin and other hormones in sham-operated and pinealectomized rats. *Endocr. Regul.* (2003) **37** 211–224.
- 19 Ladizesky M.G., Boggio V., Cutrera R.A. et al. Melatonin effect on bone metabolism in rats treated with methylprednisolone. *J. Pineal Res.* (2006) **40** 297–304.
- 20 Dionyssiotis Y. Bone loss and fractures in multiple sclerosis: focus on epidemiologic and physiopathological features. *Int. J. Gen. Med.* (2011) **4** 505–509.
- 21 Sharan K., Lewis K., Furukawa T., Yadav V.K. Regulation of bone mass through pineal-derived melatonin-MT2 receptor pathway. *J. Pineal Res.* (2017) **63** e12423.
- 22 Han Y., Kim Y.-M., Kim H.S., Lee K.Y. Melatonin promotes osteoblast differentiation by regulating Osterix protein stability and expression. *Sci. Rep.* (2017) **7** 5716.
- 23 Zhou L., Chen X., Yan J. et al. Melatonin at pharmacological concentrations suppresses osteoclastogenesis via the attenuation of intracellular ROS. *Osteoporos. Int.* (2017) **28** 3325–3337.
- 24 Moen S.M., Celius E.G., Sandvik L. et al. Bone turnover and metabolism in patients with early multiple sclerosis and prevalent bone mass deficit: a population-based case-control study. *PLoS ONE* (2012) **7** e45703.

Discussion 1

Cette étude suggère que proCT pourrait être un biomarqueur chez les patients atteints de SEP, car les patients atteints de SEP présentaient une augmentation significative du taux de proCT par rapport aux sujets en bonne santé et que les taux sériques de proCT et de mélatonine étaient inversement corrélés chez ces patients.

Récemment, il a été déjà démontré que le niveau de proCT et le TNF- α , un régulateur central de l'inflammation, étaient significativement élevée chez les patients atteints de SEP par rapport aux sujets sains [364]. En fait, nos données sont en accord avec plusieurs études, montrant une diminution des niveaux de métallisation chez les patients atteints de SEP, inversement corrélée à la gravité de la maladie [303]. En revanche, des taux sériques élevés de mélatonine ont été observés chez des patients atteints de céphalées en grappe traités avec la méthylprédnisolone, alors que le taux de peptide lié au gène de la calcitonine (CGRP), un membre de la famille, était significativement réduit [366]. Il convient de noter que CGRP et proCT sont des variantes d'épissage de produits géniques de la calcitonine-I (CALC-I) [367]. En fait, une étude récente sur la vasodilatation induite par le CGRP dans les artères cérébrales moyennes du rat suggère que la mélatonine pourrait agir en tant que modulateur physiologique du CGRP [368]. Enfin, il a déjà été signalé que le sérum proCT est un marqueur cliniquement important de l'inflammation systémique et de la sepsie chez les patients gravement malades et pourrait également constituer un biomarqueur potentiel dans les maladies auto-immunes systémiques [365]. Certaines études ont rapporté une ostéopénie ou une ostéoporose chez des patients atteints de SEP [369]. Une étude sur le métabolisme osseux chez des rats ovariectomisés ont montré que le traitement à la mélatonine modifiait le remodelage osseux [370]. La pinéalectomie et le traitement de la mélatonine à long terme ont également eu un effet sur le métabolisme osseux. Ils influent, par un mécanisme inconnu, sur le rythme circadien du métabolisme osseux en modifiant le taux sériques de diverses hormones notamment de la calcitonine (CT) [371]. De plus, il a été confirmé que la mélatonine diminue la résorption osseuse et a un effet protecteur des os [372]. Cette étude a montré, pour la première fois que l'induction d'EAE provoque une élévation des taux sériques de proCT, qui a été supprimée par le traitement à la mélatonine. D'autre part, l'induction d'EAE a entraîné une diminution des taux sériques de la vitamine D, de calcium et d'OCN, qui pourraient constituer des facteurs de risque d'ostéoporose chez les patients atteints de SEP [373]. Cependant, les taux sériques de ces marqueurs est revenu à des niveaux presque normaux grâce au traitement à la mélatonine. Des études antérieures ont montré que la mélatonine affecte

les ostéoblastes à des concentrations physiologiques et les ostéoclastes à des concentrations pharmacologiques. Par exemple, Sharan *et al.* [374] ont rapporté qu'à des concentrations 10 ou de 100 mg/kg de poids corporel, la mélatonine augmentait le nombre d'ostéoblastes et la formation d'os. De même, Han *et al.* [375] ont montré que la mélatonine, à la dose physiologique de 1 μ M, stimule la différenciation des ostéoblastes dans les cellules C2C12 en activant Osterix et en augmentant l'expression des gènes de la phosphatase alcaline (ALP), de la sialoprotéine osseuse (BSP) et de l'OCN. En accord, nos données suggèrent que la SEP favorise l'ostéoporose, à mesure que le taux de formation osseuse diminue, tandis que la mélatonine à une concentration physiologique de 10 mg/kg/jour augmente la formation osseuse en augmentant les niveaux d'OCN *in vivo*. En revanche, Zhou *et al.* [376] ont rapporté qu'à des doses pharmacologiques comprises entre 1 et 100 μ M la mélatonine inhibe l'ostéoclastogenèse dans les cellules souches mésenchymateuses (MSC). Bien que la formation et le métabolisme osseux n'aient pas été étudié dans la SEP, une étude cas-témoin basée sur une population ciblant les patients nouvellement diagnostiqués avec le syndrome cliniquement isolé (CIS) ou SEP [377]. Cette étude n'a montré aucune différence significative entre les facteurs osseux à ce stade de la SEP, y compris la phosphatase alcaline osseuse (b-ALP), la 25-hydroxy et la 1,25-dihydroxyvitamine D, calcium et hormone parathyroïdienne (PTH). De plus, le remodelage osseux et le métabolisme ne différaient pas de manière significative chez les patients atteints de SIC et de SEP par rapport aux témoins, tandis que les glucocorticoïdes systémiques, l'alcool, la fumée, et d'autres facteurs ont différencié de manière significative entre les patients atteints de SEP et les sujets en bonne santé. En revanche, notre étude a montré que la formation et le métabolisme osseux différaient d'une façon significative entre EAE et les souris de contrôle. En fait, nous pensons que les facteurs mentionnés ci-dessus dans l'étude de Moen *et al.* sont des facteurs de confusion qui ont influencé la formation et le métabolisme osseux [377]. En effet, éliminer ces facteurs dans notre étude conduit à des résultats différents et a confirmé l'existence d'une corrélation entre SEP et déficit osseux. D'autres études expérimentales et des études basées sur la population sont nécessaires pour mieux comprendre le métabolisme osseux chez les patients atteints de SEP. Par ailleurs, bien que la mélatonine soit bien étudiée dans la SEP et participe à diverses activités biologiques, son rôle dans le métabolisme osseux n'est pas bien compris. La mélatonine et le proCT ont toujours été étudiés séparément, cependant, notre étude a montré une corrélation inverse entre eux chez les patients atteints de SEP. Nous avons également démontré un rôle bénéfique du traitement à la mélatonine en réduisant le risque d'ostéoporose chez les souris EAE. Cette nouvelle découverte ouvre la porte à l'étude du rôle de la mélatonine dans le métabolisme osseux et dans les modifications du taux de proCT chez les patients atteints de SEP à différents stades de la maladie. Enfin, la réponse de proCT

aux médicaments contre la SEP pourrait être utilisée comme un nouveau biomarqueur dans la SEP.

PUBLICATION N°2

Le traitement à la mélatonine module le métabolisme cérébral et améliore la remyélinisation en augmentant le niveau de PDK4 dans un modèle de souris de la sclérose en plaques.

Majid Ghareghani^{1, 2}, **Linda Scavo**^{3, 4}, Yahya Jand⁵, Naser Farhadi², Hossein Sadeghi⁶, Amir Ghanbari², Stefania Mondello^{7, 8}, Damien Arnoult⁴, Sajjad Ghareghani⁹ et Kazem Zibara^{3, 10}.

1 Centre de recherche sur le cerveau CERVO, Québec, QC, Canada.

2 Centre de recherche cellulaire et moléculaire, Université de Yasuj des sciences médicales, Yasuj, Iran,

3 Plateforme de recherche et d'analyse en sciences et environnement (PRASE), Université Libanaise, Beyrouth, Liban,

4 INSERM U 1197, Laboratoire de cellules souches, transplantation et immunorégulation, Villejuif, France,

5 Département de pharmacologie, Faculté de médecine, Université des sciences médicales de Téhéran, Téhéran, Iran,

6 Centre de recherche sur les plantes médicinales, Université des sciences médicales de Yasuj, Yasuj, Iran,

7 Département des sciences biomédicales et dentaires et imagerie morphofonctionnelle, Université de Messine, Messine, Italie,

8 Institut de recherche Oasi - IRCCS, Troina, Italie,

9 Laboratoire de bio-informatique et de conception de médicaments, Institut de biochimie et de biophysique, Université de Téhéran, Téhéran, Iran.

10 Département de biologie, Faculté des sciences I, Université libanaise, Beyrouth, Liban.

Frontiers in pharmacology, **publié**

Introduction 2

La sclérose en plaques ou SEP est une maladie complexe caractérisée par une inflammation et une démyélinisation du système nerveux central (SNC) [362]. Des troubles métaboliques ont été impliqués dans les maladies démyélinisantes, y compris la SEP. Ces altérations métaboliques ont été étudiées en relation avec les multiples processus physiologiques liant la fonction mitochondriale, la myéline et l'inflammation [324]. Parmi les voies métaboliques, il y a la synthèse des lipides qui est un processus critique pour la remyélinisation car les lipides et le cholestérol sont des composantes clés de la myéline et que leur synthèse accrue est liée au mécanisme thérapeutique des médicaments contre la SEP [325]. Récemment, la mélatonine, une hormone naturelle, a été introduite en tant qu'un puissant candidat neuroprotecteur pour réduire la perte de myéline et améliorer les résultats de la SEP [304, 309, 378]. Par conséquent, l'étude des effets de la mélatonine sur la myélinisation et le métabolisme mitochondrial dans la SEP constitue un domaine de recherche important. Bien que certains facteurs immunologiques, génétiques et environnementaux aient été identifiés et associés avec la SEP, les mécanismes moléculaires et biochimiques sous-jacents à cette pathologie ne sont pas entièrement compris

Dans cette étude, le traitement à la mélatonine, à des doses physiologiques ou pharmacologiques, a été utilisé dans un modèle de souris expérimental encéphalomyélite auto-immune (EAE) pour étudier le métabolisme cérébral au niveau des oligodendrocytes. Les résultats ont montré que la mélatonine diminuait les scores d'invalidité neurologique et augmentait la remyélinisation en augmentant de manière significative les taux de protéines de myéline tels que la MBP, le MOG et la MOBP. De plus, l'administration de mélatonine a atténué l'inflammation en réduisant les cytokines pro-inflammatoires (IL-1 β et TNF- α) et en augmentant les cytokines anti-inflammatoires (IL-4 et IL-10). De plus, la mélatonine a augmenté de manière significative les concentrations cérébrales de lactate, de N-acétylaspartate (NAA) et de 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-coenzyme-A réductase (HMGCR). Enfin, les niveaux d'expression de l'ARNm et de la protéine PDK-4 ont augmenté chez les souris traitées à la mélatonine, comparativement aux souris EAE non traitées, tandis que les enzymes PDC actives et totales ont été significativement réduites. Bien que l'activité de la PDC ait été réduite par la mélatonine, elle a entraîné une réduction des médiateurs inflammatoires tout en stimulant l'oligodendrogenèse, suggérant que les oligodendrocytes sont obligés d'utiliser une autre voie pour synthétiser les acides gras en vue de la remyélinisation. Nous proposons que la combinaison de la mélatonine et d'inhibiteurs de PDK4 puisse procurer aux patients atteints de SEP plus d'avantages

que l'utilisation du traitement à la mélatonine seule.

En résumé, notre étude suggère que la mélatonine pourrait agir pour maintenir le métabolisme énergétique cellulaire, moduler la neuroinflammation et améliorer la remyélinisation. Le couplage de la mélatonine et des inhibiteurs de PDK4 pourrait améliorer les bénéfices procurés par l'utilisation de la thérapie à la mélatonine seule chez les patients atteints de SEP.



Melatonin Therapy Modulates Cerebral Metabolism and Enhances Remyelination by Increasing PDK4 in a Mouse Model of Multiple Sclerosis

Majid Ghareghani^{1,2†}, Linda Scavo^{3,4†}, Yahya Jand⁵, Naser Farhadi², Hossein Sadeghi⁶, Amir Ghanbari², Stefania Mondello^{7,8}, Damien Arnoult⁴, Sajjad Gharaghani^{9*} and Kazem Zibara^{3,10*}

¹ CERVO Brain Research Center, Quebec City, QC, Canada, ² Cellular and Molecular Research Center, Yasuj University of Medical Sciences, Yasuj, Iran, ³ Platform of Research and Analysis in Sciences and Environment (PRASE), Lebanese University, Beirut, Lebanon, ⁴ INSERM U 1197, Laboratory of Stem Cells, Transplantation and Immunoregulation, Villejuif, France, ⁵ Department of Pharmacology, School of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran, ⁶ Medicinal Plants Research Center, Yasuj University of Medical Sciences, Yasuj, Iran, ⁷ Department of Biomedical and Dental Sciences and Morphofunctional Imaging, University of Messina, Messina, Italy, ⁸ Oasi Research Institute – IRCCS, Troina, Italy, ⁹ Laboratory of Bioinformatics and Drug Design, Institute of Biochemistry and Biophysics, University of Tehran, Tehran, Iran, ¹⁰ Biology Department, Faculty of Sciences-I, Lebanese University, Beirut, Lebanon

OPEN ACCESS

Edited by:

Rafael Franco,
University of Barcelona, Spain

Reviewed by:

Hanan Awad Alkozi,
Complutense University of Madrid,
Spain
Eva Martínez-Pinilla,
Universidad de Oviedo Mieres, Spain

*Correspondence:

Sajjad Gharaghani
s.gharaghani@ut.ac.ir
Kazem Zibara
kzibara@ul.edu.lb

[†]These authors have contributed
equally to this work

Specialty section:

This article was submitted to
Neuropharmacology,
a section of the journal
Frontiers in Pharmacology

Received: 26 November 2018

Accepted: 08 February 2019

Published: 28 February 2019

Citation:

Ghareghani M, Scavo L, Jand Y,
Farhadi N, Sadeghi H, Ghanbari A,
Mondello S, Arnoult D, Gharaghani S
and Zibara K (2019) Melatonin
Therapy Modulates Cerebral
Metabolism and Enhances
Remyelination by Increasing PDK4 in
a Mouse Model of Multiple Sclerosis.
Front. Pharmacol. 10:147.
doi: 10.3389/fphar.2019.00147

Metabolic disturbances have been implicated in demyelinating diseases including multiple sclerosis (MS). Melatonin, a naturally occurring hormone, has emerged as a potent neuroprotective candidate to reduce myelin loss and improve MS outcomes. In this study, we evaluated the effect of melatonin, at both physiological and pharmacological doses, on oligodendrocytes metabolism in an experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) mouse model of MS. Results showed that melatonin decreased neurological disability scores and enhanced remyelination, significantly increasing myelin protein levels including MBP, MOG, and MOBP. In addition, melatonin attenuated inflammation by reducing pro-inflammatory cytokines (IL-1 β and TNF- α) and increasing anti-inflammatory cytokines (IL-4 and IL-10). Moreover, melatonin significantly increased brain concentrations of lactate, N-acetylaspartate (NAA), and 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme-A reductase (HMGCR). Pyruvate dehydrogenase kinase-4 (PDK-4) mRNA and protein expression levels were also increased in melatonin-treated, compared to untreated EAE mice. However, melatonin significantly inhibited active and total pyruvate dehydrogenase complex (PDC), an enzyme under the control of PDK4. In summary, although PDC activity was reduced by melatonin, it caused a reduction in inflammatory mediators while stimulating oligodendrogenesis, suggesting that oligodendrocytes are forced to use an alternative pathway to synthesize fatty acids for remyelination. We propose that combining melatonin and PDK inhibitors may provide greater benefits for MS patients than the use of melatonin therapy alone.

Keywords: multiple sclerosis, melatonin, pyruvate dehydrogenase kinase, pyruvate dehydrogenase complex, myelin

INTRODUCTION

Multiple sclerosis (MS) is a complex disease characterized by inflammation and demyelination in the central nervous system (CNS), affecting approximately 2.5 million people worldwide (Hagemeyer et al., 2012). Although some immunological, genetic, and environmental factors have been identified and associated with MS, the molecular and biochemical mechanisms underlying this pathology are not fully understood. In fact, MS has been shown to cause neurodegeneration through different mechanisms including oxidative stress, activation of microglia and astrocytes, impairment in energy state and metabolism, and other processes (Mahad et al., 2015; Heidker et al., 2017; Kawachi and Lassmann, 2017). In addition, different kinds of immune cell mediators are involved in the pathogenesis of MS. Indeed, through diverse collections of T cells, the entire inflammatory infiltrate of the demyelinated area was shown to be eliminated by down-regulation of proinflammatory cytokines and up-regulation of suppressive cytokines in an animal model of MS (Brocke et al., 1996; Steinman, 1996). Current therapies are using medications to suppress immunological attacks on myelin, without suppressing the entire immune system (Steinman, 1996). Moreover, metabolic alterations in MS have been investigated in relation to the multiple pathophysiological processes linking mitochondrial function, myelin, and inflammation (Kalman et al., 2007). Among metabolic pathways, lipid synthesis is a critical process for remyelination since lipids and cholesterol are key components of myelin and their increased synthesis has been related to the therapeutic mechanism of MS medications (Sedel et al., 2016). Fatty acid (FA) synthesis and/or lipid availability are considered to be rate-limiting steps for myelin synthesis, as inhibition of cholesterol synthesis caused hypomyelination and delayed myelination in mice (Saher et al., 2005). In order to be clinically effective, therapeutic agents of MS need to have broad neuroprotective effects targeting these multiple mechanisms.

Recently, melatonin, a naturally occurring hormone secreted by the pineal gland, has been introduced as a promising neuroprotective candidate to improve MS outcomes (Sandyk, 1993; Kang et al., 2001; Melamud et al., 2012; Alvarez-Sanchez et al., 2015; Chen et al., 2016). Melatonin has been reported to exert its beneficial effects by reducing oxidative stress (Tan et al., 2007), modulating energy metabolism (Leon et al., 2004), and attenuating apoptosis and inflammatory response (Altun and Ugur-Altun, 2007). Importantly, melatonin is selectively taken up by mitochondrial membranes (Srinivasan et al., 2011), where it seems to accumulate in high concentrations (Martin et al., 2000), preserving their integrity and improving their function. Therefore, studying the effects of melatonin on myelination and mitochondrial metabolism in MS represents an important area of investigation.

It has been previously shown that melatonin protects against experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) by controlling peripheral and central T effector/regulatory responses (Alvarez-Sanchez et al., 2015) or through suppression of intercellular adhesion molecule-1 (Kang et al., 2001) in adult mouse or rat models of EAE. In contrast, we recently reported a negative impact for melatonin on EAE recovery

of young rats, suggesting a relationship between age and the development of EAE (Ghareghani et al., 2017a). Indeed, administration of 10 mg/kg/day of melatonin to 5–6 weeks old rats caused an increase in pro-inflammatory cytokine levels and activation of astrocytes, which seemed to delay the remyelination process by increasing the accumulation of lactate. Our previous studies on the mouse EAE model showed that exogenous melatonin reduced the oxidative stress while increasing the antioxidant enzymatic activity resulting into promoting oligodendrogenesis (Ghareghani et al., 2018b). It should be noted that we recently showed, for the first time, that melatonin increased oligodendrocyte differentiation from neural stem cells *in vitro* (Ghareghani et al., 2017b). Interestingly, melatonin was previously shown to reduce the levels of microglial activation and oligodendroglial maturation in an injury model of the White Matter (Olivier et al., 2009).

Furthermore, the beneficial role of melatonin at the clinical level was confirmed in Relapsing Remitting MS by attenuating the levels of pro-inflammatory cytokines and oxidative stress (Sánchez-López et al., 2008). In addition, studies on demyelinated diseases showed that melatonin exerts its neuroprotective effects through activation of the Nrf2/ARE pathway, a key defense regulator against oxidative stress in the body (Long et al., 2018).

In this study, in order to further investigate the effect of melatonin on energy metabolism, we used the EAE mouse model to assess any alterations in mitochondrial function and metabolic enzymes as well as the expression of demyelination and inflammatory mediators. Our results demonstrated that pathological findings were substantially improved by melatonin therapy, which was found to modulate cerebral metabolism and to enhance the remyelination process.

MATERIALS AND METHODS

Experimental Animals

Adult female C57BL/6 mice (6–8 weeks old, 20–25 g), were purchased from Iran Pasteur Institute (Pasteur's Institute, Tehran, Iran). The Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) of Tehran University approved all experimental procedures in this study. Mice were maintained and housed under pathogen-free conditions with constant temperature and humidity control at the Animal Breeding Center under a 14/10 light/dark cycle. Animal experimental procedures were carried out in accordance with the guidelines of the Iranian Agriculture Ministry, which conforms to the provisions of the Declaration of Helsinki (as revised in Brazil in 2013), and of the European Communities Council Directive (86/609/EEC).

EAE Induction

Mice were immunized with myelin oligodendrocyte glycoprotein peptide (MOG)_{35–55} (MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGK) purchased from Hooke Laboratories (Lawrence, MA, United States). MOG_{35–55} was emulsified in complete Freund's adjuvant (CFA, Sigma Aldrich), enriched Mycobacterium tuberculosis bacteria. Briefly, on day 1, each mouse was anesthetized with isoflurane (Abbott Labs, United States),

injected with 10 μ l of MOG emulsion subcutaneously over the flank and then injected intraperitoneally with 200 ng of pertussis toxin (PTX) (Hooke Laboratories, Lawrence, MA, United States), diluted in sterile PBS. On day 3, a second 200 ng booster PTX injection was given.

Clinical Evaluation of EAE Mice

Mice were evaluated and scored for clinical signs of the disease by at least 2 investigators from days 7 to 30 post-immunization using a 0–5 point scale (Nashold et al., 2013), as follows: 0 = no clinical disease; 0.5, partial tail paralysis; 1.0, complete tail paralysis or limp tail; 1.5, complete tail paralysis and partial paralysis one hind limb; 2.0, complete tail paralysis and partial paralysis of both hind limbs; 2.5, partial paralysis of one hind limb and complete paralysis of one hind limb; 3.0, paralysis of both hind limbs without forelimb weakness; 4.0, hind limbs and one forelimb paralysis; 5.0, moribund/dead. Mice were also weighed daily after immunization.

Treatment of Animals

Mice were randomly divided into 4 groups of: (A) Control phosphate buffered saline (PBS)-treated mice (Ctrl) ($n = 8$); (B) Vehicle PBS-treated EAE mice (Vehicle) ($n = 8$), (C) low-dose melatonin treated EAE mice (Low Mel) at physiological levels of 476 μ g/kg/day ($n = 8$), and (D) high-dose melatonin treated EAE mice (High Mel) at pharmacological levels of 10 mg/kg/day ($n = 8$). To be clinically relevant, treatment was given intraperitoneally (i.p.) for 13 consecutive days (from days 18 to 30), starting on the day of clinical symptom onset (score ≥ 3), until sacrifice at day 30. All treatments were done between 8:00 and 9:00 AM, when melatonin level is at its lowest. On the other hand, mice were sacrificed at day 30, 11–12 h after the last treatment, before the onset of darkness. Melatonin (Sigma-Aldrich, United States) was freshly prepared by dissolving it in PBS and 5% dimethyl sulfoxide (DMSO) then administered at the doses described above. Physiological and pharmacological doses of Melatonin were chosen based on previous studies by Hamdi (1998) and Ghareghani et al. (2017a), respectively. Control, vehicle (EAE mice) and experimental groups all received the same percentage of 5% DMSO. The experimental procedures are schematized in **Figure 1A**.

Sample Preparation

Mice were anesthetized and then sacrificed by cervical dislocation and brain tissues quickly excised, immediately frozen on dry ice and stored at -80°C until further tests performed.

Quantifying Cytokines by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

The brain levels of pro-inflammatory cytokines IL-1 β and TNF- α and anti-inflammatory cytokines IL-4 and IL-10 were measured using ELISA kit in accordance with the manufacturer's instructions (R&D Systems, Minneapolis, MN and Abcam, United States).

High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

Brain homogenate samples were centrifuged at $40,000 \times g$ for 15 min, supernatants placed in an ice bath and neutralized to pH 4–5 with potassium hydroxide (KOH), and then pellets were weighed for analysis. Samples were centrifuged for another 15 min at $40,000 \times g$ for 15 min to sediment the precipitant, potassium perchlorate (KClO₄), which formed after neutralization with KOH. Supernatants were retained and filtered (0.2 μ m) before lyophilization. The chromatographic measurements of brain lactate and NAA were carried out with a KNAUER smartline High Performance Liquid Chromatography (HPLC) system equipped with micro vacuum degasser, LPG system, UV-VIS Detector (2550 was set at 220 nm) and a MZ ODS-C18 (250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m) column. The chromatographic calculations were performed using an EZCHROM elite system. Determination of lactate and NAA were performed by HPLC as previously described (Kehr, 1999; Shannon et al., 2016). The accuracy of extraction and determination of lactate and NAA in the brain were investigated using standard addition method.

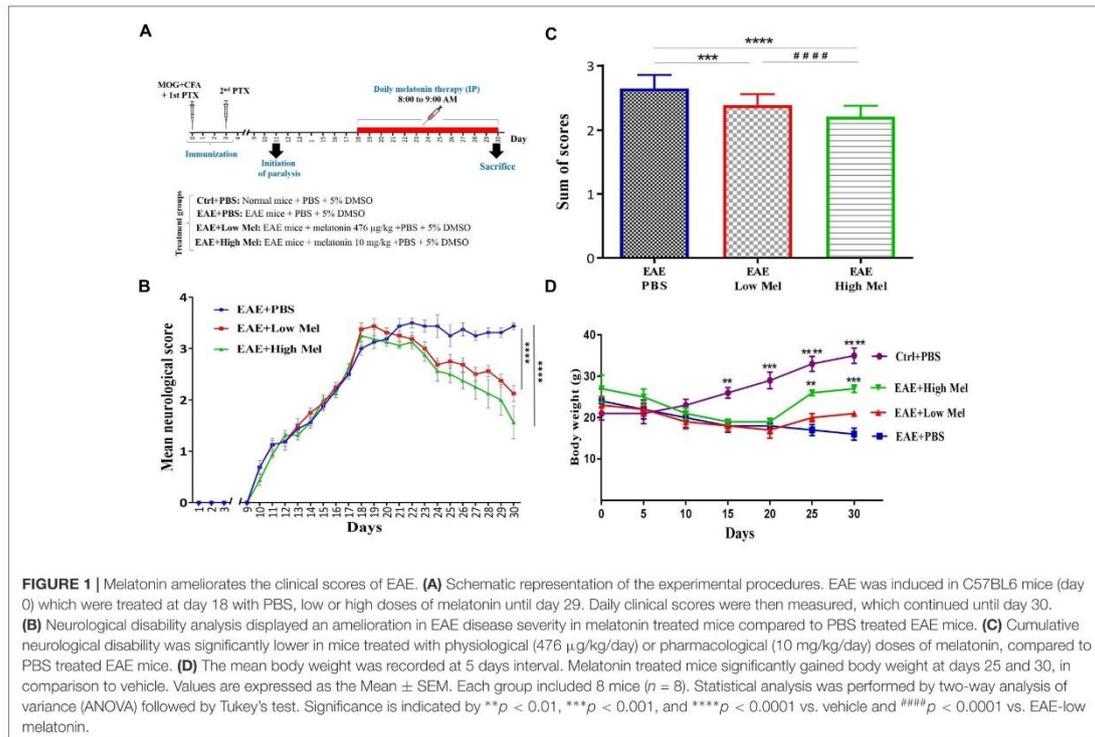
Western Blotting

Brain samples were homogenized on ice and lysed in a lysis buffer containing 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 0.5% deoxycholic acid, 1% Nonidet P40, 0.1% SDS, 1 mM PMSE, and 100 mg/ml leupeptin. Protein content was measured using a Bio-Rad colorimetric protein assay kit (Bio-Rad, United States). An equal amount of total protein (40 μ g) was resolved on 8–15% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel and then transferred onto a nitrocellulose membrane. The membranes were blocked for 1 h in 5% skim milk solution, and then incubated with primary antibodies against myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG; 1:500, Abcam, United States), myelin-associated oligodendrocytic basic protein (MOBP; 1:500, Abcam), myelin basic protein (MBP; 1:500, Abcam), Pyruvate Dehydrogenase Kinase isoform 4 (PDK4, 1:600, Abcam), and β -actin (1:1000, Santa Cruz Biotechnology Inc., United States) for an overnight on shaker at 4°C . After washing, horseradish peroxidase-conjugated species appropriate secondary antibodies were incubated at room temperature.

Immunoreactive proteins were detected with an enhanced chemiluminescence Western blotting detection system. The relative density of the protein bands was scanned by densitometry using MyImage (SLB, Seoul, Korea), and quantified by image analysis software for gel documentation (LabWorks Software Version 3.0, UVP Inc., United States).

Real-Time PCR

Total RNA was isolated from brain homogenates using Tri-Reagent (Sigma-Aldrich, the Netherlands), according to the manufacturer's protocol. Then cDNA was synthesized with High-Capacity cDNA Reverse Transcription kit using random primers (Applied Biosystems, United States). Quantitative real-time PCR (qRT-PCR) was performed by the StepOne Real-Time PCR system (Applied Biosystems). Real-time



PCR was carried out with RealQ Plus 2x Master Mix Green (Ampliqon, Denmark) according to manufacturer's instructions. Primer sequences used were the following: PDK4 F, CCGCTTAGTGAACACTCCTTC, and R, TCTACAACTCTGACAGGGCTT; HMGCR F TGATTGGAGTTGGACCAT, and R, TGGCCAACTGACATGC. The specificity of PCR products was confirmed by melting curve analysis. The PCR conditions were as follows: initial activation at 95°C for 15 min, then 35 amplification cycles consisting of denaturation at 95°C for 15 s, annealing at 57°C for 30 s, and extension at 72°C for 30 s. The relative changes in gene expression levels were determined by the Comparative CT ($\Delta\Delta\text{CT}$) method. All reactions were performed in triplicate using β -actin as an internal control for normalization.

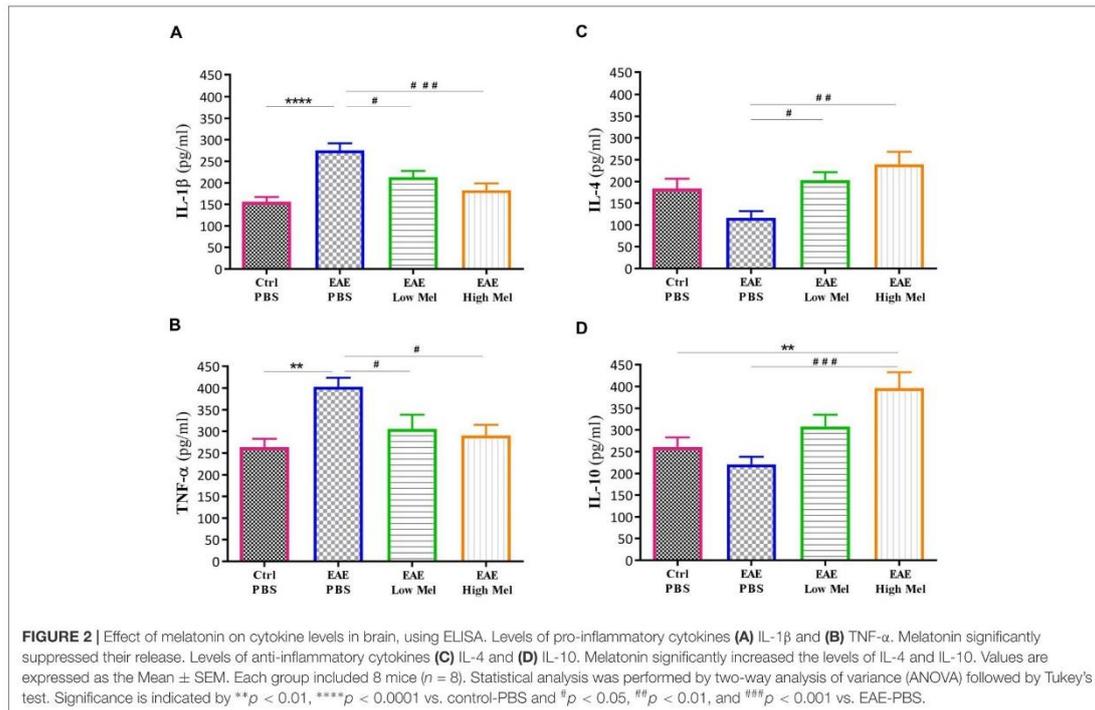
PDC Activity Determination

Pyruvate dehydrogenase complex (PDC) exists in two forms: dephosphorylated "active" and phosphorylated "inactive" forms. Inter-conversion between these forms can readily alter the flux through this complex. Hence, both activities were measured because it's more accurate to evaluate the change in PDC activity. Either active or total PDC activities were measured on ice freeze-thawed homogenates of brains of all groups on day 18, as described previously (Johnson et al., 2001; Pliss et al., 2004, 2013). PDC activity was determined by

production of $^{14}\text{CO}_2$ [^{1-14}C] from pyruvate. To preserve the "active" PDC activity, homogenizing buffer contained dichloroacetate (inhibitor of PDH kinases) and sodium fluoride (inhibitor of PDH phosphatases) (both from Santa Cruz Biotechnologies, United States). For measurement of "total" PDC activity, purified recombinant PDH phosphatase 1 was added to freeze-thawed homogenates and incubated for 30 min to dephosphorylate phospho-PDH. PDC activity is expressed as munits/mg protein.

Statistical Analysis

Results are presented as means with error bars indicating the standard error of the mean (Mean \pm SEM). There was no evidence for significant deviations from normal distribution ($p > 0.05$, Shapiro-Wilk test). RM two-way analysis of variance (ANOVA) and RM one-way ANOVA with the greenhouse-Geisser correction test, followed by Tukey's multiple comparisons test, were used for **Figures 1A,B**, respectively. On the other hand, ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test with a single pooled variance was used to analyze all other figures. All statistical tests were two-sided and the level of significance was set at $p < 0.05$. GraphPad Prism software version 6.01 (San Diego, CA, United States) was used to perform statistical analysis. Significance is indicated by $*p < 0.05$; $**p < 0.01$; $***p < 0.001$, and $****p < 0.0001$.



RESULTS

Melatonin Ameliorates Clinical Signs of EAE

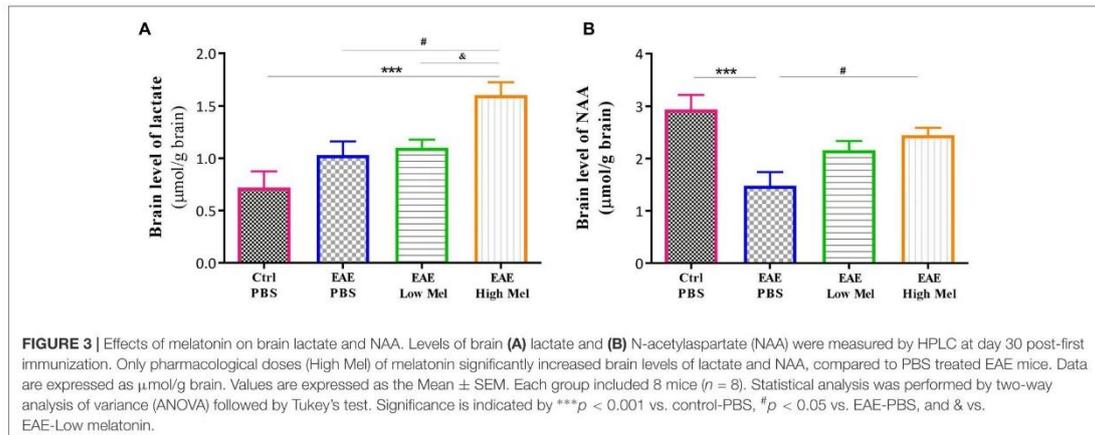
To assess whether melatonin ameliorates EAE severity, mice were treated by daily i.p. injections of melatonin at physiological (476 μ g/kg/day) or pharmacological doses (10 mg/kg/day), from day 18 post-first immunization until the end of the study at day 30. The disease course in this model exhibits a chronic progressive-relapsing phenotype. When compared to the vehicle group (EAE+PBS), both low and high melatonin treated EAE mice showed a significant reduction ($p < 0.0001$) in the severity of disease, starting at day 23 and which continued until day 30, as assessed by the analysis of clinical symptoms (Figure 1B). The peak mean clinical score in untreated EAE mice was as high as 3.5 at 30 days, which declined to 2.1 and 1.6 in low and high melatonin treated mice, respectively (Figure 1B). Moreover, cumulative neurological disability was significantly lower in mice treated with low or high melatonin, compared to untreated EAE mice ($p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively, Figure 1C). Furthermore, EAE mice showed significant and continuous body weight loss 15 days after immunization, in comparison to control mice (Figure 1D). In contrast, EAE mice treated with pharmacological doses of melatonin showed a significant gain in their body weight at days 25 and 30 ($**p < 0.01$, $***p < 0.001$, respectively), in comparison to vehicle (EAE+PBS) (Figure 1D).

Together, these results suggest that melatonin suppresses the development and progression of EAE.

Melatonin Attenuates Intracerebral Inflammation

To investigate the role of inflammation in melatonin-induced amelioration of the disease, key cytokines of both pro-inflammatory (IL-1 β and TNF- α) and anti-inflammatory (IL-4 and IL-10) pathways were evaluated in non-perfused CNS homogenates (Figure 2). Brain levels of IL-1 β and TNF- α were significantly higher in EAE mice at day 30, compared with controls ($p < 0.0001$ and $p < 0.01$, respectively, Figures 2A,B). However, both low- and high-dose melatonin treatment resulted in a substantial decrease in the levels of IL-1 β and TNF- α in comparison to the control EAE group ($p < 0.05$, Figures 2A,B).

On the other hand, the levels of IL-4 and IL-10 in untreated EAE mice were slightly, but not significantly, decreased compared with controls. However, IL-4 was significantly increased in low or high melatonin treatment ($p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively, Figure 2C), whereas IL-10 was only increased in high melatonin treated mice, compared to untreated EAE mice ($p < 0.001$, Figure 2D). Our results indicate that the beneficial effects of melatonin in EAE are linked to an inhibition of inflammatory cytokines and an enhanced production of anti-inflammatory cytokines, which tend to be dose-dependent.



High Melatonin Modulates Cerebral Energy Metabolism and Enhances Mitochondrial Dysfunction

To assess the effect of melatonin on brain metabolism and mitochondrial function, we measured brain lactate and N-acetyl aspartate (NAA). Lactate brain concentrations tended to be higher in EAE mice compared with controls, without reaching statistical significance (Figure 3A). Administration of high-dose, but not low-dose, melatonin resulted in a significant increase in brain lactate concentrations, in comparison to controls ($p < 0.001$) and untreated EAE mice ($p < 0.05$) (Figure 3A). On the other hand, NAA brain concentrations significantly decreased in untreated EAE mice, compared to the control group ($p < 0.001$, Figure 3B). However, high-, but not low-, melatonin treatment significantly increased NAA levels, compared to untreated EAE mice ($p < 0.05$, Figure 3B). Together, these results demonstrate that high-dose melatonin has an effect on cerebral energy metabolism and appears to reverse mitochondrial dysfunction.

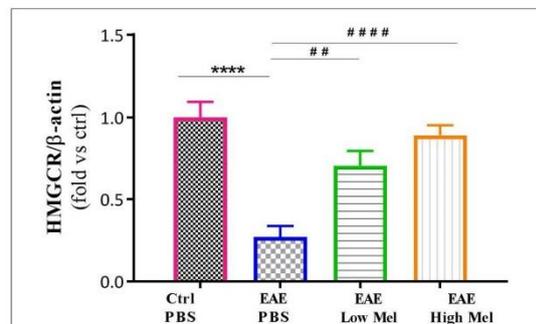
Melatonin Restores HMGCR Gene Expression Levels in the Brain

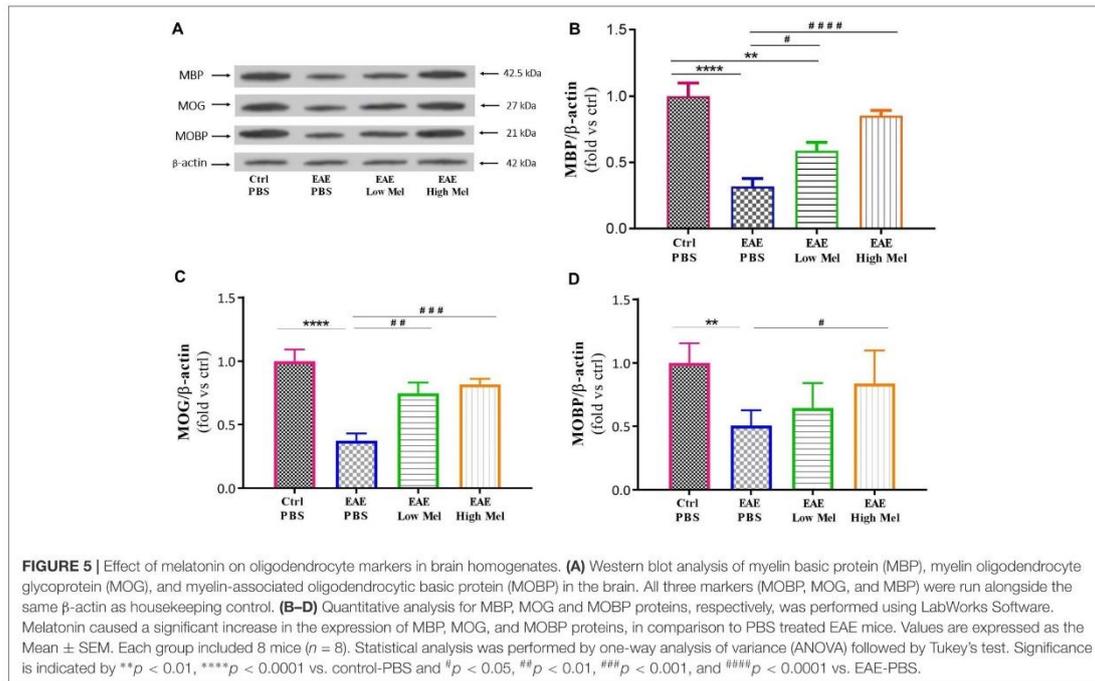
The effect of melatonin treatment was also investigated on a key enzyme in cholesterol biosynthesis, namely 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme-A reductase (HMGCR). Results indicated that HMGCR mRNA levels were significantly reduced in PBS treated EAE mice, compared to the control group ($p < 0.0001$, Figure 4). In contrast, low or high melatonin therapy significantly increased HMGCR levels, compared with untreated EAE mice, in a dose-dependent manner ($p < 0.01$ and $p < 0.0001$, respectively, Figure 4).

Melatonin Upregulates MBP, MOG, and MOBP Oligodendrocytic Markers

To test whether melatonin affects the protein expression levels of oligodendrocytic markers, brain lysates were used to perform

Western blot analysis on myelin basic protein (MBP), myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG), and myelin-associated oligodendrocytic basic protein (MOBP). Results showed a significant decrease in protein levels of MBP, MOG, and MOBP in untreated EAE mice, compared with controls ($p < 0.0001$, $p < 0.0001$, and $p < 0.01$, respectively) (Figures 5A–C). However, high-dose melatonin caused a significant increase in protein expression levels of MBP, MOG, and MOBP, compared to untreated EAE group (** $p < 0.001$, *** $p < 0.001$, and * $p < 0.05$, respectively) whereas low melatonin increased only MBP and MOG protein levels (* $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$, respectively, Figure 5). Therefore, administration of melatonin appears to induce the expression of oligodendrocytic proteins in EAE mice.





Melatonin Upregulates PDK4

The effect of melatonin on PDK4 mRNA expression levels was then investigated by quantitative real time-PCR. Induction of EAE mice did not affect PDK4 mRNA expression levels compared with controls at day 30 (**Figure 6A**). However, low- and high-dose melatonin treatment resulted in a significant ~ 2.8- and 3.6-fold increase in PDK4 mRNA levels, compared with untreated EAE mice ($p < 0.0001$; **Figure 6A**). Consistent with transcriptional data, Western-blot analysis showed ~2.3- and ~2.9-fold increase in PDK4 protein levels, compared with untreated EAE mice ($p < 0.001$; **Figure 6B**). Thus, these results indicated that melatonin is not only involved but also modulates brain glucose metabolism.

Melatonin Suppresses the Activity of PDC Enzyme

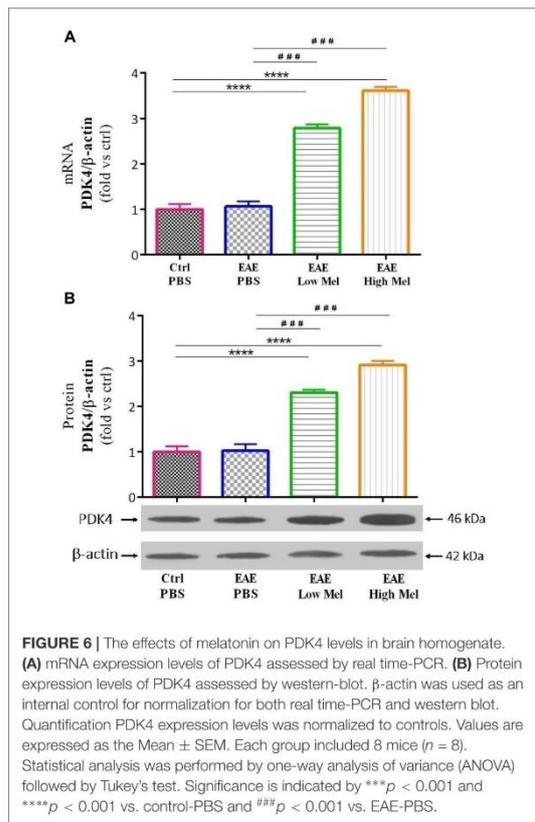
Both "Active" and "Total" PDC activities were then assayed in brain homogenates from mice at day 30 (**Figure 7**). PDC activity was found to be similar between untreated EAE and control mice. However, melatonin treatment caused a significant dose-dependent reduction in both "active" and "total" forms of PDC enzyme, compared with untreated EAE mice (**Figures 7A,B**).

DISCUSSION

In the current study, we demonstrated that administration of melatonin at physiological and pharmacological doses

ameliorates the severity of EAE by attenuating neuroinflammation, increasing the expression levels of mature oligodendrocytic markers and modulating cerebral energy metabolism, as summarized in **Figure 8**.

Melatonin was previously shown to be inversely correlated with the severity of MS and its relapse (Sandyk, 1993; Melamud et al., 2012). Several studies have indicated a beneficial role for melatonin in attenuating neuroinflammation and stimulating remyelination in adult EAE mouse and rat models of MS (Kang et al., 2001; Alvarez-Sanchez et al., 2015; Chen et al., 2016). Melatonin is also currently used in an open clinical trial in patients of MS (ClinicalTrials.gov identifier NCT03498131). In this study, the effects of melatonin therapy on the mechanisms of molecular immune polarization were investigated by measuring pro-inflammatory (TNF and IL-1 β) and anti-inflammatory (IL-4 and IL-10) cytokine levels in the mouse brain, previously shown to be linked to EAE disability and tissue destruction (Batoulis et al., 2010; Bernardes et al., 2013). Our data in this study confirmed our previous results that pharmacological doses of melatonin significantly recovered the decreased expression levels of IL-4 and IL10 in PBS-treated EAE mice while reducing the elevated levels of TNF and IL-1 β (Ghareghani et al., 2018a,b). Moreover, this study demonstrated that MBP and MOG, which are myelin-associated proteins localized on the surface of oligodendrocytes, showed marked reduction in EAE mice compared to controls. However, physiological or pharmacological doses of melatonin significantly increased the expression levels of these proteins, in comparison to the



PBS-treated EAE mice. Furthermore, MOBP, a major component of myelin in the periaxonal membrane and which modulates the radial growth of axon and myelin (Yool et al., 2002), has been previously reported to decrease in EAE mice (Carmody et al., 2002). Interestingly, our data in this study demonstrated that pharmacological doses of melatonin could increase MOBP expression, in comparison to EAE mice. While most previous research focused on the effect of melatonin on inflammatory mediators and its anti-oxidant and anti-apoptotic actions (Husson et al., 2002; Kilic et al., 2004; Leon et al., 2004; Tan et al., 2007; Welin et al., 2007; Gressens et al., 2008), the present study investigated its effect on metabolic pathways involved in cerebral metabolism and myelination. Our results showed, for the first time, that melatonin treatment increased PDK4 levels and suppressed PDC activity in an EAE mouse model of MS.

It has been reported that keeping PDC in an active state decreases lactate accumulation in body tissues (Parikh et al., 2009). Recently, we showed that administration of melatonin leads to an increase in serum lactate levels in young EAE Lewis rats (Ghareghani et al., 2017a). In the current study on EAE mouse model, melatonin therapy caused an increase in brain lactate levels, while PDC activity was suppressed. This

decrease in PDC activity could explain the mechanism by which lactate increases in response to melatonin. In fact, when coupled, oligodendrocytes and astrocytes take up glucose, lactate or pyruvate from peripheral blood vessels to generate metabolites to myelin-forming oligodendrocytes (Tress et al., 2012) as well as to provide energy to neurons in the form of lactate (Hirrlinger and Dringen, 2010). In fact, glucose needs to be converted, through glycolysis pathway, to pyruvate or lactate in order to provide metabolic support for axonal functions (Funfschilling et al., 2012; Lee et al., 2012). On the other hand, lactate, that has been fluxed from blood or astrocytes, is employed by oligodendrocytes as a main substrate to generate ATP and FA, which are required for myelin synthesis (Rinholm and Bergersen, 2014). However, pyruvate, obtained from lactate and glucose conversion or that has been fluxed from blood, needs first to be converted to acetyl-CoA, through the PDC enzyme, in order to produce metabolites for FA synthesis (Fransen et al., 2017).

Importantly, the activity of PDC is inhibited through phosphorylation by PDKs, especially isoform 4 (PDK4) (Jha et al., 2012). To date, only one study, using microarray analysis, has shown that melatonin administration increased PDK4 mRNA expression levels in mouse CNS (Sharman et al., 2007). In the current study, PDK4 mRNA and protein levels were found to be upregulated in the brain of melatonin treated EAE mice, associated with a reduction in PDC activity. Surprisingly, the suppression of PDC activity following melatonin therapy coincided with an increase in lactate levels, suggesting that the inability to convert pyruvate, as well as lactate, to acetyl-CoA leads to the accumulation of lactate in the CNS and peripheral blood. In agreement, we have recently demonstrated a significant accumulation of serum lactate levels following melatonin therapy (Ghareghani et al., 2017a). On the other hand, remyelination by oligodendrocytes needs FA synthesis from pyruvate that has been imported to mitochondrial matrix whereas myelin maintenance, after myelination, needs FA breakdown which occurs mainly within the peroxisomes by β -oxidation pathway (Rinholm and Bergersen, 2014). Indeed, the latter is a multistep process involving enzymes that are different from those in mitochondria. In fact, FAs first enter the cell via FA protein transporters (including FAT/CD36) present on the cell surface (Lopaschuk et al., 2010). Although the end products of peroxisomal and mitochondrial β -oxidation are different, however, peroxisomal β -oxidation can produce acetyl-CoA from long chain FAs. Indeed, FAs are converted to acetyl-carnitine which is then exported to cytosol where it can be converted to acetyl-CoA, to be used again as a substrate in FA and cholesterol synthesis (Wanders et al., 2015). Acetyl-CoA produced from β -oxidation cannot be converted to lactate, however, it has been suggested that pyruvate imported into the peroxisomes could yield lactate (McClelland et al., 2003). Considering that inhibition of FA synthesis by the PDC-dependent pathway leads to accumulation of pyruvate, it seems that this elevated level of pyruvate by PDC suppression increases peroxisomal β -oxidation. In accordance, administration of pyruvate was shown to increase peroxisomal β -oxidation, which also needs NAD⁺ originating from the conversion of pyruvate to lactate (McClelland et al., 2003). Therefore, lactate accumulation is obtained not only through

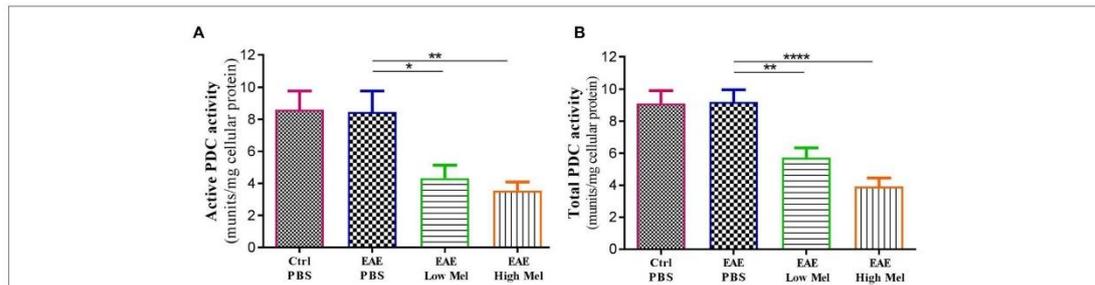


FIGURE 7 | The effects of melatonin on PDC activities in brain homogenates. The change in the activity of PDC enzyme was measured either at the (A) “active” or (B) “total” forms of PDC. Melatonin significantly decreased the activities of both PDC forms, in comparison to PBS treated EAE mice. Values are expressed as the Mean \pm SEM. Each group included 8 mice ($n = 8$). Statistical analysis was performed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey’s test. Significance is indicated by * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and **** $p < 0.0001$.

the suppression of pyruvate consumption by PDC, which in turn reduces lactate conversion to pyruvate through a negative feedback mechanism, but also through peroxisomes (Figure 8). Taken together, these observations demonstrate that melatonin affects the metabolic pathway involved in remyelination by increasing the myelination and attenuating the severity of EAE. Additional studies will be required to investigate the link between melatonin and FA synthesis, and to further assess their effects on myelination.

Cholesterol biosynthesis occurs principally (~95%) in the brain and is a main constituent of myelin sheath (Muse et al., 2001; Bjorkhem and Meaney, 2004; Dietschy, 2009). Therefore, we investigated 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme-A reductase (HMGCR), a key enzyme in cholesterol synthesis. Previous studies have shown that HMGCR is decreased at the peak of acute EAE disease (Lavrnja et al., 2017). However, we demonstrated that melatonin therapy significantly increased HMGCR levels. This observation suggests that cholesterol synthesis is not suppressed by melatonin but rather stimulated by it.

On the other hand, N-acetyl-aspartate (NAA), a nervous system-specific metabolite whose role has not been fully elucidated, appears to be a key link in biochemical features of CNS metabolism (Moffett et al., 2007) and to be involved in myelination and remyelination. Some studies suggested that neuronal NAA can be exported to oligodendrocytes where it is metabolized to form acetate and then acetyl-CoA, which are preferentially integrated into myelin (Hagenfeldt et al., 1987; Burri et al., 1991; Chakraborty et al., 2001). Previous studies confirmed that brain NAA levels are decreased in MS and that NAA precedes neuronal atrophy, indicating that mitochondrial dysfunction may precede neurodegeneration (Inglese et al., 2004; Cader et al., 2007). Moreover, NAA reduction has been correlated with disease progression and neurological decline in MS patients (Fu et al., 1998; Signoretti et al., 2001). In our study, high melatonin treatment reversed the decreases of NAA levels. Our results give further support to the hypothesis that melatonin enhances mitochondrial energy production and, possibly, remyelination. In accordance with our findings, partial

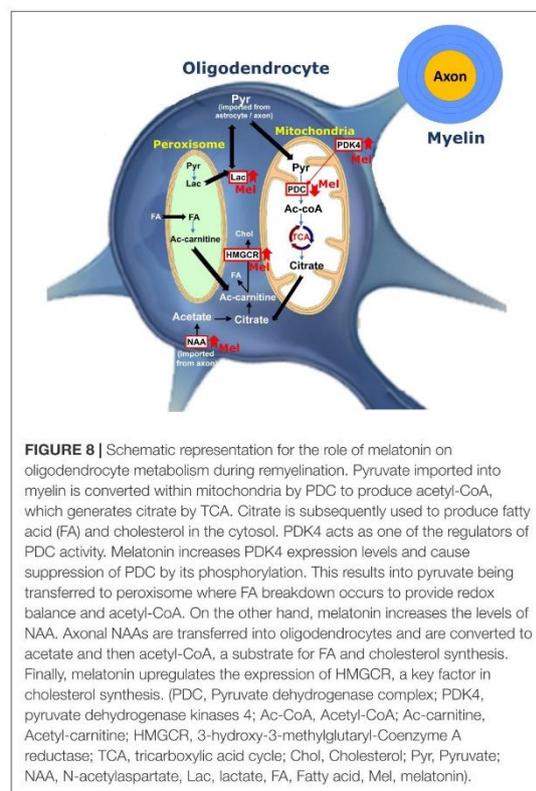


FIGURE 8 | Schematic representation for the role of melatonin on oligodendrocyte metabolism during remyelination. Pyruvate imported into myelin is converted within mitochondria by PDC to produce acetyl-CoA, which generates citrate by TCA. Citrate is subsequently used to produce fatty acid (FA) and cholesterol in the cytosol. PDK4 acts as one of the regulators of PDC activity. Melatonin increases PDK4 expression levels and cause suppression of PDC by its phosphorylation. This results into pyruvate being transferred to peroxisome where FA breakdown occurs to provide redox balance and acetyl-CoA. On the other hand, melatonin increases the levels of NAA. Axonal NAAs are transferred into oligodendrocytes and are converted to acetate and then acetyl-CoA, a substrate for FA and cholesterol synthesis. Finally, melatonin upregulates the expression of HMGCR, a key factor in cholesterol synthesis. (PDC, Pyruvate dehydrogenase complex; PDK4, pyruvate dehydrogenase kinases 4; Ac-CoA, Acetyl-CoA; Ac-carnitine, Acetyl-carnitine; HMGCR, 3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A reductase; TCA, tricarboxylic acid cycle; Chol, Cholesterol; Pyr, Pyruvate; NAA, N-acetylaspartate, Lac, lactate, FA, Fatty acid, Mel, melatonin).

recovery of NAA levels has also been reported in patients treated with interferon beta-1b (Narayanan et al., 2001), fluoxetine (Mostert et al., 2006), or glatiramer acetate (Khan et al., 2005).

Increasing evidence confirms that melatonin ameliorates EAE severity at different concentrations, albeit, the precise optimal

dose for this neuroprotective agent is still undefined. Thus, two different doses were used in this study. The “high – pharmacological” dose has been chosen based on our previous study on EAE rat model (Ghareghani et al., 2017a) whereas the “low – physiological” dose was used according to the previous work of Hamdi (1998).

The number of mitochondria increase in demyelinated axons of acute MS (Mahad et al., 2008), thus, the change of mitochondria numbers in untreated and melatonin treated mice remains to be determined. A limitation in the current study is that we used brain lysates which do not allow to determine the origin of the cells responsible for the measured factors. Further studies are needed to investigate these markers in specific cells including astrocytes, neurons, and oligodendrocytes. Moreover, to reach a precise conclusion on melatonin therapy, it is highly recommended to take into account the time of melatonin administration (between 17:00 and 19:00 in this study), the time of sampling (between 10:00 and 12:00 AM), the type of EAE model, the length and dose of melatonin therapy, the route of melatonin administration (i.p. in this study), the age and weight of mice or rats, and finally the protocol of EAE induction.

CONCLUSION

In conclusion, in the normal process of FA synthesis in remyelination, cells need acetyl-CoA as substrate which is obtained from pyruvate through the action of PDC (Figure 8). The latter is itself under the control of PDK4. However, in the current study, we observed that although melatonin suppressed the activity of PDC, a drawback of melatonin therapy, it still ameliorated EAE severity, both at physiological and pharmacological doses of melatonin. Indeed, melatonin

caused a reduction in inflammatory mediators while stimulating oligodendrogenesis, suggesting that oligodendrocytes are forced to use an alternative pathway to synthesize FAs for remyelination. This alternative pathway seems to be slower than the main PDC pathway of FA synthesis. Both the source of the alternative substrate and the mechanistic regulators for the substitute FA synthesis pathway are still unknown. Therefore, in order to increase the efficiency of melatonin therapy in EAE, MS or demyelination disorders, we suggest a new treatment strategy through the activation of PDC. This hypothesis would need further experimental and clinical studies by investigating, for instance, the synergistic effect of melatonin and a PDK inhibitor on EAE or MS.

DATA AVAILABILITY

The datasets generated for this study are available on request to the corresponding author.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

MG, SG, and KZ designed the study and interpreted results. MG, LS, YJ, NF, HS, AG, SM, and DA performed the experiments, collected the data, and helped in the analysis. MG and KZ wrote the manuscript. All authors have read, critically revised and approved the final manuscript before submission.

FUNDING

This work was funded by grants from Lebanese National Center of Scientific Research (L-NCSR) and the Lebanese University to KZ.

REFERENCES

- Altun, A., and Ugur-Altun, B. (2007). Melatonin: therapeutic and clinical utilization. *Int. J. Clin. Pract.* 61, 835–845. doi: 10.1111/j.1742-1241.2006.01191.x
- Alvarez-Sanchez, N., Cruz-Chamorro, I., Lopez-Gonzalez, A., Utrilla, J. C., Fernandez-Santos, J. M., Martinez-Lopez, A., et al. (2015). Melatonin controls experimental autoimmune encephalomyelitis by altering the T effector/regulatory balance. *Brain Behav. Immun.* 50, 101–114. doi: 10.1016/j.bbi.2015.06.021
- Batouli, H., Addicks, K., and Kuerten, S. (2010). Emerging concepts in autoimmune encephalomyelitis beyond the Cd4/Th1 paradigm. *Ann. Anat.* 192, 179–193. doi: 10.1016/j.aanat.2010.06.006
- Bernardes, D., Oliveira-Lima, O. C., Silva, T. V., Faraco, C. C., Leite, H. R., Juliano, M. A., et al. (2013). Differential brain and spinal cord cytokine and Bdnf levels in experimental autoimmune encephalomyelitis are modulated by prior and regular exercise. *J. Neuroimmunol.* 264, 24–34. doi: 10.1016/j.jneuroim.2013.08.014
- Bjorkhem, I., and Meaney, S. (2004). Brain cholesterol: long secret life behind a barrier. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 24, 806–815. doi: 10.1161/01.ATV.0000120374.59826.1b
- Brocke, S., Gijbels, K., Allegretta, M., Ferber, I., Piercy, C., Blankenstein, T., et al. (1996). Treatment of experimental encephalomyelitis with a peptide analogue of myelin basic protein. *Nature* 379, 343–346. doi: 10.1038/379343a0
- Burri, R., Steffen, C., and Herschkowitz, N. (1991). N-acetyl-L-aspartate is a major source of acetyl groups for lipid synthesis during rat brain development. *Dev. Neurosci.* 13, 403–411. doi: 10.1159/000112191
- Cader, S., Johansen-Berg, H., Wylezinska, M., Palace, J., Behrens, T. E., Smith, S., et al. (2007). Discordant white matter N-acetylaspartate and diffusion Mri measures suggest that chronic metabolic dysfunction contributes to axonal pathology in multiple sclerosis. *Neuroimage* 36, 19–27. doi: 10.1016/j.neuroimage.2007.02.036
- Carmody, R. J., Hilliard, B., Maguschak, K., Chodosh, L. A., and Chen, Y. H. (2002). Genomic scale profiling of autoimmune inflammation in the central nervous system: the nervous response to inflammation. *J. Neuroimmunol.* 133, 95–107. doi: 10.1016/S0165-5728(02)00366-1
- Chakraborty, G., Mekala, P., Yahya, D., Wu, G., and Ledeen, R. W. (2001). Intraneuronal N-acetylaspartate supplies acetyl groups for myelin lipid synthesis: evidence for myelin-associated aspartoacylase. *J. Neurochem.* 78, 736–745. doi: 10.1046/j.1471-4159.2001.00456.x
- Chen, S. J., Huang, S. H., Chen, J. W., Wang, K. C., Yang, Y. R., Liu, P. F., et al. (2016). Melatonin enhances interleukin-10 expression and suppresses chemotaxis to inhibit inflammation in situ and reduce the severity of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Int. Immunopharmacol.* 31, 169–177. doi: 10.1016/j.intimp.2015.12.020
- Dietschy, J. M. (2009). Central nervous system: cholesterol turnover, brain development and neurodegeneration. *Biol. Chem.* 390, 287–293. doi: 10.1515/BC.2009.035

- Fransen, M., Lismont, C., and Walton, P. (2017). The peroxisome-mitochondria connection: how and why? *Int. J. Mol. Sci.* 18:1126. doi: 10.3390/ijms18061126
- Fu, L., Matthews, P. M., De Stefano, N., Worsley, K. J., Narayanan, S., Francis, G. S., et al. (1998). Imaging axonal damage of normal-appearing white matter in multiple sclerosis. *Brain* 121(Pt 1), 103–113. doi: 10.1093/brain/121.1.103
- Funfschilling, U., Supplie, L. M., Mahad, D., Boretius, S., Saab, A. S., Edgar, J., et al. (2012). Glycolytic oligodendrocytes maintain myelin and long-term axonal integrity. *Nature* 485, 517–521. doi: 10.1038/nature11007
- Ghareghani, M., Dokoochaki, S., Ghanbari, A., Farhadi, N., Zibara, K., Khodadoust, S., et al. (2017a). Melatonin exacerbates acute experimental autoimmune encephalomyelitis by enhancing the serum levels of lactate: a potential biomarker of multiple sclerosis progression. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 44, 52–61. doi: 10.1111/1440-1681.12678
- Ghareghani, M., Sadeghi, H., Zibara, K., Danaei, N., Azari, H., and Ghanbari, A. (2017b). Melatonin increases oligodendrocyte differentiation in cultured neural stem cells. *Cell. Mol. Neurobiol.* 37, 1319–1324. doi: 10.1007/s10571-016-0450-4
- Ghareghani, M., Scavo, L., Arnoult, D., Zibara, K., and Farhadi, N. (2018a). Melatonin therapy reduces the risk of osteoporosis and normalizes bone formation in multiple sclerosis. *Fundam. Clin. Pharmacol.* 32, 181–187. doi: 10.1111/fcp.12337
- Ghareghani, M., Zibara, K., Sadeghi, H., and Farhadi, N. (2018b). Spasticity treatment ameliorates the efficacy of melatonin therapy in experimental autoimmune encephalomyelitis (eae) mouse model of multiple sclerosis. *Cell. Mol. Neurobiol.* 38, 1145–1151. doi: 10.1007/s10571-018-0580-y
- Gressens, P., Schwendemann, L., Husson, I., Sarkozy, G., Mocaer, E., Vamecq, J., et al. (2008). Agomelatine, a melatonin receptor agonist with 5-HT_{2C} receptor antagonist properties, protects the developing murine white matter against excitotoxicity. *Eur. J. Pharmacol.* 588, 58–63. doi: 10.1016/j.ejphar.2008.04.016
- Hagemeyer, K., Bruck, W., and Kuhlmann, T. (2012). Multiple sclerosis - remyelination failure as a cause of disease progression. *Histol. Histopathol.* 27, 277–287.
- Hagenfeldt, L., Bollgren, I., and Venizelos, N. (1987). N-acetylaspartic aciduria due to aspartoacylase deficiency—a new aetiology of childhood leukodystrophy. *J. Inher. Metab. Dis.* 10, 135–141. doi: 10.1007/BF01800038
- Hamdi, A. (1998). Melatonin administration increases the affinity of D2 dopamine receptors in the rat striatum. *Life Sci.* 63, 2115–2120. doi: 10.1016/S0024-3205(99)80008-3
- Heidker, R. M., Emerson, M. R., and Levine, S. M. (2017). Metabolic pathways as possible therapeutic targets for progressive multiple sclerosis. *Neural Regen. Res.* 12, 1262–1267. doi: 10.4103/1673-5374.213542
- Hirrlinger, J., and Dringen, R. (2010). The cytosolic redox state of astrocytes: maintenance, regulation and functional implications for metabolite trafficking. *Brain Res. Rev.* 63, 177–188. doi: 10.1016/j.brainresrev.2009.10.003
- Husson, I., Mesples, B., Bac, P., Vamecq, J., Evrard, P., and Gressens, P. (2002). Melatonin neuroprotection of the murine periventricular white matter against neonatal excitotoxic challenge. *Ann. Neurol.* 51, 82–92. doi: 10.1002/ana.10072
- Inglese, M., Ge, Y., Filippi, M., Falini, A., Grossman, R. I., and Gonen, O. (2004). Indirect evidence for early widespread gray matter involvement in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Neuroimage* 21, 1825–1829. doi: 10.1016/j.neuroimage.2003.12.008
- Jha, M. K., Jeon, S., and Suk, K. (2012). Pyruvate dehydrogenase kinases in the nervous system: their principal functions in neuronal-glia metabolic interaction and neuro-metabolic disorders. *Curr. Neuropharmacol.* 10, 393–403. doi: 10.2174/157015912804143586
- Johnson, M. T., Mahmood, S., Hyatt, S. L., Yang, H. S., Soloway, P. D., Hanson, R. W., et al. (2001). Inactivation of the murine pyruvate dehydrogenase (Pdh1) gene and its effect on early embryonic development. *Mol. Genet. Metab.* 74, 293–302. doi: 10.1006/mgme.2001.3249
- Kalman, B., Laitinen, K., and Komoly, S. (2007). The involvement of mitochondria in the pathogenesis of multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.* 188, 1–12. doi: 10.1016/j.jneuroim.2007.03.020
- Kang, J. C., Ahn, M., Kim, Y. S., Moon, C., Lee, Y., Wie, M. B., et al. (2001). Melatonin ameliorates autoimmune encephalomyelitis through suppression of intercellular adhesion molecule-1. *J. Vet. Sci.* 2, 85–89. doi: 10.4142/jvs.2001.2.2.85
- Kawachi, I., and Lassmann, H. (2017). Neurodegeneration in multiple sclerosis and neuromyelitis optica. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 88, 137–145. doi: 10.1136/jnnp-2016-313300
- Kehr, J. (1999). "Monitoring chemistry of brain microenvironment: biosensors, microdialysis and related techniques," in *Modern Techniques in Neuroscience Research*, eds U. Windhorst and H. Johansson (Heidelberg: Springer), 1149–1198.
- Khan, O., Shen, Y., Caon, C., Bao, F., Ching, W., Reznar, M., et al. (2005). Axonal metabolic recovery and potential neuroprotective effect of glatiramer acetate in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Mult. Scler.* 11, 646–651. doi: 10.1191/1352458505ms12340a
- Kilic, E., Kilic, U., Reiter, R. J., Bassetti, C. L., and Hermann, D. M. (2004). Prophylactic use of melatonin protects against focal cerebral ischemia in mice: role of endothelin converting enzyme-1. *J. Pineal Res.* 37, 247–251. doi: 10.1111/j.1600-079X.2004.00162.x
- Lavrnja, L., Smiljanic, K., Savic, D., Mladenovic-Djordjevic, A., Tesovic, K., Kanazir, S., et al. (2017). Expression profiles of cholesterol metabolism-related genes are altered during development of experimental autoimmune encephalomyelitis in the rat spinal cord. *Sci. Rep.* 7:2702. doi: 10.1038/s41598-017-02638-8
- Lee, Y., Morrison, B. M., Li, Y., Lengacher, S., Farah, M. H., Hoffman, P. N., et al. (2012). Oligodendroglia metabolically support axons and contribute to neurodegeneration. *Nature* 487, 443–448. doi: 10.1038/nature11314
- Leon, J., Acuna-Castroviejo, D., Sainz, R. M., Mayo, J. C., Tan, D. X., and Reiter, R. J. (2004). Melatonin and mitochondrial function. *Life Sci.* 75, 765–790. doi: 10.1016/j.lfs.2004.03.003
- Long, T., Yang, Y., Peng, L., and Li, Z. (2018). Neuroprotective effects of melatonin on experimental allergic encephalomyelitis mice via anti-oxidative stress activity. *J. Mol. Neurosci.* 64, 233–241. doi: 10.1007/s12031-017-1022-x
- Lopaschuk, G. D., Ussher, J. R., Folmes, C. D., Jaswal, J. S., and Stanley, W. C. (2010). Myocardial fatty acid metabolism in health and disease. *Physiol. Rev.* 90, 207–258. doi: 10.1152/physrev.00015.2009
- Mahad, D., Zibara, K., Lassmann, H., and Turnbull, D. (2008). Mitochondrial defects in acute multiple sclerosis lesions. *Brain* 131, 1722–1735. doi: 10.1093/brain/awn105
- Mahad, D. H., Trapp, B. D., and Lassmann, H. (2015). Pathological mechanisms in progressive multiple sclerosis. *Lancet Neurol.* 14, 183–193. doi: 10.1016/S1474-4422(14)70256-X
- Martin, M., Macias, M., Escames, G., Leon, J., and Acuna-Castroviejo, D. (2000). Melatonin but not vitamins C and E maintains glutathione homeostasis in t-butyl hydroperoxide-induced mitochondrial oxidative stress. *FASEB J.* 14, 1677–1679. doi: 10.1096/fj.99-0865fj
- McClelland, G. B., Khanna, S., Gonzalez, G. F., Butz, C. E., and Brooks, G. A. (2003). Peroxisomal membrane monocarboxylate transporters: evidence for a redox shuttle system? *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 304, 130–135. doi: 10.1016/S0006-291X(03)00550-3
- Melamud, L., Golan, D., Luboshitzky, R., Lavi, I., and Miller, A. (2012). Melatonin dysregulation, sleep disturbances and fatigue in multiple sclerosis. *J. Neurol. Sci.* 314, 37–40. doi: 10.1016/j.jns.2011.11.003
- Moffett, J. R., Ross, B., Arun, P., Madhavarao, C. N., and Nambodiri, M. A. A. (2007). N-acetylaspartate in the CNS: from neurodiagnostics to neurobiology. *Prog. Neurobiol.* 81, 89–131. doi: 10.1016/j.pneurobio.2006.12.003
- Mostert, J. P., Sijens, P. E., Oudkerk, M., and De Keyser, J. (2006). Fluoxetine increases cerebral white matter Naa/Cr ratio in patients with multiple sclerosis. *Neurosci. Lett.* 402, 22–24. doi: 10.1016/j.neulet.2006.03.042
- Muse, E. D., Jurevics, H., Toews, A. D., Matsushima, G. K., and Morell, P. (2001). Parameters related to lipid metabolism as markers of myelination in mouse brain. *J. Neurochem.* 76, 77–86. doi: 10.1046/j.1471-4159.2001.00015.x
- Narayanan, S., De Stefano, N., Francis, G. S., Arnautelis, R., Caramanos, Z., Collins, D. L., et al. (2001). Axonal metabolic recovery in multiple sclerosis patients treated with interferon beta-1b. *J. Neurol.* 248, 979–986. doi: 10.1007/s004150170052
- Nashold, F. E., Nelson, C. D., Brown, L. M., and Hayes, C. E. (2013). One calcitriol dose transiently increases Helios⁺ FoxP3⁺ T cells and ameliorates autoimmune demyelinating disease. *J. Neuroimmunol.* 263, 64–74. doi: 10.1016/j.jneuroim.2013.07.016

- Olivier, P., Fontaine, R. H., Loron, G., Van Steenwinckel, J., Biran, V., Massonneau, V., et al. (2009). Melatonin promotes oligodendroglial maturation of injured white matter in neonatal rats. *PLoS One*, 4:e7128. doi: 10.1371/journal.pone.0007128
- Parikh, S., Saneto, R., Falk, M. J., Anselm, I., Cohen, B. H., Haas, R., et al. (2009). A modern approach to the treatment of mitochondrial disease. *Curr. Treat. Options Neurol.* 11, 414–430. doi: 10.1007/s11940-009-0046-0
- Pliss, L., Hausknecht, K. A., Stachowiak, M. K., Dlugos, C. A., Richards, J. B., and Patel, M. S. (2013). Cerebral developmental abnormalities in a mouse with systemic Pyruvate dehydrogenase deficiency. *PLoS One* 8:e67473. doi: 10.1371/journal.pone.0067473
- Pliss, L., Pentney, R. J., Johnson, M. T., and Patel, M. S. (2004). Biochemical and structural brain alterations in female mice with cerebral pyruvate dehydrogenase deficiency. *J. Neurochem.* 91, 1082–1091. doi: 10.1111/j.1471-4159.2004.02790.x
- Rinholm, J. E., and Bergersen, L. H. (2014). White matter lactate—does it matter? *Neuroscience* 276, 109–116. doi: 10.1016/j.neuroscience.2013.10.002
- Saher, G., Brugger, B., Lappe-Siefke, C., Mobius, W., Tozawa, R., Wehr, M. C., et al. (2005). High cholesterol level is essential for myelin membrane growth. *Nat. Neurosci.* 8, 468–475. doi: 10.1038/nn1426
- Sánchez-López, A. L., Ortiz, G. G., Pacheco-Moises, F. P., Mireles-Ramírez, M. A., Bitzer-Quintero, O. K., Delgado-Lara, D. L., et al. (2018). Efficacy of melatonin on serum pro-inflammatory cytokines and oxidative stress markers in relapsing remitting multiple sclerosis. *Arch. Med. Res.* 49, 391–398. doi: 10.1016/j.arcmed.2018.12.004
- Sandyk, R. (1993). Multiple sclerosis: the role of puberty and the pineal gland in its pathogenesis. *Int. J. Neurosci.* 68, 209–225. doi: 10.3109/00207459308994277
- Sedel, F., Bernard, D., Mock, D. M., and Tourbah, A. (2016). Targeting demyelination and virtual hypoxia with high-dose biotin as a treatment for progressive multiple sclerosis. *Neuropharmacology* 110, 644–653. doi: 10.1016/j.neuropharm.2015.08.028
- Shannon, R. J., Van Der Heide, S., Carter, E. L., Jalloh, I., Menon, D. K., Hutchinson, P. J., et al. (2016). Extracellular N-acetylaspartate in human traumatic brain injury. *J. Neurotrauma* 33, 319–329. doi: 10.1089/neu.2015.3950
- Sharman, E. H., Bondy, S. C., Sharman, K. G., Lahiri, D., Cotman, C. W., and Perreau, V. M. (2007). Effects of melatonin and age on gene expression in mouse CNS using microarray analysis. *Neurochem. Int.* 50, 336–344. doi: 10.1016/j.neuint.2006.09.001
- Signoretto, S., Marmarou, A., Tavazzi, B., Lazzarino, G., Beaumont, A., and Vagnozzi, R. (2001). N-Acetylaspartate reduction as a measure of injury severity and mitochondrial dysfunction following diffuse traumatic brain injury. *J. Neurotrauma* 18, 977–991. doi: 10.1089/08977150152693683
- Srinivasan, V., Spence, D. W., Pandi-Perumal, S. R., Brown, G. M., and Cardinali, D. P. (2011). Melatonin in mitochondrial dysfunction and related disorders. *Int. J. Alzheimers Dis.* 2011:326320. doi: 10.4061/2011/326320
- Steinman, L. (1996). Multiple sclerosis: a coordinated immunological attack against myelin in the central nervous system. *Cell* 85, 299–302. doi: 10.1016/S0092-8674(00)81107-1
- Tan, D. X., Manchester, L. C., Terron, M. P., Flores, L. J., Tamura, H., and Reiter, R. J. (2007). Melatonin as a naturally occurring co-substrate of quinone reductase-2, the putative MT3 melatonin membrane receptor: hypothesis and significance. *J. Pineal Res.* 43, 317–320. doi: 10.1111/j.1600-079X.2007.00513.x
- Tress, O., Maglione, M., May, D., Pivneva, T., Richter, N., Seyfarth, J., et al. (2012). Panglial gap junctional communication is essential for maintenance of myelin in the Cns. *J. Neurosci.* 32, 7499–7518. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0392-12.2012
- Wanders, R. J., Waterham, H. R., and Ferdinandusse, S. (2015). Metabolic interplay between peroxisomes and other subcellular organelles including mitochondria and the endoplasmic reticulum. *Front. Cell Dev. Biol.* 3:83. doi: 10.3389/fcell.2015.00083
- Welin, A. K., Svedin, P., Lapatto, R., Sultan, B., Hagberg, H., Gressens, P., et al. (2007). Melatonin reduces inflammation and cell death in white matter in the mid-gestation fetal sheep following umbilical cord occlusion. *Pediatr. Res.* 61, 153–158. doi: 10.1203/01.pdr.0000252546.20451.1a
- Yool, D., Montague, P., McLaughlin, M., McCulloch, M. C., Edgar, J. M., Nave, K. A., et al. (2002). Phenotypic analysis of mice deficient in the major myelin protein Mobb, and evidence for a novel Mobb isoform. *Glia* 39, 256–267. doi: 10.1002/glia.10103

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2019 Ghareghani, Scavo, Jand, Farhadi, Sadeghi, Ghanbari, Mondello, Arnoult, Gharaghani and Zibara. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Discussion 2

Dans la présente étude, nous avons démontré que l'administration de mélatonine à des doses physiologiques et pharmacologiques atténue la gravité de l'EAE en atténuant la neuroinflammation, en augmentant les niveaux d'expression de marqueurs oligodendrocytaire matures et en modulant le métabolisme de l'énergie cérébrale. Il a déjà été démontré que la mélatonine était inversement corrélée à la gravité de la SEP et à sa rechute [309, 379]. Plusieurs études ont indiqué que la mélatonine pouvait jouer un rôle bénéfique dans l'atténuation de la neuroinflammation et dans la stimulation de la remyélinisation dans les modèles de SEP adultes chez la souris et le rat [304, 308, 378]. La mélatonine est actuellement utilisée dans un essai clinique ouvert chez des patients atteints de SEP (identificateur ClinicalTrials.gov NCT03498131). Il a été déjà démontré que les cytokines pro-inflammatoires (TNF- α et IL-1b) et anti-inflammatoires (IL-4 et IL-10) sont liées à le handicap et à la destruction des tissus chez les sujets atteints de SEP [380, 381], alors nous avons étudié l'effet du traitement de la mélatonine sur ces cytokines en mesurant leur niveau dans le cerveau de souris EAE C57BL/6. Nos données ont confirmé nos résultats antérieurs selon lesquels les doses pharmacologiques de mélatonine avaient permis de récupérer de manière significative les niveaux d'expression diminués d'IL-4 et d'IL-10 chez les souris EAE traitées au PBS, tout en réduisant les taux élevés de TNF et d'IL-1b [382, 383].

De plus, cette étude a démontré que la MBP et la MOG, protéines associées à la myéline localisées à la surface des oligodendrocytes, présentaient une réduction marquée du nombre de souris EAE par rapport aux témoins. Cependant, les doses physiologiques ou pharmacologiques de mélatonine ont considérablement augmenté les niveaux d'expression de ces protéines, par rapport aux souris EAE traitées au PBS. De plus, des études ont démontré que le MOBP, un composant majeur de la myéline dans la membrane péri axiale et qui module la croissance radiale de l'axone et de la myéline, diminuait chez les souris EAE [384, 385], nos données dans cette étude ont démontré que des doses pharmacologiques de mélatonine pourraient augmenter l'expression de MOBP par rapport aux souris EAE.

La plupart des recherches précédentes portaient sur l'effet de la mélatonine sur les médiateurs inflammatoires et ses actions anti-oxydantes et anti-apoptotiques [386-391], la présente étude a examiné son effet sur les voies métaboliques impliquées dans le métabolisme cérébral et la myélinisation. Nos résultats ont montré, pour la première fois, que ce traitement à la mélatonine augmentait les taux de PDK4 et supprimait l'activité de la PDC dans un modèle murin de souris EAE.

Il a été rapporté que maintenir la PDC dans un état actif diminue l'accumulation de lactate dans les tissus corporels [392]. Récemment, nous avons montré que l'administration de mélatonine entraînait une augmentation des taux de lactate sérique chez les jeunes rats EAE Lewis [383]. Dans la présente étude sur le modèle murin EAE, le traitement à la mélatonine a entraîné une augmentation des taux de lactate dans le cerveau, alors que l'activité de la PDC était inhibée. Cette diminution de l'activité de la PDC pourrait expliquer le mécanisme par lequel le lactate augmente en réponse à la mélatonine. En fait, lorsqu'ils sont couplés, les oligodendrocytes et les astrocytes absorbent le glucose, le lactate ou le pyruvate des vaisseaux sanguins périphériques pour générer des métabolites en oligodendrocytes producteurs de myéline [327], ainsi que pour fournir de l'énergie aux neurones sous forme de lactate [328]. En fait, le glucose doit être converti, par la voie de la glycolyse, en pyruvate ou en lactate afin de fournir un support métabolique aux fonctions axonales [329, 330]. D'autre part, le lactate, qui provient du sang ou des astrocytes, est utilisé par les oligodendrocytes comme substrat principal pour générer l'ATP et les acides gras nécessaires à la synthèse de la myéline [331]. Cependant, le pyruvate, obtenu à partir de la conversion du lactate et du glucose ou du flux sanguin, doit d'abord être converti en acétyl-CoA, à travers l'enzyme PDC, afin de produire des métabolites pour la synthèse des acides gras [332]. Il est important de noter que l'activité de la PDC est inhibée par la phosphorylation par la PDK, en particulier l'isoforme 4 (PDK4) [393]. À ce jour, seule une étude utilisant l'analyse par micro puce a montré que l'administration de mélatonine augmentait les niveaux d'expression de l'ARNm de PDK4 dans le SNC de souris [394]. Dans la présente étude, il a été constaté que les niveaux d'ARNm et de protéines de PDK4 étaient régulés positivement dans le cerveau de souris EAE traitées à la mélatonine, ce qui était associé à une réduction de l'activité de la PDC. De manière surprenante, la suppression de l'activité des PDC après un traitement à la mélatonine a coïncidé avec une augmentation des taux de lactate, ce qui suggère que l'incapacité de convertir le pyruvate, ainsi que le lactate, en acétyl-CoA entraîne l'accumulation de lactate dans le système nerveux central et périphérique. En accord, nous avons récemment démontré une accumulation significative de taux de lactate sérique après un traitement à la mélatonine [383]. Par contre, la remyélinisation par les oligodendrocytes a besoin de la synthèse d'acide gras du pyruvate importé dans la matrice mitochondriale, tandis que la maintenance de la myéline, après la myélinisation, nécessite le transfert des acides gras à long chaîne (AGLC) dans le peroxysome qui vont générer de l'acétyl-CoA par la voie β -oxydation peroxysomale [331].

En effet, ce dernier est un processus à plusieurs étapes impliquant des enzymes différentes de celles qui se trouvent dans les mitochondries. En fait, les acides gras entrent d'abord dans la cellule via les transporteurs de protéines d'acides gras (y compris FAT / CD36) présents à la surface de la cellule [335]. Bien que les produits finaux de la bêta-oxydation peroxisomale et mitochondriale soient différents, la bêta-oxydation peroxisomale peut toutefois produire de l'acétyl-CoA à partir d'acides gras à longue chaîne. En effet, les acides aminés sont convertis en acétylcarnitine, qui est ensuite exportée vers le cytosol où ils peuvent être convertis en acétyl-CoA, pour être réutilisés comme substrat dans la synthèse des acides aminés et du cholestérol [336]. L'acétyl-CoA produit à partir de la β -oxydation ne peut pas être converti en lactate, mais il a été suggéré que le pyruvate importé dans les peroxysomes pourrait produire du lactate [337]. Considérant que l'inhibition de la synthèse des acides gras par la voie dépendante de la PDC conduit à une accumulation de pyruvate, il semble que ce taux élevé de pyruvate par suppression de la PDC augmente la β -oxydation peroxysomale. En conséquence, il a été démontré que l'administration de pyruvate augmentait la β -oxydation peroxysomale, qui nécessite également du NAD^+ provenant de la conversion du pyruvate en lactate [337]. Par conséquent, l'accumulation de lactate est obtenue non seulement en supprimant la consommation de pyruvate par la PDC, ce qui réduit la conversion du lactate en pyruvate par un mécanisme de rétroaction négative, mais également par le biais de peroxysomes. Dans l'ensemble, ces observations démontrent que la mélatonine affecte la voie métabolique impliquée dans la remyélinisation en augmentant la myélinisation et en atténuant la sévérité de l'EAE. Des études supplémentaires seront nécessaires pour étudier le lien entre la synthèse de mélatonine et d'AG et pour évaluer plus en détail leurs effets sur la myélinisation. Ces observations démontrent que la mélatonine affecte la voie métabolique impliquée dans la remyélinisation en augmentant la myélinisation et en atténuant la sévérité de l'EAE. Des études supplémentaires seront nécessaires pour étudier le lien entre la synthèse de mélatonine et d'AG et pour évaluer plus en détail leurs effets sur la myélinisation. La biosynthèse du cholestérol se produit principalement (95%) dans le cerveau et constitue un constituant principal de la gaine de myéline [333, 395, 396]. Par conséquent, nous avons étudié la 3-hydroxy-3-méthylglutarylcoenzyme-A réductase (HMGCR), une enzyme clé de la synthèse du cholestérol. Des études antérieures ont montré que l'HMGCR est diminué au plus fort de la maladie EAE aiguë [334]. Cependant, nous avons démontré que le traitement à la mélatonine augmentait significativement les taux de HMGCR. Cette observation suggère que la synthèse du cholestérol n'est pas inhibée par la mélatonine mais stimulée par celle-ci.

D'autre part, le N-acétyl-aspartate (NAA), un métabolite spécifique du système nerveux dont le rôle n'a pas été complètement élucidé, semble être un lien essentiel des caractéristiques biochimiques

du métabolisme du SNC [321] et d'être impliqués dans la myélinisation et la remyélinisation. Certaines études ont suggéré que l'ANA neuronal puisse être exportée vers des oligodendrocytes où il est métabolisé en acétate, puis en acétyl-CoA, qui sont de préférence intégrés à la myéline [320, 397, 398]. Des études antérieures ont confirmé que les niveaux de NAA dans le cerveau sont diminués dans la SEP et que le NAA précède l'atrophie neuronale, ce qui indique qu'un dysfonctionnement peut précéder la neurodégénérescence [322, 399]. De plus, la réduction des ANA a été en corrélation avec l'évolution de la maladie et le déclin neurologique chez les patients atteints de sclérose en plaques [400, 401]. Dans notre étude, le traitement à haute teneur en mélatonine a inversé la diminution de niveaux de NAA. Conformément à nos résultats, un rétablissement partiel des taux d'ANA a également été signalé chez des patients traités par avec l'interféron β -1b [402], la fluoxétine [403] ou l'acétate de glatiramère [404]. De plus en plus de preuves confirment que la mélatonine atténue la gravité de l'EAE à différentes concentrations, bien que les deux doses optimales précises aient été utilisées dans cette étude. La dose «élevée pharmacologique» a été choisie sur la base de notre étude précédente sur le modèle de rat EAE [383], tandis que la dose «faible physiologique» a été utilisée conformément au travail précédent de [405]. Le nombre de mitochondries augmentant dans les axones démyélinisés de la SEP aiguë [340]. Le changement du nombre de mitochondries chez les souris non traitées et traitées à la mélatonine reste donc à déterminer. Une des limites de la présente étude est que nous avons utilisé des lysats cérébraux qui ne permettent pas de déterminer l'origine des cellules responsables des facteurs mesurés. D'autres études sont nécessaires pour étudier ces marqueurs dans des cellules spécifiques, notamment les astrocytes, les neurones et les oligodendrocytes. De plus, pour arriver à une conclusion précise sur le traitement à la mélatonine, il est fortement recommandé de prendre en compte le moment de l'administration de la mélatonine (entre 17:00 et 19:00 dans cette étude), le moment de l'échantillonnage (entre 10:00 et 12:00 AM), le type de modèle EAE, la durée et la dose du traitement à la mélatonine, la voie d'administration de la mélatonine (intrapéritonéale dans cette étude), l'âge et le poids des souris ou des rats, et enfin le protocole d'induction de l'EAE.

Discussion générale

La discussion est divisée en trois parties, **la première partie** présente une étude clinique sur une population formée de 46 personnes dont 23 sujets atteints de sclérose en plaques (SEP) nouvellement diagnostiqués et 23 sujets sains. Dans cette étude, nous avons examiné si les taux sériques de procalcitonine (proCT) étaient corrélés à ceux de mélatonine chez les patients atteints de SEP et nous avons aussi évalué chez les mêmes sujets le taux d'Ostéocalcine (OCN), marqueur de synthèse de la matrice osseuse, afin d'étudier la formation de tissu osseux et le risque d'ostéoporose. **La deuxième partie** a exploré le rôle de la mélatonine à une dose de 10 mg/kg/j dans le métabolisme osseux et son effet sur le risque d'ostéoporose dans un modèle expérimental de souris d'encéphalomyélite auto-immune (EAE). **La troisième partie** présente l'effet de la mélatonine à une dose physiologique et pharmacologique sur les voies métaboliques impliquées dans le métabolisme cérébrale et la remyélinisation chez les mêmes types de souris.

Récemment, *Uysal et al* a été démontré que le taux sérique de proCT et celui de TNF- α étaient significativement plus élevés chez les patients atteints de SEP que les sujets en bonne santé [364]. Nos résultats ont aussi montré une augmentation significative des taux sériques de proCT chez les patients SEP par rapport aux sujets sains, ceux-ci a confirmé cette étude [364]. De plus, il a été rapporté que la proCT est un marqueur cliniquement important de l'inflammation systémique et des maladies auto-immunes, et il a été suggéré que la mesure de proCT pourrait être utile dans le diagnostic, la prévention, le suivi et le traitement des maladies infectieuses et auto-immunes [365]. Aussi, des concentrations sériques élevées de mélatonine ont été observées chez les sujets atteints de céphalée en grappe traités par la méthylprédnisolone [406]. Alors, la mélatonine et le proCT ont toujours été étudiés séparément. Une étude récente a montré une possible corrélation entre la proCT et la mélatonine chez les patients atteints de SEP [364]. Cependant, **dans la première partie** de notre étude, nous avons montré une corrélation inverse entre eux chez les sujets atteints de SEP par rapport aux participants en bonne santé. Partant de ce fait, cette étude suggère que proCT pourrait être un biomarqueur de diagnostic chez les patients atteints de SEP.

De plus en plus, des preuves démontrent que la SEP est associée à un risque accru d'ostéoporose [369]. En accord avec cette étude, nous suggérons que la SEP favorise l'ostéoporose à mesure que les taux d'OCN jouant un rôle dans la formation des minéraux nécessaire à la synthèse de la matrice osseuse [407] ont diminué significativement chez les sujets malades par rapport aux témoins. Donc la

masse osseuse est réduite et le risque de fracture augmente. D'où l'OCN pourrait être un facteur de risque important pour l'ostéoporose dans la SEP.

Par ailleurs, l'effet de la mélatonine sur les facteurs de risque d'ostéoporose n'a jamais été exploré. Une étude antérieure a démontré que l'induction d'EAE a entraîné une diminution des taux circulants de vitamine D, de calcium (Ca) et d'OCN qui pourraient constituer des facteurs de risque d'ostéoporose chez les patients atteints de SEP [373], alors que d'autre étude cas-témoin basée sur la population ciblant des patients nouvellement diagnostiqués de SEP et de syndrome cliniquement isolé (CIS) n'a montré aucune différence significative entre les facteurs osseux à ce stade de la SEP, y compris la phosphatase alcaline osseuse (b-ALP), la 25-hydroxy et la 1,25-dihydroxyvitamine D, calcium (Ca) et hormone parathyroïdienne (PTH) [377]. Alors, **dans la deuxième partie**, nous avons évalué les taux sériques de ces marqueurs et nous avons abouti à des résultats différents que ceux de la dernière étude confirmant ainsi l'existence d'une corrélation entre SEP et déficit osseux à mesure que ces taux ont été diminués suite à l'induction d'EAE et sont revenus à des niveaux presque normaux grâce à la mélatonine chez les souris EAE. De plus, il a été démontré que la mélatonine diminue la résorption osseuse et a un effet protecteur des os [372]. De même, il est important de noter que la mélatonine est impliquée dans le processus de cicatrisation osseuse [408]. Des études expérimentales et basées sur la population sont nécessaires pour parvenir à une meilleure compréhension du métabolisme osseux chez les patients atteints de SEP.

Bien que la mélatonine soit bien étudiée dans la SEP et participe à diverses activités biologiques, son rôle dans le métabolisme osseux n'est pas bien compris. Des études chez des rats ovariectomisés a montré que la mélatonine modifiait le remodelage osseux [370]. La pinéalectomie et le traitement à la mélatonine à long terme affecte le métabolisme osseux en modifiant les taux sériques de différentes hormones en particulier le calcitonine (CT) [371]. En outre, il a été démontré que le métabolisme et le remodelage osseux ne différaient pas significativement chez les patients atteints de SEP et de CIS par rapports aux sujets sains [377]. Dans notre étude, le métabolisme de l'os différait de manière significative entre les souris EAE et les souris témoins. Dans cette même partie, nos résultats ont montré, pour la première fois, que le traitement à la mélatonine à une concentration de 10 mg/kg/jour a supprimé l'élévation des taux sériques de proCT provoquée par l'induction d'EAE chez les souris. Une étude récente a montré que la mélatonine était inversement corrélée à la gravité de la SEP et sa rechute [303, 379], à cet égard, notre intervention thérapeutique à cette même dose de la mélatonine a atténué la sévérité de l'EAE, cela est révélé par la diminution de manière significative des scores neurologiques.

De plus en plus, des preuves confirment que la mélatonine atténue la gravité de l'EAE à différentes concentrations, bien que la dose optimale précise pour cet agent neuroprotecteur soit encore inconnue. Des études antérieures ont montré que la mélatonine affecte les ostéoblastes à des concentrations physiologiques tout en affectant les ostéoclastes à des concentrations pharmacologiques. *Sharan et al* ont signalé que des concentrations de 10 ou de 100 mg/kg de poids corporel de mélatonine augmentaient le nombre d'ostéoblastes et la formation d'os [374]. Alors que *Han et al* ont montré que la mélatonine, à la dose physiologique de 1 μ M, stimule la différenciation des ostéoblastes dans les cellules C2C12 par l'activation d'Osterix et en augmentant l'expression de la phosphatase alcaline (ALP), la sialoprotéine osseuse (BSP) et les gènes OCN [375]. En revanche, *Zhou et al* ont rapporté que la mélatonine à des doses pharmacologiques comprises entre 1 et 100 μ M inhibe l'ostéoclastogénèse dans les cellules souches mésenchymateuses (CSM) [376]. Ainsi, deux doses différentes ont été utilisées dans **la troisième partie** de cette étude pour évaluer l'effet de la mélatonine sur le métabolisme énergétique au niveau des oligodendrocytes chez les souris EAE. La dose pharmacologique élevée correspondant à 10 mg/kg/j a été choisie sur la base de notre étude précédente sur le modèle de rat Lewis EAE [383], tandis que la dose physiologique faible de 476 μ g/kg/j a été utilisée conformément au travail précédent de *Hamdi et al* [405].

Plusieurs études ont indiqué que la mélatonine pouvait jouer un rôle bénéfique dans l'atténuation de la neuroinflammation et dans la stimulation de la remyélinisation dans les modèles adultes de souris et de rat EAE [304, 308, 378]. Nos résultats sont en accord avec ces études, car nous avons montré que la mélatonine a atténué l'inflammation en réduisant les cytokines pro-inflammatoires (IL-1 β et le TNF- α) et en augmentant les cytokines anti-inflammatoires (IL-4 et IL-10) chez les souris EAE traitées par rapport au contrôle et ces données ont confirmé nos données antérieures utilisant des doses pharmacologiques de mélatonine [409, 410]. Ces cytokines ont été montrées qu'ils ont un lien avec la destruction des tissus neuronaux aboutissant au handicap dû à l'EAE [380, 381]. Par ailleurs, la plupart des études ont porté sur l'effet de la mélatonine sur les médiateurs inflammatoires et ses actions anti-oxydantes et anti-apoptotiques dans les modèles EAE [388-391]. Cette étude a examiné son effet sur les voies métaboliques impliquées dans le métabolisme cérébral et la remyélinisation. A priori, nous avons démontré que la MBP et la MOG qui sont des protéines associées à la myéline et localisées à la surface des oligodendrocytes présentaient une réduction marquée chez les souris EAE par rapport aux témoins alors que la mélatonine à des doses physiologiques ou pharmacologiques a augmenté d'une façon significative les niveaux d'expression de ces protéines par rapport aux souris EAE non traitées. Le MOBP, un composant majeur de la myéline se trouvant dans la membrane périaxiale et qui module la croissance radiale des axones et de la myéline [384], a été

diminué chez les souris EAE [385]. Alors, nos données dans cette étude ont démontré que les doses pharmacologiques de mélatonine pourraient augmenter l'expression de MOBP par rapport au contrôle.

Il est important de souligner que l'activité de la PDC est affectée par la PDK en particulier PDK4 qui phosphoryle la PDC ce qui entraîne sa suppression [393]. À ce jour, il y a une seule étude qui a montré que l'administration de la mélatonine augmentait les niveaux d'expression de l'ARNm de PDK4 dans le SNC des souris [394]. En particulier, nos résultats montrent, pour la première fois, que le traitement à la mélatonine a augmenté les niveaux de PDK4 et a supprimé l'activité de PDC dans le modèle murin EAE de la SEP. Mais, ce qui était étonnant est que la suppression de l'activité de PDC a coïncidé avec une augmentation des taux de lactate suggérant ainsi qu'il y a une accumulation du lactate dans le SNC et dans le sang périphérique dûe à l'incapacité de convertir le lactate ainsi que le pyruvate en acétyl-CoA. En accord, nous avons récemment démontré une augmentation significativement des taux de lactate sérique après un traitement à la mélatonine chez les jeunes rats Lewis EAE [383]. De plus, il a été rapporté que maintenir la PDC en état actif diminue l'accumulation de lactate dans les tissus corporels [392].

Les connaissances actuelles sur les voies métaboliques impliquées dans la remyélinisation sont controversées et mal comprises. La remyélinisation par les oligodendrocytes nécessite la synthèse d'acide gras à partir du pyruvate importé dans les mitochondries tandis que le maintien de la myéline après la myélinisation nécessite la dégradation d'acides gras à chaîne longue qui se fait dans le peroxyosome par la voie β -oxydation [331]. Dans cette étude, nous avons montré pour la première fois, à l'aide d'un modèle animal de SEP, que les oligodendrocytes pourraient utiliser une voie alternative pour la synthèse d'acide gras nécessaire à la remyélinisation celle de la β -oxydation qui est un processus en plusieurs étapes qui impliquent des enzymes différents de celles qui se trouvent dans les mitochondries. En fait, les acides gras entrent d'abord dans la cellule via des transporteurs protéiniques d'acides gras (y compris FAT/CD36) qui sont présents à la surface des cellules [335]. Bien que les produits finaux provenant de la β -oxydation au niveau des peroxyosomes et de la mitochondrie soient différents, la β -oxydation peroxyosomale produit de l'acétyl-CoA à partir d'acides gras à chaîne longue qui sont convertis en acétylcarnitine qui est ensuite exporté du peroxyosome vers le cytosol où il peut être converti en acétyl-CoA qui pourrait être utilisé à nouveau comme substrat dans la synthèse des acides gras et du cholestérol pour la remyélinisation [336]. L'acétyl-CoA produit à partir de la β -oxydation ne peut pas être converti en lactate, mais il a été suggéré que le pyruvate importé dans le peroxyosome pourrait produire du lactate par un mécanisme inconnu [337]. Considérons que l'inhibition de la synthèse des acides gras par la voie dépendante de PDC conduit à l'accumulation de

pyruvate. Ceci est conforme à nos résultats où il a été montré que le niveau de lactate était significativement augmenté par la mélatonine. En accord, il a été démontré que l'administration du pyruvate augmentait la β -oxydation peroxysomale qui nécessite également du NAD⁺ qui provient de la conversion du pyruvate en lactate [337]. Par conséquent, l'accumulation de lactate est obtenue non seulement par la suppression de la consommation de pyruvate par le PDC, qui a son tour réduit la conversion du lactate en pyruvate par un mécanisme de rétroaction négative, mais également par le biais de peroxysomes. Des études supplémentaires seront nécessaires pour étudier le lien entre la mélatonine et la synthèse d'acide gras et pour évaluer plus en détails leurs effets sur la myélinisation. Le cholestérol est un constituant principal de la gaine de myéline et sa biosynthèse se produit principalement dans le cerveau grâce à une enzyme 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-CoA (HMGCR) [333, 395, 396]. Des études antérieures ont montré que l'HMGCR a diminué au pic de la maladie EAE aiguë [334]. Cependant, nous avons démontré que le traitement à la mélatonine à des doses physiologiques ou pharmacologiques augmentait de manière significative les taux de HMGCR. Cette observation suggère que la synthèse du cholestérol n'est pas inhibée par la mélatonine mais plutôt stimulée par celle-ci.

D'autre part, le N-acétyl-aspartate (NAA), métabolite spécifique du SN, semble être un lien clé dans les caractéristiques biochimiques du métabolisme du SNC [321] et pourrait être impliqué dans la myélinisation et la remyélinisation, cependant, son rôle n'a pas été complètement élucidé. Certaines études suggèrent que les NAA neuronaux peuvent être exportés vers des oligodendrocytes où ils sont métabolisés en acétate, puis en acétyl-CoA, qui sont de préférence intégrés à la myéline [320, 397, 398]. Des études antérieures ont confirmé que les niveaux de NAA dans le cerveau sont diminués dans la SEP et que cette diminution précède l'atrophie neuronale, suggérant que le dysfonctionnement mitochondrial pourrait précéder la neurodégénérescence [322, 399]. De plus, la réduction du taux de NAA a été corrélée à la progression de la maladie et au déclin neurologique chez les patients atteints de SEP [400, 401]. Nous avons démontré qu'un traitement à dose élevée en mélatonine a augmenté le niveau de NAA. Conformément à nos résultats, une récupération partielle des taux de NAA a également été rapportée chez des patients traités par l'interféron bêta-1b [402], la fluoxétine [403] ou l'acétate de glatiramère [404]. Enfin, compte tenu du fait que le nombre de mitochondries augmente dans les axones démyélinisés de la SEP aiguë [340], il reste à déterminer le changement du nombre de mitochondries chez les souris non traitées et les souris traitées à la mélatonine.

Dans la présente étude, il y a une limite dans le fait que nous avons utilisé des lysats cérébraux qui ne permettent pas de déterminer l'origine des cellules responsables des facteurs mesurés. D'autres

études sont nécessaires pour étudier ces marqueurs dans des cellules spécifiques notamment les astrocytes, les neurones et les oligodendrocytes. Il est important de noter que pour arriver à une conclusion précise sur le traitement à la mélatonine, il est fortement recommandé de prendre en compte le moment de l'administration de la mélatonine (entre 17:00 et 19:00 dans cette étude), le moment de l'échantillonnage (entre 10:00 et 12:00 AM), le type de modèle EAE, la durée et la posologie du traitement à la mélatonine, le mode d'administration de la mélatonine (intra-péritonéal ou non), l'âge et le poids des souris ou des rats, et enfin le protocole d'induction de l'EAE

Conclusions et Perspectives

D'abord, nos résultats ont montré une augmentation significative des taux sériques de procalcitonine (proCT) chez les patients atteints de Sclérose en Plaques (SEP) par rapport aux sujets sains, partant de ce fait, nous suggérons que la proCT pourrait être un biomarqueur de diagnostic chez les sujets malades. De plus, des concentrations sériques de mélatonine faible ont été observées chez les sujets atteints de SEP, ceci a montré une corrélation inverse entre le taux sérique de proCT et celui de mélatonine chez ces patients malades par rapport aux participants en bonne santé. D'un autre côté, nous suggérons que la SEP favorise l'ostéoporose à mesure que nos données ont montré que les taux d'OCN ont diminué significativement chez les sujets malades par rapport aux témoins. Alors, l'OCN pourrait être un facteur de risque important pour l'ostéoporose dans la SEP.

Ensuite, nous avons montré, pour la première fois, que le traitement à la mélatonine à une concentration de 10mg/kg/j a supprimé l'élévation des taux sériques de proCT provoqué par l'induction de l'EAE chez les souris. Aussi, l'intervention thérapeutique à cette même dose de la mélatonine a atténué la sévérité de l'EAE, cela a été révélé par la diminution de manière significative des scores neurologique. En outre, nos résultats ont montré que le taux 25-hydroxyvitamine D, Ca, OCN ont diminué d'une façon significative et le taux de PTH a augmenté légèrement suite à l'induction de l'EAE et sont revenus à des niveaux presque normaux grâce à la mélatonine chez les souris EAE, ceci confirme l'existence d'une corrélation entre SEP et déficit osseux. Cette nouvelle découverte ouvre la porte à l'étude du rôle de la mélatonine dans le métabolisme osseux et de l'étude des modifications proCT chez les patients atteints de SEP à différents stades de la maladie.

Puis, nous avons montré que l'administration de mélatonine à des doses physiologiques (476 µg/kg/j) ou pharmacologiques (10 mg/kg/j) atténue la neuroinflammation intracérébrale en réduisant les cytokines pro-inflammatoire (IL-1β et TNF-α) et en augmentant les cytokines anti-inflammatoires (IL-4 et IL-10) chez les souris EAE traitées par rapport aux souris EAE non traitées. De même, nous avons montré que la MBP, MOG, MOBP présentait une réduction marquée chez les souris EAE par rapport aux témoins alors que la mélatonine à des doses physiologiques et pharmacologiques a augmenté de façon significative les niveaux d'expression des protéines MBP, MOG par rapport aux souris EAE non traitées alors la dose élevée de la mélatonine mais pas la dose faible a augmenté significativement le taux de MOBP chez les souris EAE traitées par rapport aux souris EAE non traitées. Enfin, et pour la première fois, nous avons montré que le traitement à la mélatonine a augmenté les niveaux de l'ARNm de PDK4 et a supprimé l'activité de PDC dans le modèle murin EAE, par conséquent

la production d'acetyl-CoA est inhibée ce qui oblige les oligodendrocytes à utiliser une autre voie alternative pour la synthèse d'acides gras nécessaire à la remyélinisation celle de la β -oxydation qui est un processus en plusieurs étapes qui impliquent des enzymes différents de celles qui se trouvent dans les mitochondries qui peuvent être considérées comme cible thérapeutique efficace dans la SEP. Par conséquent, afin d'augmenter l'efficacité du traitement à la mélatonine dans les troubles de l'EAE, de la SEP ou de la démyélinisation, nous proposons une nouvelle stratégie de traitement par l'activation du PDC. Aussi, Le couplage de la mélatonine et des inhibiteurs de PDK4 pourrait améliorer les bénéfices procurés par l'utilisation de la thérapie à la mélatonine seule chez les patients atteints de SEP.

Par ailleurs, nous avons montré que le traitement à la mélatonine à des doses physiologiques ou pharmacologiques augmentait de manière significative les taux de HMGCR. Cette observation suggère que la synthèse du cholestérol n'est pas inhibée par la mélatonine mais plutôt stimulée par celle-ci. Nous avons aussi montré que le niveau de lactate et celui de N-acétylaspartate (NAA) étaient significativement augmentés par un traitement à dose élevée en mélatonine.

En fin de compte, les résultats de notre étude indiquent que la proCT pourrait être utilisée comme un nouveau biomarqueur dans la SEP et que la mélatonine atténue la sévérité de la maladie, normalise les métabolites osseux qui a pour conséquent de diminuer l'ostéoporose, module le métabolisme cérébrale et renforce le processus de remyélinisation, donc les résultats pathologiques étaient considérablement améliorés par la thérapie à la mélatonine.

RÉFÉRENCES

1. Peters, D.G. and J.R. Connor, *Introduction to cells comprising the nervous system*, in *Glycobiology of the Nervous System*. 2014, Springer. p. 33-45.
2. Egensperger, R., et al., *Fate of DNA from retinal cells dying during development: uptake by microglia and macroglia (Müller cells)*. *Developmental Brain Research*, 1996. **97**(1): p. 1-8.
3. Kimelberg, H., *Catecholamine and serotonin uptake in astrocytes*, in *Astrocytes, Part 2*. 1986, Elsevier. p. 107-131.
4. Hennebelle, M., *Acides gras polyinsaturés n-3 (AGPI n-3) e prévention des dommages cérébraux induits par un stress chronique*. 2012, Université Paris Sud-Paris XI.
5. Magistretti, P.J., *Neuron–glia metabolic coupling and plasticity*. *Journal of Experimental Biology*, 2006. **209**(12): p. 2304-2311.
6. Fierz, W. and A. Fontana, *The role of astrocytes in the interactions between the immune and nervous systems*. *Astrocytes: Cell Biology and Pathology of Astrocytes*, 2012. **3**: p. 203-225.
7. Bergles, D.E. and W.D. Richardson, *Oligodendrocyte development and plasticity*. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 2016. **8**(2): p. a020453.
8. Chang, A., et al., *NG2-positive oligodendrocyte progenitor cells in adult human brain and multiple sclerosis lesions*. *Journal of Neuroscience*, 2000. **20**(17): p. 6404-6412.
9. Dimou, L. and V. Gallo, *NG2-glia and their functions in the central nervous system*. *Glia*, 2015. **63**(8): p. 1429-1451.
10. Kitic, M., et al., *NG2 plays a role in neuroinflammation but is not expressed by immune cells*. *Acta neuropathologica*, 2017. **134**(2): p. 325-327.
11. Ousman, S.S. and P. Kubes, *Immune surveillance in the central nervous system*. *Nature neuroscience*, 2012. **15**(8): p. 1096-1101.
12. Aguzzi, A., B.A. Barres, and M.L. Bennett, *Microglia: scapegoat, saboteur, or something else?* *Science*, 2013. **339**(6116): p. 156-161.
13. Couic-Marinier, F. and F. Pillon, *Prise en charge d'une sclérose en plaques*. *Actualités Pharmaceutiques*, 2016. **55**(554): p. 13-15.
14. Browne, P., et al., *Atlas of multiple sclerosis 2013: a growing global problem with widespread inequity*. *Neurology*, 2014. **83**(11): p. 1022-1024.
15. Kobelt, G., et al., *New insights into the burden and costs of multiple sclerosis in Europe*. *Multiple Sclerosis Journal*, 2017. **23**(8): p. 1123-1136.
16. Landtblom, A.-M., et al., *The first case history of multiple sclerosis: Augustus d'Esté (1794–1848)*. *Neurological sciences*, 2010. **31**(1): p. 29-33.
17. Charcot, J., *Histologie de la sclérose en plaques (leçon recueillie par Bourneville)*. *Gaz Hop Civ*, 1868. **1051**(41): p. 140.
18. Rivers, T.M. and F.F. Schwentker, *Encephalomyelitis accompanied by myelin destruction experimentally produced in monkeys*. *Journal of experimental medicine*, 1935. **61**(5): p. 689-702.
19. Trapp, B.D. and K.-A. Nave, *Multiple sclerosis: an immune or neurodegenerative disorder?* *Annu. Rev. Neurosci.*, 2008. **31**: p. 247-269.
20. Dutta, R. and B. Trapp, *Pathology and definition of multiple sclerosis*. *La Revue du praticien*, 2006. **56**(12): p. 1293-1298.
21. Schumacher, G.A., et al., *Problems of experimental trials of therapy in multiple sclerosis: report by the panel on the evaluation of experimental trials of therapy in multiple sclerosis*. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1965. **122**(1): p. 552-568.
22. Lublin, F.D. and S.C. Reingold, *Defining the clinical course of multiple sclerosis results of an international survey*. *Neurology*, 1996. **46**(4): p. 907-911.
23. Weinshenker, B.G., et al., *The natural history of multiple sclerosis: a geographically based study: I. Clinical course and disability*. *Brain*, 1989. **112**(1): p. 133-146.
24. Depaz, R., J. Aboab, and O. Gout, *Actualités dans le diagnostic et la prise en charge*

- thérapeutique de la sclérose en plaques*. La Revue de médecine interne, 2013. **34**(10): p. 628-635.
25. Plantone, D., et al., *Secondary progressive multiple sclerosis: definition and measurement*. CNS drugs, 2016. **30**(6): p. 517-526.
 26. Sagnes-Raffy, C., et al., *P11-10-Intérêt d'une enquête qualitative auprès des patients pour la construction d'un réseau de soins. Exemple du réseau sclérose en plaques de Midi-Pyrénées (Mipsep)*. Revue d'Épidémiologie et de Santé Publique, 2006. **54**: p. 97.
 27. Beck, C.A., et al., *Regional variation of multiple sclerosis prevalence in Canada*. Multiple Sclerosis Journal, 2005. **11**(5): p. 516-519.
 28. Leray, E., et al., *Epidemiology of multiple sclerosis*. Revue neurologique, 2016. **172**(1): p. 3-13.
 29. Yamout, B., et al., *Multiple sclerosis in the Levant: a regional consensus statement*. International Journal of Neuroscience, 2014. **124**(5): p. 377-382.
 30. Olsson, T., L.F. Barcellos, and L. Alfredsson, *Interactions between genetic, lifestyle and environmental risk factors for multiple sclerosis*. Nature Reviews Neurology, 2017. **13**(1): p. 25.
 31. Gourraud, P.A., et al., *The genetics of multiple sclerosis: an up-to-date review*. Immunological reviews, 2012. **248**(1): p. 87-103.
 32. Compston A1, C.A., *Multiple sclerosis*. The Lancet, 2008.
 33. Patsopoulos, N.A., et al., *Fine-mapping the genetic association of the major histocompatibility complex in multiple sclerosis: HLA and non-HLA effects*. PLoS genetics, 2013. **9**(11): p. e1003926.
 34. Jersild, C., et al., *Histocompatibility determinants in multiple sclerosis, with special reference to clinical course*. The lancet, 1973. **302**(7840): p. 1221-1225.
 35. Barcellos, L.F., et al., *Heterogeneity at the HLA-DRB1 locus and risk for multiple sclerosis*. Human molecular genetics, 2006. **15**(18): p. 2813-2824.
 36. Salemi, G., et al. *The HLA locus and multiple sclerosis in Sicily*. in XXXV Congresso Nazionale della Società Italiana di Neurologia. 2004. Springer.
 37. Kallaur, A.P., et al., *Genetic polymorphisms associated with the development and clinical course of multiple sclerosis*. international journal of molecular medicine, 2011. **28**(4): p. 467-479.
 38. Beecham, A., et al., *International Multiple Sclerosis Genetics Consortium (IMSGC); Wellcome Trust Case Control Consortium 2 (WTCCC2); International IBD Genetics Consortium (IIBDGC). Analysis of immune-related loci identifies 48 new susceptibility variants for multiple sclerosis*. Nat Genet, 2013. **45**(11): p. 1353-1360.
 39. Harbo, H.F., et al., *Oligoclonal bands and age at onset correlate with genetic risk score in multiple sclerosis*. Multiple Sclerosis Journal, 2014. **20**(6): p. 660-668.
 40. Okuda, D., et al., *Genotype-phenotype correlations in multiple sclerosis: HLA genes influence disease severity inferred by 1HMR spectroscopy and MRI measures*. Brain, 2009. **132**(1): p. 250-259.
 41. Oksenberg, J.R., et al., *The genetics of multiple sclerosis: SNPs to pathways to pathogenesis*. Nature Reviews Genetics, 2008. **9**(7): p. 516.
 42. Lincoln, M.R., et al., *Epistasis among HLA-DRB1, HLA-DQA1, and HLA-DQB1 loci determines multiple sclerosis susceptibility*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2009. **106**(18): p. 7542-7547.
 43. Beecham, A.H., et al., *Analysis of immune-related loci identifies 48 new susceptibility variants for multiple sclerosis*. Nature genetics, 2013. **45**(11): p. 1353.
 44. Healy, B., et al., *HLA B* 44 Protective effects in MS susceptibility and MRI outcome measures*. Neurology, 2010. **75**(7): p. 634-640.
 45. Cotsapas, C. and M. Mitrovic, *Genome-wide association studies of multiple sclerosis*. Clinical & translational immunology, 2018. **7**(6): p. e1018.
 46. Hollenbach, J.A. and J.R. Oksenberg, *The immunogenetics of multiple sclerosis: a*

- comprehensive review*. Journal of autoimmunity, 2015. **64**: p. 13-25.
47. Guerreiro-Cacais, A.O., et al., *VAVI controls inflammation in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE)*. Journal of Neuroimmunology, 2014. **275**(1): p. 205.
 48. Ramagopalan, S.V., D.A. Dymont, and G.C. Ebers, *Genetic epidemiology: the use of old and new tools for multiple sclerosis*. Trends in neurosciences, 2008. **31**(12): p. 645-652.
 49. Berg-Hansen, P. and E. Celius, *Socio-economic factors and immigrant population studies of multiple sclerosis*. Acta Neurologica Scandinavica, 2015. **132**: p. 37-41.
 50. Rhead, B., et al., *Mendelian randomization shows a causal effect of low vitamin D on multiple sclerosis risk*. Neurology Genetics, 2016. **2**(5): p. e97.
 51. I Trochoutsou, A., et al., *Vitamin-D in the immune system: genomic and non-genomic actions*. Mini reviews in medicinal chemistry, 2015. **15**(11): p. 953-963.
 52. Suzumura, A., *Effect of vitamin D on blood-brain barrier function in multiple sclerosis*. Clinical and Experimental Neuroimmunology, 2017. **8**(3): p. 180-180.
 53. Lucas, R.M., et al., *Ultraviolet radiation, vitamin D and multiple sclerosis*. Neurodegenerative disease management, 2015. **5**(5): p. 413-424.
 54. Lips, P., *Vitamin D deficiency and secondary hyperparathyroidism in the elderly: consequences for bone loss and fractures and therapeutic implications*. Endocrine reviews, 2001. **22**(4): p. 477-501.
 55. Lips, P., et al. *Vitamin D status and the threshold for secondary hyperparathyroidism in the longitudinal aging study Amsterdam (LASA)*. in *Bone*. 2005. ELSEVIER SCIENCE INC 360 PARK AVE SOUTH, NEW YORK, NY 10010-1710 USA.
 56. Ontario, H.Q., *clinical utility of vitamin D testing: an evidence -based analysis* Ont Health Technol Assess Ser., 2010 (10(2)): p. 1-93.
 57. Ascherio, A., K.L. Munger, and K.C. Simon, *Vitamin D and multiple sclerosis*. The Lancet Neurology, 2010. **9**(6): p. 599-612.
 58. Holick, M.F., *Vitamin D: a millenium perspective*. Journal of cellular biochemistry, 2003. **88**(2): p. 296-307.
 59. Yang, L., et al., *Protective role of the vitamin D receptor*. Cellular immunology, 2012. **279**(2): p. 160-166.
 60. Mora, J.R., M. Iwata, and U.H. Von Andrian, *Vitamin effects on the immune system: vitamins A and D take centre stage*. Nature Reviews Immunology, 2008. **8**(9): p. 685.
 61. Wang, C., et al., *Lower 25-Hydroxyvitamin D is associated with higher relapse risk in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis*. The journal of nutrition, health & aging, 2018. **22**(1): p. 38-43.
 62. Smolders, J. and J. Damoiseaux, *Vitamin D as a T-cell modulator in multiple sclerosis*. Vitamins and hormones, 2010. **86**: p. 401-428.
 63. Correale, J. and M. Gaitan, *Multiple sclerosis and environmental factors: the role of vitamin D, parasites, and Epstein-Barr virus infection*. Acta Neurologica Scandinavica, 2015. **132**(S199): p. 46-55.
 64. Lysandropoulos, A.P., et al., *Vitamin D has a direct immunomodulatory effect on CD8+ T cells of patients with early multiple sclerosis and healthy control subjects*. Journal of neuroimmunology, 2011. **233**(1): p. 240-244.
 65. Hernández-Pedro, N.Y., et al., *Initial immunopathogenesis of multiple sclerosis: innate immune response*. Clinical and Developmental Immunology, 2013. **2013**.
 66. Pierrot-Deseilligny, C. and J.-C. Souberbielle, *Vitamin D and multiple sclerosis: an update*. Multiple sclerosis and related disorders, 2017. **14**: p. 35-45.
 67. Drozdenko, G., et al., *Impaired T cell activation and cytokine production by calcitriol-primed human B cells*. Clinical & Experimental Immunology, 2014. **178**(2): p. 364-372.
 68. Koch, M.W., et al., *Environmental factors and their regulation of immunity in multiple sclerosis*. Journal of the neurological sciences, 2013. **324**(1-2): p. 10-16.
 69. Brochet, B., et al., *La sclérose en plaques-Clinique et thérapeutique*. 2017: Elsevier Health Sciences.

70. Laurence, M. and J. Benito-León, *Epstein–Barr virus and multiple sclerosis: Updating Pender's hypothesis*. Multiple sclerosis and related disorders, 2017. **16**: p. 8-14.
71. Ascherio, A. and K.L. Munger, *Epstein–Barr virus infection and multiple sclerosis: a review*. Journal of Neuroimmune Pharmacology, 2010. **5**(3): p. 271-277.
72. Levin, L.I., et al., *Primary infection with the Epstein-Barr virus and risk of multiple sclerosis*. Annals of neurology, 2010. **67**(6): p. 824-830.
73. Pender, M.P., *The essential role of Epstein-Barr virus in the pathogenesis of multiple sclerosis*. The Neuroscientist, 2011. **17**(4): p. 351-367.
74. Fierz, W., *Multiple sclerosis: an example of pathogenic viral interaction?* Virology journal, 2017. **14**(1): p. 42.
75. Stone, R.C., G.A. Micali, and R.A. Schwartz, *Roseola infantum and its causal human herpesviruses*. International journal of dermatology, 2014. **53**(4): p. 397-403.
76. Sundqvist, E., et al., *Cytomegalovirus seropositivity is negatively associated with multiple sclerosis*. Multiple Sclerosis Journal, 2014. **20**(2): p. 165-173.
77. Perron, H., et al., *Isolation of retrovirus from patients with multiple sclerosis*. The Lancet, 1991. **337**(8745): p. 862-863.
78. Rolland, A., et al., *The envelope protein of a human endogenous retrovirus-W family activates innate immunity through CD14/TLR4 and promotes Th1-like responses*. The Journal of Immunology, 2006. **176**(12): p. 7636-7644.
79. Perron, H., et al., *Human endogenous retrovirus type W envelope expression in blood and brain cells provides new insights into multiple sclerosis disease*. Multiple Sclerosis Journal, 2012. **18**(12): p. 1721-1736.
80. Cabre, P., *Environmental changes and epidemiology of multiple sclerosis in the French West Indies*. Journal of the neurological sciences, 2009. **286**(1): p. 58-61.
81. Bashi, T., et al., *The mechanisms behind helminth's immunomodulation in autoimmunity*. Autoimmunity reviews, 2015. **14**(2): p. 98-104.
82. Mikaeloff, Y., et al., *Parental smoking at home and the risk of childhood-onset multiple sclerosis in children*. Brain, 2007. **130**(10): p. 2589-2595.
83. Encinas, J.M., L. Manganas, and G. Enikolopov, *Nitric oxide and multiple sclerosis*. Current neurology and neuroscience reports, 2005. **5**(3): p. 232-238.
84. Taylor, B.V., *The major cause of multiple sclerosis is environmental: genetics has a minor role-yes*. Multiple Sclerosis Journal, 2011. **17**(10): p. 1171-1173.
85. *Campus numérique UNF3S. Item 125 : Sclérose en plaques. Campus numérique de l'UNF3S, Association des Collèges des Enseignants d'Immunologie des Universités de Langue française. Université Médicale Virtuelle Francophone., 2010-2011. 125: p. http://campus.cerimes.fr/immunologie/enseignement/immuno_125/site/html/cours.pdf.*
86. Absinta, M., P. Sati, and D.S. Reich, *Advanced MRI and staging of multiple sclerosis lesions*. Nature Reviews Neurology, 2016. **12**(6): p. 358.
87. Dawson, J.W., XVIII.—*The histology of disseminated sclerosis*. Earth and Environmental Science Transactions of The Royal Society of Edinburgh, 1916. **50**(3): p. 517-740.
88. Peterson, J.W., et al., *Transected neurites, apoptotic neurons, and reduced inflammation in cortical multiple sclerosis lesions*. Annals of neurology, 2001. **50**(3): p. 389-400.
89. Lassmann, H., W. Brück, and C. Lucchinetti, *Heterogeneity of multiple sclerosis pathogenesis: implications for diagnosis and therapy*. Trends in molecular medicine, 2001. **7**(3): p. 115-121.
90. Atalar, M.H., I. Salk, and H. Egilmez, *Classical signs and appearances in pediatric neuroradiology: a pictorial review*. Polish journal of radiology, 2014. **79**: p. 479.
91. Thompson, A.J., et al., *Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria*. The Lancet Neurology, 2018. **17**(2): p. 162-173.
92. Gordon, P.A., M.D. Lewis, and D. Wong, *Multiple sclerosis: Strategies for rehabilitation counselors*. Journal of Rehabilitation, 1994. **60**(3): p. 34.
93. Buzzard, K., S. Broadley, and H. Butzkueven, *What do effective treatments for multiple sclerosis tell us about the molecular mechanisms involved in pathogenesis?* International

- journal of molecular sciences, 2012. **13**(10): p. 12665-12709.
94. Delaroche, O., et al., *Étude biochimique du liquide céphalorachidien dans le cadre de la sclérose en plaques*. Immuno-analyse & Biologie spécialisée, 2003. **18**(2): p. 86-91.
 95. Ouallet, J.-C. and B. Brochet, *Aspects cliniques, physiopathologiques, et thérapeutiques de la sclérose en plaques*. EMC-Neurologie, 2004. **1**(4): p. 415-457.
 96. O, F., *Diagnostic de la SEP* fondation Garches 2013 p. <http://entretiensgarches.webconf.tv/conf/diagnostic-de-la-sep.html>.
 97. Weinshenker, B.G., et al., *The natural history of multiple sclerosis: a geographically based study. 2. Predictive value of the early clinical course*. Brain, 1989. **112** (Pt 6): p. 1419-28.
 98. Montalban, X., et al., *Ocrelizumab versus placebo in primary progressive multiple sclerosis*. New England Journal of Medicine, 2017. **376**(3): p. 209-220.
 99. Nash, R.A., et al., *High-dose immunosuppressive therapy and autologous peripheral blood stem cell transplantation for severe multiple sclerosis*. Blood, 2003. **102**(7): p. 2364-2372.
 100. Buck, D. and B. Hemmer, *Treatment of multiple sclerosis: current concepts and future perspectives*. Journal of neurology, 2011. **258**(10): p. 1747-1762.
 101. Gholamzad, M., et al., *A comprehensive review on the treatment approaches of multiple sclerosis: currently and in the future*. Inflammation Research, 2019. **68**(1): p. 25-38.
 102. Madonna, R., *Biology and Function of Stem Cells*, in *Stem Cells and Cardiac Regeneration*. 2016, Springer. p. 3-7.
 103. Cuascut, F.X. and G.J. Hutton, *Stem cell-based therapies for multiple sclerosis: current perspectives*. Biomedicines, 2019. **7**(2): p. 26.
 104. Payne, N.L., et al., *Distinct immunomodulatory and migratory mechanisms underpin the therapeutic potential of human mesenchymal stem cells in autoimmune demyelination*. Cell transplantation, 2013. **22**(8): p. 1409-1425.
 105. Kokaia, Z. and V. Darasalia, *Stem cells: How we could restore the brain function after ischemic damage*, in *Neuroanesthesia and Cerebrospinal Protection*. 2015, Springer. p. 71-80.
 106. Reynolds, B.A., W. Tetzlaff, and S. Weiss, *A multipotent EGF-responsive striatal embryonic progenitor cell produces neurons and astrocytes*. Journal of Neuroscience, 1992. **12**(11): p. 4565-4574.
 107. Dimos, J.T., et al., *Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons*. science, 2008. **321**(5893): p. 1218-1221.
 108. Burt, R., et al., *Syngeneic bone marrow transplantation eliminates Vβ8. 2 T lymphocytes from the spinal cord of Lewis rats with experimental allergic encephalomyelitis*. Journal of neuroscience research, 1995. **41**(4): p. 526-531.
 109. Ades, L., P. Guardiola, and G. Socie, *Second malignancies after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: new insight and current problems*. Blood reviews, 2002. **16**(2): p. 135-146.
 110. Muraro, P.A., et al., *Autologous haematopoietic stem cell transplantation for treatment of multiple sclerosis*. Nature Reviews Neurology, 2017. **13**(7): p. 391.
 111. Stocum, D.L. and G.K. Zupanc, *Stretching the limits: stem cells in regeneration science*. Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists, 2008. **237**(12): p. 3648-3671.
 112. Cyranoski, D., *5 things to know before jumping on the iPS bandwagon: induced pluripotent stem cells look just like embryonic stem cells, but are easier to create and free of the heavy ethics baggage*. David Cyranoski separates fact from fiction in a burgeoning field. Nature, 2008. **452**(7186): p. 406-409.
 113. Martino, G., et al., *Stem cell transplantation in multiple sclerosis: current status and future prospects*. Nature Reviews Neurology, 2010. **6**(5): p. 247.
 114. Wang, S., X. Qu, and R.C. Zhao, *Clinical applications of mesenchymal stem cells*. Journal of hematology & oncology, 2012. **5**(1): p. 19.
 115. Conaty, P., et al., *Methods of mesenchymal stem cell homing to the blood–brain barrier*, in *Somatic Stem Cells*. 2018, Springer. p. 81-91.
 116. Sherman, L.S., et al. *Mesenchymal stem cell therapies in brain disease*. in *Seminars in cell &*

- developmental biology*. 2019. Elsevier.
117. Xu, G., et al., *Bone marrow-derived mesenchymal stem cells co-expressing interleukin-18 and interferon- β exhibit potent antitumor effect against intracranial glioma in rats*. *Oncology Reports*, 2015. **34**(4): p. 1915-1922.
 118. Einstein, O., et al., *Transplanted neural precursors enhance host brain-derived myelin regeneration*. *Journal of Neuroscience*, 2009. **29**(50): p. 15694-15702.
 119. Deshmukh, V.A., et al., *A regenerative approach to the treatment of multiple sclerosis*. *Nature*, 2013. **502**(7471): p. 327.
 120. Mansoor, S.R., E. Zabihi, and M. Ghasemi-Kasman, *The potential use of mesenchymal stem cells for the treatment of multiple sclerosis*. *Life sciences*, 2019. **235**: p. 116830.
 121. Baron, W. and D. Hoekstra, *On the biogenesis of myelin membranes: sorting, trafficking and cell polarity*. *FEBS letters*, 2010. **584**(9): p. 1760-1770.
 122. Baumann, N. and D. Pham-Dinh, *Biology of oligodendrocyte and myelin in the mammalian central nervous system*. *Physiological reviews*, 2001. **81**(2): p. 871-927.
 123. Snaidero, N., et al., *Antagonistic functions of MBP and CNP establish cytosolic channels in CNS myelin*. *Cell reports*, 2017. **18**(2): p. 314-323.
 124. Glatigny, S. and E. Bettelli, *Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) as animal models of multiple sclerosis (MS)*. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 2018. **8**(11): p. a028977.
 125. Lüders, K.A., et al., *Maintenance of high proteolipid protein level in adult central nervous system myelin is required to preserve the integrity of myelin and axons*. *Glia*, 2019. **67**(4): p. 634-649.
 126. Yamamoto, Y., et al., *Cloning and expression of myelin-associated oligodendrocytic basic protein. A novel basic protein constituting the central nervous system myelin*. *Journal of Biological Chemistry*, 1994. **269**(50): p. 31725-31730.
 127. Holz, A., et al., *Myelin-associated oligodendrocytic basic protein: identification of an encephalitogenic epitope and association with multiple sclerosis*. *The Journal of Immunology*, 2000. **164**(2): p. 1103-1109.
 128. Bielekova, B., et al., *Encephalitogenic potential of the myelin basic protein peptide (amino acids 83–99) in multiple sclerosis: results of a phase II clinical trial with an altered peptide ligand*. *Nature medicine*, 2000. **6**(10): p. 1167.
 129. Giralt, M., A. Molinero, and J. Hidalgo, *Active induction of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) with MOG 35–55 in the mouse*, in *Myelin*. 2018, Springer. p. 227-232.
 130. McKerracher, L. and K.M. Rosen, *MAG, myelin and overcoming growth inhibition in the CNS*. *Frontiers in molecular neuroscience*, 2015. **8**: p. 51.
 131. Podbielska, M., S.B. Lavery, and E.L. Hogan, *The structural and functional role of myelin fast-migrating cerebroside: pathological importance in multiple sclerosis*. *Clinical lipidology*, 2011. **6**(2): p. 159-179.
 132. Podbielska, M., et al., *Myelin recovery in multiple sclerosis: the challenge of remyelination*. *Brain sciences*, 2013. **3**(3): p. 1282-1324.
 133. White, R. and E.-M. Krämer-Albers, *Axon-glia interaction and membrane traffic in myelin formation*. *Frontiers in cellular neuroscience*, 2014. **7**: p. 284.
 134. Hemmer, B., M. Kerschensteiner, and T. Korn, *Role of the innate and adaptive immune responses in the course of multiple sclerosis*. *The Lancet Neurology*, 2015. **14**(4): p. 406-419.
 135. Salou, M., et al., *Involvement of CD8+ T cells in multiple sclerosis*. *Frontiers in immunology*, 2015. **6**: p. 604.
 136. Disanto, G., et al., *The evidence for a role of B cells in multiple sclerosis*. *Neurology*, 2012. **78**(11): p. 823-832.
 137. von Büdingen, H.-C., A. Bar-Or, and S.S. Zamvil, *B cells in multiple sclerosis: connecting the dots*. *Current opinion in immunology*, 2011. **23**(6): p. 713-720.
 138. Kasper, L.H. and J. Shoemaker, *Multiple sclerosis immunology The healthy immune system vs the MS immune system*. *Neurology*, 2010. **74**(1 Supplement 1): p. S2-S8.

139. Samson, M., et al., *Les lymphocytes TH17: différenciation, phénotype, fonctions, et implications en pathologie et thérapeutique humaine*. La Revue de médecine interne, 2011. **32**(5): p. 292-301.
140. Régent, A., et al., *Auto-immunité humorale et cellulaire: de la physiologie à la pathologie*. La Revue de médecine interne, 2009. **30**(12): p. H1-H8.
141. Salou, M., et al., *Immunité adaptative et physiopathologie de la sclérose en plaques*. La Revue de médecine interne, 2013. **34**(8): p. 479-486.
142. Fletcher, J.M., et al., *T cells in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis*. Clinical & Experimental Immunology, 2010. **162**(1): p. 1-11.
143. Petermann, F. and T. Korn, *Cytokines and effector T cell subsets causing autoimmune CNS disease*. FEBS letters, 2011. **585**(23): p. 3747-3757.
144. Komiyama, Y., et al., *IL-17 plays an important role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis*. The Journal of Immunology, 2006. **177**(1): p. 566-573.
145. Kebir, H., et al., *Human T H 17 lymphocytes promote blood-brain barrier disruption and central nervous system inflammation*. Nature medicine, 2007. **13**(10): p. 1173.
146. Venken, K., et al., *Disturbed regulatory T cell homeostasis in multiple sclerosis*. Trends in molecular medicine, 2010. **16**(2): p. 58-68.
147. Holman, D.W., R.S. Klein, and R.M. Ransohoff, *The blood–brain barrier, chemokines and multiple sclerosis*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease, 2011. **1812**(2): p. 220-230.
148. Engelhardt, B., *Immune cell entry into the central nervous system: involvement of adhesion molecules and chemokines*. Journal of the neurological sciences, 2008. **274**(1): p. 23-26.
149. Brassat, D., *Physiopathologie de la sclérose en plaques*. La presse médicale, 2010. **39**(3): p. 341-348.
150. VERMERSCH, P., *Immunologie de la sclérose en plaques: evolution des concepts*. Revue neurologique, 2008. **164**.
151. Lazibat, I., M. Rubinić Majdak, and S. Županić, *Multiple sclerosis: new aspects of immunopathogenesis*. Acta Clinica Croatica, 2018. **57**(2): p. 352-360.
152. Van Horssen, J., et al., *Radical changes in multiple sclerosis pathogenesis*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease, 2011. **1812**(2): p. 141-150.
153. Aktas, O., T. Prozorovski, and F. Zipp, *Death ligands and autoimmune demyelination*. The Neuroscientist, 2006. **12**(4): p. 305-316.
154. Friese, M.A. and L. Fugger, *Pathogenic CD8+ T cells in multiple sclerosis*. Annals of neurology, 2009. **66**(2): p. 132-141.
155. Weber, M.S., B. Hemmer, and S. Cepok, *The role of antibodies in multiple sclerosis*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease, 2011. **1812**(2): p. 239-245.
156. Maki, T., et al., *Mechanisms of oligodendrocyte regeneration from ventricular-subventricular zone-derived progenitor cells in white matter diseases*. Frontiers in cellular neuroscience, 2013. **7**: p. 275.
157. Hayakawa, K., et al., *Vascular endothelial growth factor regulates the migration of oligodendrocyte precursor cells*. Journal of Neuroscience, 2011. **31**(29): p. 10666-10670.
158. Morris-Downes, M.M., et al., *Pathological and regulatory effects of anti-myelin antibodies in experimental allergic encephalomyelitis in mice*. Journal of neuroimmunology, 2002. **125**(1): p. 114-124.
159. Olsen, J.A. and E.M. Akirav, *Remyelination in multiple sclerosis: cellular mechanisms and novel therapeutic approaches*. Journal of neuroscience research, 2015. **93**(5): p. 687-696.
160. Goldmann, T. and M. Prinz, *Role of microglia in CNS autoimmunity*. Clinical and Developmental Immunology, 2013. **2013**.
161. De Haas, A.H., et al., *Optimized isolation enables ex vivo analysis of microglia from various central nervous system regions*. Glia, 2007. **55**(13): p. 1374-1384.
162. Škuljec, J., et al., *CCL5 induces a pro-inflammatory profile in microglia in vitro*. Cellular immunology, 2011. **270**(2): p. 164-171.

163. Zuiderwijk-Sick, E.A., et al., *Differentiation of primary adult microglia alters their response to TLR8-mediated activation but not their capacity as APC*. *Glia*, 2007. **55**(15): p. 1589-1600.
164. Gibbons, H.M. and M. Dragunow, *Adult human brain cell culture for neuroscience research*. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 2010. **42**(6): p. 844-856.
165. Nagai, A., et al., *Generation and characterization of immortalized human microglial cell lines: expression of cytokines and chemokines*. *Neurobiology of disease*, 2001. **8**(6): p. 1057-1068.
166. Bertrand, S.J., et al., *Endogenous amyloidogenesis in long-term rat hippocampal cell cultures*. *BMC neuroscience*, 2011. **12**(1): p. 38.
167. Lorenz, L., et al., *Combined 17 β -Oestradiol and Progesterone Treatment Prevents Neuronal Cell Injury in Cortical but not Midbrain Neurons or Neuroblastoma Cells*. *Journal of neuroendocrinology*, 2009. **21**(10): p. 841-849.
168. Kitazawa, A. and N. Shimizu, *Differentiation of mouse embryonic stem cells into neurons using conditioned medium of dorsal root ganglia*. *Journal of bioscience and bioengineering*, 2005. **100**(1): p. 94-99.
169. Salli, U., et al., *Serotonin neurons derived from rhesus monkey embryonic stem cells: similarities to CNS serotonin neurons*. *Experimental neurology*, 2004. **188**(2): p. 351-364.
170. Agholme, L., et al., *An in vitro model for neuroscience: differentiation of SH-SY5Y cells into cells with morphological and biochemical characteristics of mature neurons*. *Journal of Alzheimer's disease*, 2010. **20**(4): p. 1069-1082.
171. Forsby, A., et al., *Neuronal in vitro models for the estimation of acute systemic toxicity*. *Toxicology in Vitro*, 2009. **23**(8): p. 1564-1569.
172. Zhang, Z., et al., *Human cortical neuronal (HCN) cell lines: a model for amyloid β neurotoxicity*. *Neuroscience letters*, 1994. **177**(1-2): p. 162-164.
173. Pleasure, S.J., C. Page, and V. Lee, *Pure, postmitotic, polarized human neurons derived from NTera 2 cells provide a system for expressing exogenous proteins in terminally differentiated neurons*. *Journal of Neuroscience*, 1992. **12**(5): p. 1802-1815.
174. Chen, K., S.M. Hughes, and B. Connor, *Neural progenitor cells derived from the adult rat subventricular zone: characterization and transplantation*. *Cell transplantation*, 2007. **16**(8): p. 799-810.
175. McCARTHY, K.D. and J. De Vellis, *Preparation of separate astroglial and oligodendroglial cell cultures from rat cerebral tissue*. *The Journal of cell biology*, 1980. **85**(3): p. 890-902.
176. Tracy, E.T., et al., *Isolation and expansion of oligodendrocyte progenitor cells from cryopreserved human umbilical cord blood*. *Cytherapy*, 2011. **13**(6): p. 722-729.
177. Buntinx, M., et al., *Characterization of three human oligodendroglial cell lines as a model to study oligodendrocyte injury: morphology and oligodendrocyte-specific gene expression*. *Journal of neurocytology*, 2003. **32**(1): p. 25-38.
178. Richter-Landsberg, C. and M. Heinrich, *OLN-93: A new permanent oligodendroglia cell line derived from primary rat brain glial cultures*. *Journal of neuroscience research*, 1996. **45**(2): p. 161-173.
179. Jung, M., et al., *Lines of murine oligodendroglial precursor cells immortalized by an activated neu tyrosine kinase show distinct degrees of interaction with axons in vitro and in vivo*. *European Journal of Neuroscience*, 1995. **7**(6): p. 1245-1265.
180. Braun, A., et al., *Selective regulation of growth factor expression in cultured cortical astrocytes by neuro-pathological toxins*. *Neurochemistry international*, 2009. **55**(7): p. 610-618.
181. De Groot, C.J., et al., *Establishment of human adult astrocyte cultures derived from postmortem multiple sclerosis and control brain and spinal cord regions: immunophenotypical and functional characterization*. *Journal of neuroscience research*, 1997. **49**(3): p. 342-354.
182. De Keyser, J., et al., *Astrocytes as potential targets to suppress inflammatory demyelinating lesions in multiple sclerosis*. *Neurochemistry international*, 2010. **57**(4): p. 446-450.
183. Kipp, M., et al., *Brain-region-specific astroglial responses in vitro after LPS exposure*. *Journal*

- of Molecular Neuroscience, 2008. **35**(2): p. 235-243.
184. Chojnacki, A. and S. Weiss, *Production of neurons, astrocytes and oligodendrocytes from mammalian CNS stem cells*. Nature protocols, 2008. **3**(6): p. 935.
 185. Fernandes, A., et al., *Astrocyte reactivity to unconjugated bilirubin requires TNF- α and IL-1 β receptor signaling pathways*. Glia, 2011. **59**(1): p. 14-25.
 186. Kim, S., et al., *Astrocytes promote TNF-mediated toxicity to oligodendrocyte precursors*. Journal of neurochemistry, 2011. **116**(1): p. 53-66.
 187. Moore, C.S., et al., *How factors secreted from astrocytes impact myelin repair*. Journal of neuroscience research, 2011. **89**(1): p. 13-21.
 188. Wolf, A., E.A. Kabat, and A.E. Bezer, *The pathology of acute disseminated encephalomyelitis produced experimentally in the rhesus monkey and its resemblance to human demyelinating disease*. Journal of Neuropathology & Experimental Neurology, 1947. **6**(4): p. 333-357.
 189. Delarasse, C., et al., *Novel pathogenic epitopes of myelin oligodendrocyte glycoprotein induce experimental autoimmune encephalomyelitis in C57BL/6 mice*. Immunology, 2013. **140**(4): p. 456-464.
 190. Zamora, A., et al., *Inhibitory effects of incomplete Freund's adjuvant on experimental autoimmune encephalomyelitis*. Autoimmunity, 2002. **35**(1): p. 21-28.
 191. STOSIC-GRUJICIC, S., et al., *Induction of experimental autoimmune encephalomyelitis in Dark Agouti rats without adjuvant*. Clinical & Experimental Immunology, 2004. **136**(1): p. 49-55.
 192. Patel, J. and R. Balabanov, *Molecular mechanisms of oligodendrocyte injury in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis*. International journal of molecular sciences, 2012. **13**(8): p. 10647-10659.
 193. Lublin, F., et al., *Delayed, relapsing experimental allergic encephalomyelitis in mice*. The Journal of Immunology, 1981. **126**(3): p. 819-822.
 194. Yamasaki, R., et al., *Differential roles of microglia and monocytes in the inflamed central nervous system*. Journal of Experimental Medicine, 2014: p. jem. 20132477.
 195. Constantinescu, C.S., et al., *Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) as a model for multiple sclerosis (MS)*. British journal of pharmacology, 2011. **164**(4): p. 1079-1106.
 196. Plant, G.T., *Optic neuritis and multiple sclerosis*. Current opinion in neurology, 2008. **21**(1): p. 16-21.
 197. Höflich, K.M., et al., *Acute axonal damage in three different murine models of multiple sclerosis: A comparative approach*. Brain research, 2016. **1650**: p. 125-133.
 198. Steinman, L. and S.S. Zamvil, *How to successfully apply animal studies in experimental allergic encephalomyelitis to research on multiple sclerosis*. Annals of neurology, 2006. **60**(1): p. 12-21.
 199. Staykova, M.A., et al., *Nitric oxide contributes to resistance of the Brown Norway rat to experimental autoimmune encephalomyelitis*. The American journal of pathology, 2005. **166**(1): p. 147-157.
 200. Ravkina, L., V. Rogova, and L. Lazarenko, *Chronic experimental allergic encephalomyelitis in rhesus monkeys and its modification by treatment*. Journal of the neurological sciences, 1978. **38**(3): p. 281-293.
 201. Burm, S.M., et al., *Expression of IL-1 β in rhesus EAE and MS lesions is mainly induced in the CNS itself*. Journal of neuroinflammation, 2016. **13**(1): p. 138.
 202. Hart, T., et al., *The primate EAE model points at EBV-infected B cells as a preferential therapy target in multiple sclerosis*. Frontiers in immunology, 2013. **4**: p. 145.
 203. Maggi, P., et al., *The formation of inflammatory demyelinated lesions in cerebral white matter*. Annals of neurology, 2014. **76**(4): p. 594-608.
 204. de Rosbo, N.K., et al., *Rhesus monkeys are highly susceptible to experimental autoimmune encephalomyelitis induced by myelin oligodendrocyte glycoprotein: characterisation of immunodominant T-and B-cell epitopes*. Journal of neuroimmunology, 2000. **110**(1): p. 83-96.

205. Swanborg, R.H., *Animal models of human disease Experimental autoimmune encephalomyelitis in rodents as a model for human demyelinating disease*. Clinical immunology and immunopathology, 1995. **77**(1): p. 4-13.
206. Swanborg, R.H., *Experimental autoimmune encephalomyelitis in the rat: lessons in T-cell immunology and autoreactivity*. Immunological reviews, 2001. **184**(1): p. 129-135.
207. Stepaniak, J.A., et al., *Interstrain variability of autoimmune encephalomyelitis in rats: multiple encephalitogenic myelin basic protein epitopes for DA rats*. Journal of neuroimmunology, 1997. **78**(1): p. 79-85.
208. Mannie, M., R.H. Swanborg, and J.A. Stepaniak, *Experimental autoimmune encephalomyelitis in the rat*. Current Protocols in Immunology, 2009: p. 15.2. 1-15.2. 15.
209. Shin, T., M. Ahn, and Y. Matsumoto, *Mechanism of experimental autoimmune encephalomyelitis in Lewis rats: recent insights from macrophages*. Anatomy & cell biology, 2012. **45**(3): p. 141-148.
210. Willenborg, D.O., *Mechanisms of recovery and acquired resistance in Lewis rat experimental allergic encephalomyelitis*. Immunology and Cell Biology, 1981. **59**(2): p. 125.
211. Levine, S. and E.J. Wenk, *Induction of experimental allergic encephalomyelitis in rats without the aid of adjuvant*. Annals of the New York Academy of Sciences, 1965. **122**(1): p. 209-224.
212. Adelman, M., et al., *The N-terminal domain of the myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG) induces acute demyelinating experimental autoimmune encephalomyelitis in the Lewis rat*. Journal of neuroimmunology, 1995. **63**(1): p. 17-27.
213. Kerschensteiner, M., et al., *Targeting experimental autoimmune encephalomyelitis lesions to a predetermined axonal tract system allows for refined behavioral testing in an animal model of multiple sclerosis*. The American journal of pathology, 2004. **164**(4): p. 1455-1469.
214. Sasaki, M., et al., *Focal experimental autoimmune encephalomyelitis in the Lewis rat induced by immunization with myelin oligodendrocyte glycoprotein and intraspinal injection of vascular endothelial growth factor*. Glia, 2010. **58**(13): p. 1523-1531.
215. Merkler, D., et al., *A new focal EAE model of cortical demyelination: multiple sclerosis-like lesions with rapid resolution of inflammation and extensive remyelination*. Brain, 2006. **129**(8): p. 1972-1983.
216. Chalk, J.B., et al., *Clinical and histological findings in proteolipid protein-induced experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) in the Lewis rat. Distribution of demyelination differs from that in EAE induced by other antigens*. Journal of the neurological sciences, 1994. **123**(1-2): p. 154-161.
217. Kojima, K., et al., *Experimental autoimmune panencephalitis and uveoretinitis transferred to the Lewis rat by T lymphocytes specific for the S100 beta molecule, a calcium binding protein of astroglia*. Journal of Experimental Medicine, 1994. **180**(3): p. 817-829.
218. Miller, S.D., W.J. Karpus, and T.S. Davidson, *Experimental autoimmune encephalomyelitis in the mouse*. Current protocols in immunology, 2007: p. 15.1. 1-15.1. 20.
219. Croxford, A.L., F.C. Kurschus, and A. Waisman, *Mouse models for multiple sclerosis: historical facts and future implications*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease, 2011. **1812**(2): p. 177-183.
220. Zamvil, S., et al., *T-cell clones specific for myelin basic protein induce chronic relapsing paralysis and demyelination*. Nature, 1985. **317**(6035): p. 355.
221. Kono, D.H., et al., *Two minor determinants of myelin basic protein induce experimental allergic encephalomyelitis in SJL/J mice*. Journal of Experimental Medicine, 1988. **168**(1): p. 213-227.
222. Terry, R.L., I. Ifergan, and S.D. Miller, *Experimental autoimmune encephalomyelitis in mice, in Multiple Sclerosis*. 2014, Springer. p. 145-160.
223. Rasmussen, S., et al., *Persistent activation of microglia is associated with neuronal dysfunction of callosal projecting pathways and multiple sclerosis-like lesions in relapsing–remitting experimental autoimmune encephalomyelitis*. Brain, 2007. **130**(11): p. 2816-2829.
224. Adlard, K., et al., *Immunoregulation of encephalitogenic MBP-NAc1-11-reactive T cells by*

- CD4+ TCR-specific T cells involves IL-4, IL-10 and IFN- γ* . *Autoimmunity*, 1999. **31**(4): p. 237-248.
225. Bettelli, E., et al., *Myelin oligodendrocyte glycoprotein-specific T cell receptor transgenic mice develop spontaneous autoimmune optic neuritis*. *Journal of Experimental Medicine*, 2003. **197**(9): p. 1073-1081.
226. Litzenburger, T., et al., *B lymphocytes producing demyelinating autoantibodies: development and function in gene-targeted transgenic mice*. *Journal of Experimental Medicine*, 1998. **188**(1): p. 169-180.
227. Jäger, A., et al., *Th1, Th17, and Th9 effector cells induce experimental autoimmune encephalomyelitis with different pathological phenotypes*. *The Journal of Immunology*, 2009. **183**(11): p. 7169-7177.
228. Anderson, A.C., et al., *A transgenic model of central nervous system autoimmunity mediated by CD4+ and CD8+ T and B cells*. *The Journal of Immunology*, 2012. **188**(5): p. 2084-2092.
229. Bittner, S., et al., *Myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG35-55) induced experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) in C57BL/6 mice*. *Journal of visualized experiments: JoVE*, 2014(86).
230. Ditamo, Y., et al., *Age-related changes in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis*. *Immunology & Cell Biology*, 2005. **83**(1): p. 75-82.
231. Berard, J.L., et al., *Characterization of relapsing–remitting and chronic forms of experimental autoimmune encephalomyelitis in C57BL/6 mice*. *Glia*, 2010. **58**(4): p. 434-445.
232. Hjelmström, P., et al., *Cutting edge: B cell-deficient mice develop experimental allergic encephalomyelitis with demyelination after myelin oligodendrocyte glycoprotein sensitization*. *The Journal of Immunology*, 1998. **161**(9): p. 4480-4483.
233. Bullard, D.C., et al., *p150/95 (CD11c/CD18) expression is required for the development of experimental autoimmune encephalomyelitis*. *The American journal of pathology*, 2007. **170**(6): p. 2001-2008.
234. Koh, D.-R., et al., *Less mortality but more relapses in experimental allergic encephalomyelitis in CD8-/-mice*. *Science*, 1992. **256**(5060): p. 1210-1213.
235. Baron, J.L., et al., *Surface expression of alpha 4 integrin by CD4 T cells is required for their entry into brain parenchyma*. *Journal of Experimental Medicine*, 1993. **177**(1): p. 57-68.
236. Rodriguez, M., *Effectors of demyelination and remyelination in the CNS: implications for multiple sclerosis*. *Brain Pathology*, 2007. **17**(2): p. 219-229.
237. Carlton, W.W., *Response of mice to the chelating agents sodium diethyldithiocarbamate, α -benzoinoxime, and biscyclohexanone oxaldihydrazone*. *Toxicology and applied pharmacology*, 1966. **8**(3): p. 512-521.
238. Love, S., *Cuprizone neurotoxicity in the rat: morphologic observations*. *Journal of the neurological sciences*, 1988. **84**(2-3): p. 223-237.
239. Silvestroff, L., et al., *Cuprizone-induced demyelination in the rat cerebral cortex and thyroid hormone effects on cortical remyelination*. *Experimental neurology*, 2012. **235**(1): p. 357-367.
240. Hiremath, M., et al., *Microglial/macrophage accumulation during cuprizone-induced demyelination in C57BL/6 mice*. *Journal of neuroimmunology*, 1998. **92**(1): p. 38-49.
241. Schultz, V., et al., *Acutely damaged axons are remyelinated in multiple sclerosis and experimental models of demyelination*. *Glia*, 2017. **65**(8): p. 1350-1360.
242. Yoshikawa, K., et al., *Inhibition of 5-lipoxygenase activity in mice during cuprizone-induced demyelination attenuates neuroinflammation, motor dysfunction and axonal damage*. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 2011. **85**(1): p. 43-52.
243. Janssen, K., et al., *Absence of CCL2 and CCL3 ameliorates central nervous system grey matter but not white matter demyelination in the presence of an intact blood–brain barrier*. *Molecular neurobiology*, 2016. **53**(3): p. 1551-1564.
244. Bakker, D.A. and S.K. Ludwin, *Blood-brain barrier permeability during cuprizone-induced demyelination: implications for the pathogenesis of immune-mediated demyelinating diseases*. *Journal of the neurological sciences*, 1987. **78**(2): p. 125-137.

245. Blakemore, W. and R. Franklin, *Remyelination in experimental models of toxin-induced demyelination*, in *Advances in multiple Sclerosis and Experimental Demyelinating Diseases*. 2008, Springer. p. 193-212.
246. Bjelobaba, I., et al., *Animal models of multiple sclerosis: Focus on experimental autoimmune encephalomyelitis*. *Journal of neuroscience research*, 2018. **96**(6): p. 1021-1042.
247. Bjelobaba, I., D. Savic, and I. Lavrnja, *Multiple sclerosis and neuroinflammation: the overview of current and prospective therapies*. *Current pharmaceutical design*, 2017. **23**(5): p. 693-730.
248. Theiler, M., *Spontaneous encephalomyelitis of mice—a new virus disease*. *Science*, 1934. **80**(2066): p. 122-122.
249. Lipton, H.L., *Theiler's virus infection in mice: an unusual biphasic disease process leading to demyelination*. *Infection and immunity*, 1975. **11**(5): p. 1147-1155.
250. Rodrigues, D.M., et al., *Theiler's murine encephalomyelitis virus in nonbarrier rat colonies*. *Comparative medicine*, 2005. **55**(5): p. 459-464.
251. Melvold, R., et al., *Variations in genetic control of susceptibility to Theiler's murine encephalomyelitis virus (TMEV)-induced demyelinating disease. I. Differences between susceptible SJL/J and resistant BALB/c strains map near the T cell beta-chain constant gene on chromosome 6*. *The Journal of Immunology*, 1987. **138**(5): p. 1429-1433.
252. Zoecklein, L.J., et al., *Direct comparison of demyelinating disease induced by the Daniel's strain and BeAn strain of Theiler's murine encephalomyelitis virus*. *Brain pathology*, 2003. **13**(3): p. 291-308.
253. Canto, M.D., R. Melvold, and B. Kim, *A hybrid between a resistant and a susceptible strain of mouse alters the pattern of Theiler's murine encephalomyelitis virus-induced white matter disease and favors oligodendrocyte-mediated remyelination*. *Multiple Sclerosis Journal*, 1995. **1**(2): p. 95-103.
254. Lassmann, H. and M. Bradl, *Multiple sclerosis: experimental models and reality*. *Acta neuropathologica*, 2017. **133**(2): p. 223-244.
255. Sato, F., et al., *Theiler's virus infection: Pathophysiology of demyelination and neurodegeneration*. *Pathophysiology*, 2011. **18**(1): p. 31-41.
256. Procaccini, C., et al., *Animal models of multiple sclerosis*. *European journal of pharmacology*, 2015. **759**: p. 182-191.
257. McGavern, D.B., P.D. Murray, and M. Rodriguez, *Quantitation of spinal cord demyelination, remyelination, atrophy, and axonal loss in a model of progressive neurologic injury*. *Journal of neuroscience research*, 1999. **58**(4): p. 492.
258. Getts, M.T., M.H. Richards, and S.D. Miller, *A critical role for virus-specific CD8+ CTLs in protection from Theiler's virus-induced demyelination in disease-susceptible SJL mice*. *Virology*, 2010. **402**(1): p. 102-111.
259. Whitham, R.H., et al., *Lymphocytes from SJL/J mice immunized with spinal cord respond selectively to a peptide of proteolipid protein and transfer relapsing demyelinating experimental autoimmune encephalomyelitis*. *The Journal of Immunology*, 1991. **146**(1): p. 101-107.
260. Miyagawa, F., et al., *The use of mouse models to better understand mechanisms of autoimmunity and tolerance*. *Journal of autoimmunity*, 2010. **35**(3): p. 192-198.
261. Tsunoda, I. and R.S. Fujinami, *Neuropathogenesis of Theiler's murine encephalomyelitis virus infection, an animal model for multiple sclerosis*. *Journal of neuroimmune pharmacology*, 2010. **5**(3): p. 355-369.
262. Pachner, A.R., *Experimental models of multiple sclerosis*. *Current opinion in neurology*, 2011. **24**(3): p. 291-299.
263. Bieber, A.J., S. Kerr, and M. Rodriguez, *Efficient central nervous system remyelination requires T cells*. *Annals of neurology*, 2003. **53**(5): p. 680-684.
264. Batoulis, H., et al., *Experimental autoimmune encephalomyelitis—achievements and prospective advances*. *Apmis*, 2011. **119**(12): p. 819-830.
265. Rangachari, M., et al., *Bat3 promotes T cell responses and autoimmunity by repressing Tim-3-mediated cell death and exhaustion*. *Nature medicine*, 2012. **18**(9): p. 1394.

266. Al-Izki, S., et al., *Practical guide to the induction of relapsing progressive experimental autoimmune encephalomyelitis in the Biozzi ABH mouse*. Multiple sclerosis and related disorders, 2012. **1**(1): p. 29-38.
267. Brzezinski, A., *Melatonin in humans*. New England journal of medicine, 1997. **336**(3): p. 186-195.
268. Rosengarten, H., E. Meller, and A. Friedhoff, *In vitro enzymatic formation of melatonin by human erythrocytes*. Research communications in chemical pathology and pharmacology, 1972. **4**(2): p. 457.
269. McCord, C.P. and F.P. Allen, *Evidences associating pineal gland function with alterations in pigmentation*. Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology, 1917. **23**(1): p. 207-224.
270. Gonzalez-Haba, M., et al., *High-affinity binding of melatonin by human circulating T lymphocytes (CD4+)*. The FASEB journal, 1995. **9**(13): p. 1331-1335.
271. Reiter, R.J., *Melatonin: clinical relevance*. Best practice & research clinical endocrinology & metabolism, 2003. **17**(2): p. 273-285.
272. Klein, D.C., et al., *The melatonin rhythm-generating enzyme: molecular regulation of serotonin N-acetyltransferase in the pineal gland*. Recent progress in hormone research, 1997. **52**: p. 307-358.
273. Coon, S.L., et al., *Pineal serotonin N-acetyltransferase: expression cloning and molecular analysis*. Science, 1995. **270**(5242): p. 1681-1683.
274. Ribelayga, C., P. Pévet, and V. Simonneaux, *HIOMT drives the photoperiodic changes in the amplitude of the melatonin peak of the Siberian hamster*. American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology, 2000. **278**(5): p. R1339-R1345.
275. Menendez-Pelaez, A. and R.J. Reiter, *Distribution of melatonin in mammalian tissues: the relative importance of nuclear versus cytosolic localization*. Journal of pineal research, 1993. **15**(2): p. 59-69.
276. Bechgaard, E., K. Lindhardt, and L. Martinsen, *Intranasal absorption of melatonin in vivo bioavailability study*. International journal of pharmaceutics, 1999. **182**(1): p. 1-5.
277. Waldhauser, F., et al., *Bioavailability of oral melatonin in humans*. Neuroendocrinology, 1984. **39**(4): p. 307-313.
278. Skene, D.J., et al., *Contribution of CYP1A2 in the hepatic metabolism of melatonin: studies with isolated microsomal preparations and liver slices*. Journal of pineal research, 2001. **31**(4): p. 333-342.
279. Ritzenthaler, T., et al., *Nocturnal urine melatonin and 6-sulphatoxymelatonin excretion at the acute stage of ischaemic stroke*. Journal of pineal research, 2009. **46**(3): p. 349-352.
280. Hirata, F. and O. Hayaishi, *New degradative routes of 5-hydroxytryptophan and serotonin by intestinal tryptophan 2, 3-dioxygenase*. Biochemical and biophysical research communications, 1972. **47**(5): p. 1112-1119.
281. Kokkola, T. and J.T. Laitinen, *Melatonin receptor genes*. Annals of medicine, 1998. **30**(1): p. 88-94.
282. Pandi-Perumal, S.R., et al., *Physiological effects of melatonin: role of melatonin receptors and signal transduction pathways*. Progress in neurobiology, 2008. **85**(3): p. 335-353.
283. Nosjean, O., et al., *Identification of the Melatonin-binding SiteMT 3 as the Quinone Reductase 2*. Journal of Biological Chemistry, 2000. **275**(40): p. 31311-31317.
284. Jockers, R., et al., *Melatonin receptors, heterodimerization, signal transduction and binding sites: what's new?* British journal of pharmacology, 2008. **154**(6): p. 1182-1195.
285. Wiesenberg, I., et al., *Transcriptional activation of the nuclear receptor RZR α by the pineal gland hormone melatonin and identification of CGP 52608 as a synthetic ligand*. Nucleic Acids Research, 1995. **23**(3): p. 327-333.
286. Jetten, A.M. and E. Ueda, *The ROR nuclear orphan receptor subfamily: critical regulators of multiple biological processes*. 2001.

287. Lardone, P.J., et al., *Melatonin synthesized by T lymphocytes as a ligand of the retinoic acid-related orphan receptor*. Journal of pineal research, 2011. **51**(4): p. 454-462.
288. Reiter, R.J., et al., *Melatonin and its relation to the immune system and inflammation*. Annals of the New York Academy of Sciences, 2000. **917**(1): p. 376-386.
289. Hardeland, R., S. Pandi-Perumal, and D.P. Cardinali, *Melatonin*. The international journal of biochemistry & cell biology, 2006. **38**(3): p. 313-316.
290. Hardeland, R., *Melatonin and the theories of aging: a critical appraisal of melatonin's role in antiaging mechanisms*. Journal of pineal research, 2013. **55**(4): p. 325-356.
291. Reiter, R.J., D.X. Tan, and A. Galano, *Melatonin: exceeding expectations*. Physiology, 2014. **29**(5): p. 325-333.
292. Radogna, F., M. Diederich, and L. Ghibelli, *Melatonin: a pleiotropic molecule regulating inflammation*. Biochemical pharmacology, 2010. **80**(12): p. 1844-1852.
293. Brainard, G.C., et al., *Neuroendocrine regulation of immune parameters: Photoperiod control of the spleen in Syrian hamsters*. Annals of the New York Academy of Sciences, 1988. **540**(1): p. 704-706.
294. Carrillo-Vico, A., et al., *A review of the multiple actions of melatonin on the immune system*. Endocrine, 2005. **27**(2): p. 189-200.
295. Rai, S. and C. Haldar, *Pineal control of immune status and hematological changes in blood and bone marrow of male squirrels (*Funambulus pennanti*) during their reproductively active phase*. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, 2003. **136**(4): p. 319-328.
296. Pioli, C., M.C. Caroleo, and G. Doriac, *Melatonin increases antigen presentation and amplifies specific and non specific signals for T-cell proliferation*. International journal of immunopharmacology, 1993. **15**(4): p. 463-468.
297. Carrillo-Vico, A., et al., *Melatonin: buffering the immune system*. International Journal of Molecular Sciences, 2013. **14**(4): p. 8638-8683.
298. Carrillo-Vico, A., et al., *Beneficial pleiotropic actions of melatonin in an experimental model of septic shock in mice: regulation of pro-/anti-inflammatory cytokine network, protection against oxidative damage and anti-apoptotic effects*. Journal of pineal research, 2005. **39**(4): p. 400-408.
299. Liu, H., et al., *Role of CD4+ CD25+ regulatory T cells in melatonin-mediated inhibition of murine gastric cancer cell growth in vivo and in vitro*. The Anatomical Record, 2011. **294**(5): p. 781-788.
300. Akpınar, Z., et al., *The association of nocturnal serum melatonin levels with major depression in patients with acute multiple sclerosis*. Psychiatry research, 2008. **161**(2): p. 253-257.
301. Guerrero, J.M. and R.J. Reiter, *Melatonin-immune system relationships*. Current topics in medicinal chemistry, 2002. **2**(2): p. 167-179.
302. Kühlwein, E. and M. Irwin, *Melatonin modulation of lymphocyte proliferation and Th1/Th2 cytokine expression*. Journal of neuroimmunology, 2001. **117**(1-2): p. 51-57.
303. Melamud, L., et al., *Melatonin dysregulation, sleep disturbances and fatigue in multiple sclerosis*. Journal of the neurological sciences, 2012. **314**(1): p. 37-40.
304. Álvarez-Sánchez, N., et al., *Melatonin controls experimental autoimmune encephalomyelitis by altering the T effector/regulatory balance*. Brain, behavior, and immunity, 2015. **50**: p. 101-114.
305. Pot, C., et al. *Induction of regulatory Tr1 cells and inhibition of TH17 cells by IL-27*. in *Seminars in immunology*. 2011. Elsevier.
306. Mascanfroni, I.D., et al., *IL-27 acts on DCs to suppress the T cell response and autoimmunity by inducing expression of the immunoregulatory molecule CD39*. Nature immunology, 2013. **14**(10): p. 1054.

307. Farez, M.F., et al., *Anti-inflammatory effects of melatonin in multiple sclerosis*. *BioEssays*, 2016. **38**(10): p. 1016-1026.
308. Kang, J., et al., *Melatonin ameliorates autoimmune encephalomyelitis through suppression of intercellular adhesion molecule-1*. *Journal of veterinary science*, 2001. **2**(2): p. 85-90.
309. Melamud, L., et al., *Melatonin dysregulation, sleep disturbances and fatigue in multiple sclerosis*. *Journal of the neurological sciences*, 2012. **314**(1-2): p. 37-40.
310. Dunford, E.C., et al., *PDH activation during in vitro muscle contractions in PDH kinase 2 knockout mice: effect of PDH kinase 1 compensation*. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 2011. **300**(6): p. R1487-R1493.
311. Goodpaster, B.H. and L.M. Sparks, *Metabolic flexibility in health and disease*. *Cell metabolism*, 2017. **25**(5): p. 1027-1036.
312. Jha, M.K., I.-K. Lee, and K. Suk, *Metabolic reprogramming by the pyruvate dehydrogenase kinase–lactic acid axis: Linking metabolism and diverse neuropathophysiology*. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 2016. **68**: p. 1-19.
313. Zhao, Y., E.B. Butler, and M. Tan, *Targeting cellular metabolism to improve cancer therapeutics*. *Cell death & disease*, 2013. **4**(3): p. e532.
314. Shen, H., et al., *Dual-targeting of aberrant glucose metabolism in glioblastoma*. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 2015. **34**(1): p. 14.
315. Patel, M.S., et al., *The pyruvate dehydrogenase complexes: structure-based function and regulation*. *Journal of Biological Chemistry*, 2014. **289**(24): p. 16615-16623.
316. Stacpoole, P.W., *Therapeutic targeting of the pyruvate dehydrogenase complex/pyruvate dehydrogenase kinase (PDC/PDK) axis in cancer*. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 2017. **109**(11).
317. Tareen, S.H., et al., *Exploring the cellular network of metabolic flexibility in the adipose tissue*. *Genes & nutrition*, 2018. **13**(1): p. 17.
318. Jeoung, N.H., *Pyruvate dehydrogenase kinases: therapeutic targets for diabetes and cancers*. *Diabetes & metabolism journal*, 2015. **39**(3): p. 188-197.
319. Morales-Alamo, D., et al., *Skeletal muscle pyruvate dehydrogenase phosphorylation and lactate accumulation during sprint exercise in normoxia and severe acute hypoxia: Effects of antioxidants*. *Frontiers in physiology*, 2018. **9**: p. 188.
320. Chakraborty, G., et al., *Intraneuronal N-acetylaspartate supplies acetyl groups for myelin lipid synthesis: evidence for myelin-associated aspartoacylase*. *Journal of neurochemistry*, 2001. **78**(4): p. 736-745.
321. Moffett, J.R., et al., *N-Acetylaspartate in the CNS: from neurodiagnostics to neurobiology*. *Progress in neurobiology*, 2007. **81**(2): p. 89-131.
322. Cader, S., et al., *Discordant white matter N-acetylaspartate and diffusion MRI measures suggest that chronic metabolic dysfunction contributes to axonal pathology in multiple sclerosis*. *Neuroimage*, 2007. **36**(1): p. 19-27.
323. Moffett, J.R., et al., *N-Acetylaspartate reductions in brain injury: impact on post-injury neuroenergetics, lipid synthesis, and protein acetylation*. *Frontiers in neuroenergetics*, 2013. **5**: p. 11.
324. Kalman, B., K. Laitinen, and S. Komoly, *The involvement of mitochondria in the pathogenesis of multiple sclerosis*. *Journal of neuroimmunology*, 2007. **188**(1-2): p. 1-12.
325. Sedel, F., et al., *Targeting demyelination and virtual hypoxia with high-dose biotin as a treatment for progressive multiple sclerosis*. *Neuropharmacology*, 2016. **110**: p. 644-653.
326. Saher, G., et al., *High cholesterol level is essential for myelin membrane growth*. *Nature neuroscience*, 2005. **8**(4): p. 468.
327. Tress, O., et al., *Panglial gap junctional communication is essential for maintenance of myelin in the CNS*. *Journal of Neuroscience*, 2012. **32**(22): p. 7499-7518.
328. Hirrlinger, J. and R. Dringen, *The cytosolic redox state of astrocytes: maintenance, regulation and functional implications for metabolite trafficking*. *Brain research reviews*, 2010. **63**(1-2):

- p. 177-188.
329. Lee, Y., et al., *Oligodendroglia metabolically support axons and contribute to neurodegeneration*. Nature, 2012. **487**(7408): p. 443.
330. Fünfschilling, U., et al., *Glycolytic oligodendrocytes maintain myelin and long-term axonal integrity*. Nature, 2012. **485**(7399): p. 517.
331. Rinholm, J. and L. Bergersen, *White matter lactate—does it matter?* Neuroscience, 2014. **276**: p. 109-116.
332. Fransen, M., C. Lismont, and P. Walton, *The peroxisome-mitochondria connection: How and Why?* International journal of molecular sciences, 2017. **18**(6): p. 1126.
333. Dietschy, J.M., *Central nervous system: cholesterol turnover, brain development and neurodegeneration*. Biological chemistry, 2009. **390**(4): p. 287-293.
334. Lavrnja, I., et al., *Expression profiles of cholesterol metabolism-related genes are altered during development of experimental autoimmune encephalomyelitis in the rat spinal cord*. Scientific reports, 2017. **7**(1): p. 2702.
335. Lopaschuk, G.D., et al., *Myocardial fatty acid metabolism in health and disease*. Physiological reviews, 2010. **90**(1): p. 207-258.
336. Wanders, R.J., H.R. Waterham, and S. Ferdinandusse, *Metabolic interplay between peroxisomes and other subcellular organelles including mitochondria and the endoplasmic reticulum*. Frontiers in cell and developmental biology, 2016. **3**: p. 83.
337. McClelland, G.B., et al., *Peroxisomal membrane monocarboxylate transporters: evidence for a redox shuttle system?* Biochemical and biophysical research communications, 2003. **304**(1): p. 130-135.
338. Haas, R. and Z. Zolkipli. *Mitochondrial disorders affecting the nervous system*. in *Seminars in neurology*. 2014. Thieme Medical Publishers.
339. Emes, R.D., *The Logic of Evolution: Review of the Logic of Chance by Eugene V. Koonin*. Frontiers in Genetics, 2012. **3**: p. 135.
340. Mahad, D., et al., *Mitochondrial defects in acute multiple sclerosis lesions*. Brain, 2008. **131**(7): p. 1722-1735.
341. Patergnani, S., et al., *Mitochondria in multiple sclerosis: molecular mechanisms of pathogenesis*, in *International review of cell and molecular biology*. 2017, Elsevier. p. 49-103.
342. Nikić, I., et al., *A reversible form of axon damage in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis*. Nature medicine, 2011. **17**(4): p. 495.
343. Campbell, G.R., et al., *Mitochondrial changes within axons in multiple sclerosis: an update*. Current opinion in neurology, 2012. **25**(3): p. 221-230.
344. Yao, J., et al., *Mitochondrial bioenergetic deficit precedes Alzheimer's pathology in female mouse model of Alzheimer's disease*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2009. **106**(34): p. 14670-14675.
345. Barcelos, I.P.d., R.M. Troxell, and J.S. Graves, *Mitochondrial dysfunction and multiple sclerosis*. Biology, 2019. **8**(2): p. 37.
346. Kozin, M., O. Kulakova, and O. Favorova, *Involvement of mitochondria in neurodegeneration in multiple sclerosis*. Biochemistry (Moscow), 2018. **83**(7): p. 813-830.
347. Howarth, C., P. Gleeson, and D. Attwell, *Updated energy budgets for neural computation in the neocortex and cerebellum*. Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism, 2012. **32**(7): p. 1222-1232.
348. Dziedzic, T., et al., *Wallerian degeneration: a major component of early axonal pathology in multiple sclerosis*. Brain pathology, 2010. **20**(5): p. 976-985.
349. Mahad, D.H., B.D. Trapp, and H. Lassmann, *Pathological mechanisms in progressive multiple sclerosis*. The Lancet Neurology, 2015. **14**(2): p. 183-193.
350. Zambonin, J.L., et al., *Increased mitochondrial content in remyelinated axons: implications for multiple sclerosis*. Brain, 2011. **134**(7): p. 1901-1913.
351. Campbell, G. and D.J. Mahad, *Mitochondrial dysfunction and axon degeneration in progressive multiple sclerosis*. FEBS letters, 2018. **592**(7): p. 1113-1121.
352. Kiryu-Seo, S., et al., *Demyelination increases axonal stationary mitochondrial size and the*

- speed of axonal mitochondrial transport*. Journal of Neuroscience, 2010. **30**(19): p. 6658-6666.
353. Dendrou, C.A., L. Fugger, and M.A. Friese, *Immunopathology of multiple sclerosis*. Nature Reviews Immunology, 2015. **15**(9): p. 545-558.
354. Campbell, G.R., et al., *Mitochondrial DNA deletions and neurodegeneration in multiple sclerosis*. Annals of neurology, 2011. **69**(3): p. 481-492.
355. Witte, M.E., et al., *Mitochondrial dysfunction contributes to neurodegeneration in multiple sclerosis*. Trends in molecular medicine, 2014. **20**(3): p. 179-187.
356. Nashold, F.E., et al., *One calcitriol dose transiently increases Helios+ FoxP3+ T cells and ameliorates autoimmune demyelinating disease*. Journal of neuroimmunology, 2013. **263**(1-2): p. 64-74.
357. Kehr, J., *Monitoring chemistry of brain microenvironment: biosensors, microdialysis and related techniques*, in *Modern techniques in neuroscience research*. 1999, Springer. p. 1149-1198.
358. Shannon, R.J., et al., *Extracellular N-acetylaspartate in human traumatic brain injury*. Journal of neurotrauma, 2016. **33**(4): p. 319-329.
359. Pliss, L., et al., *Cerebral developmental abnormalities in a mouse with systemic pyruvate dehydrogenase deficiency*. PloS one, 2013. **8**(6): p. e67473.
360. Johnson, M.T., et al., *Inactivation of the murine pyruvate dehydrogenase (Pdha1) gene and its effect on early embryonic development*. Molecular genetics and metabolism, 2001. **74**(3): p. 293-302.
361. Pliss, L., et al., *Biochemical and structural brain alterations in female mice with cerebral pyruvate dehydrogenase deficiency*. Journal of neurochemistry, 2004. **91**(5): p. 1082-1091.
362. Hagemeyer, K., W. Brück, and T. Kuhlmann, *Multiple sclerosis-remyelination failure as a cause of disease progression*. Histology and histopathology, 2012. **27**(3): p. 277-287.
363. Reiter, R., et al., *Melatonin defeats neurally-derived free radicals*. J. Physiol. Pharmacol, 2007. **6**: p. 5-22.
364. Uysal, S., et al., *Increased serum levels of some inflammatory markers in patients with multiple sclerosis*. Minerva medica, 2014. **105**(3): p. 229-235.
365. Becker, K.L., R. Snider, and E.S. Nylen, *Procalcitonin in sepsis and systemic inflammation: a harmful biomarker and a therapeutic target*. British journal of pharmacology, 2010. **159**(2): p. 253-264.
366. Neeb, L., et al., *Methylprednisolone iv alters levels of CGRP and melatonin in cluster headache patients*. The journal of headache and pain, 2013. **14**(1): p. P63.
367. Linscheid, P., et al., *Expression and secretion of procalcitonin and calcitonin gene-related peptide by adherent monocytes and by macrophage-activated adipocytes*. Critical care medicine, 2004. **32**(8): p. 1715-1721.
368. Viswanathan, M., *Melatonin inhibits calcitonin gene-related peptide-induced vasodilation and increase in cAMP in rat middle cerebral arteries*. European journal of pharmacology, 2001. **415**(2-3): p. 247-250.
369. Kępczyńska, K., et al., *Bone metabolism and vitamin D status in patients with multiple sclerosis*. Neurologia i neurochirurgia polska, 2016. **50**(4): p. 251-257.
370. Ladizesky, M.G., et al., *Effect of melatonin on bone metabolism in ovariectomized rats*. Life sciences, 2001. **70**(5): p. 557-565.
371. Ostrowska, Z., et al., *The relationship between bone metabolism, melatonin and other hormones in sham-operated and pinealectomized rats*. Endocrine Regulations, 2003. **37**(4): p. 211-224.
372. Ladizesky, M.G., et al., *Melatonin effect on bone metabolism in rats treated with methylprednisolone*. Journal of pineal research, 2006. **40**(4): p. 297-304.
373. Dionyssiotis, Y., *Bone loss and fractures in multiple sclerosis: focus on epidemiologic and physiopathological features*. International journal of general medicine, 2011. **4**: p. 505.
374. Sharan, K., et al., *Regulation of bone mass through pineal-derived melatonin-MT 2 receptor pathway*. Journal of pineal research, 2017. **63**(2): p. e12423.

375. Han, Y., et al., *Melatonin promotes osteoblast differentiation by regulating Osterix protein stability and expression*. Scientific Reports, 2017. **7**(1): p. 5716.
376. Zhou, L., et al., *Melatonin at pharmacological concentrations suppresses osteoclastogenesis via the attenuation of intracellular ROS*. Osteoporosis International, 2017. **28**(12): p. 3325-3337.
377. Moen, S.M., et al., *Bone turnover and metabolism in patients with early multiple sclerosis and prevalent bone mass deficit: a population-based case-control study*. PLoS One, 2012. **7**(9): p. e45703.
378. Chen, S.-J., et al., *Melatonin enhances interleukin-10 expression and suppresses chemotaxis to inhibit inflammation in situ and reduce the severity of experimental autoimmune encephalomyelitis*. International immunopharmacology, 2016. **31**: p. 169-177.
379. Sandyk, R., *Multiple sclerosis: the role of puberty and the pineal gland in its pathogenesis*. International journal of neuroscience, 1993. **68**(3-4): p. 209-225.
380. Batoulis, H., K. Addicks, and S. Kuerten, *Emerging concepts in autoimmune encephalomyelitis beyond the CD4/TH1 paradigm*. Annals of Anatomy-Anatomischer Anzeiger, 2010. **192**(4): p. 179-193.
381. Bernardes, D., et al., *Differential brain and spinal cord cytokine and BDNF levels in experimental autoimmune encephalomyelitis are modulated by prior and regular exercise*. Journal of neuroimmunology, 2013. **264**(1-2): p. 24-34.
382. Ghareghani, M., et al., *Melatonin increases oligodendrocyte differentiation in cultured neural stem cells*. Cellular and molecular neurobiology, 2017. **37**(7): p. 1319-1324.
383. Ghareghani, M., et al., *Melatonin exacerbates acute experimental autoimmune encephalomyelitis by enhancing the serum levels of lactate: A potential biomarker of multiple sclerosis progression*. Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology, 2017. **44**(1): p. 52-61.
384. Yool, D., et al., *Phenotypic analysis of mice deficient in the major myelin protein MOBP, and evidence for a novel Mobp isoform*. Glia, 2002. **39**(3): p. 256-267.
385. Carmody, R.J., et al., *Genomic scale profiling of autoimmune inflammation in the central nervous system: the nervous response to inflammation*. Journal of neuroimmunology, 2002. **133**(1-2): p. 95-107.
386. Husson, I., et al., *Melatoninergic neuroprotection of the murine periventricular white matter against neonatal excitotoxic challenge*. Annals of Neurology: Official Journal of the American Neurological Association and the Child Neurology Society, 2002. **51**(1): p. 82-92.
387. Kilic, E., et al., *Prophylactic use of melatonin protects against focal cerebral ischemia in mice: role of endothelin converting enzyme-1*. Journal of pineal research, 2004. **37**(4): p. 247-251.
388. Leon, J., et al., *Melatonin and mitochondrial function*. Life sciences, 2004. **75**(7): p. 765-790.
389. Tan, D.X., et al., *Melatonin as a naturally occurring co-substrate of quinone reductase-2, the putative MT3 melatonin membrane receptor: hypothesis and significance*. Journal of pineal research, 2007. **43**(4): p. 317-320.
390. Welin, A.-K., et al., *Melatonin reduces inflammation and cell death in white matter in the mid-gestation fetal sheep following umbilical cord occlusion*. Pediatric research, 2007. **61**(2): p. 153.
391. Gressens, P., et al., *Agomelatine, a melatonin receptor agonist with 5-HT_{2C} receptor antagonist properties, protects the developing murine white matter against excitotoxicity*. European journal of pharmacology, 2008. **588**(1): p. 58-63.
392. Parikh, S., et al., *A modern approach to the treatment of mitochondrial disease*. Current treatment options in neurology, 2009. **11**(6): p. 414.
393. Kumar Jha, M., S. Jeon, and K. Suk, *Pyruvate dehydrogenase kinases in the nervous system: their principal functions in neuronal-glial metabolic interaction and neuro-metabolic disorders*. Current neuropharmacology, 2012. **10**(4): p. 393-403.
394. Sharman, E.H., et al., *Effects of melatonin and age on gene expression in mouse CNS using microarray analysis*. Neurochemistry international, 2007. **50**(2): p. 336-344.

395. Muse, E.D., et al., *Parameters related to lipid metabolism as markers of myelination in mouse brain*. Journal of neurochemistry, 2001. **76**(1): p. 77-86.
396. Björkhem, I. and S. Meaney, *Brain cholesterol: long secret life behind a barrier*. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology, 2004. **24**(5): p. 806-815.
397. Hagenfeldt, L., I. Bollgren, and N. Venizelos, *N-acetylaspartic aciduria due to aspartoacylase deficiency—a new aetiology of childhood leukodystrophy*. Journal of inherited metabolic disease, 1987. **10**(2): p. 135-141.
398. Burri, R., C. Steffen, and N. Herschkowitz, *N-acetyl-L-aspartate is a major source of acetyl groups for lipid synthesis during rat brain development*. Developmental neuroscience, 1991. **13**(6): p. 403-411.
399. Inglese, M., et al., *Indirect evidence for early widespread gray matter involvement in relapsing–remitting multiple sclerosis*. Neuroimage, 2004. **21**(4): p. 1825-1829.
400. Fu, L., et al., *Imaging axonal damage of normal-appearing white matter in multiple sclerosis*. Brain: a journal of neurology, 1998. **121**(1): p. 103-113.
401. Signoretti, S., et al., *N-Acetylaspartate reduction as a measure of injury severity and mitochondrial dysfunction following diffuse traumatic brain injury*. Journal of neurotrauma, 2001. **18**(10): p. 977-991.
402. Narayanan, S., et al., *Axonal metabolic recovery in multiple sclerosis patients treated with interferon β -1b*. Journal of neurology, 2001. **248**(11): p. 979-986.
403. Mostert, J.P., et al., *Fluoxetine increases cerebral white matter NAA/Cr ratio in patients with multiple sclerosis*. Neuroscience letters, 2006. **402**(1-2): p. 22-24.
404. Khan, O., et al., *Axonal metabolic recovery and potential neuroprotective effect of glatiramer acetate in relapsing-remitting multiple sclerosis*. Multiple Sclerosis Journal, 2005. **11**(6): p. 646-651.
405. Hamdi, A., *Melatonin administration increases the affinity of D2 dopamine receptors in the rat striatum*. Life sciences, 1998. **63**(23): p. 2115-2120.
406. Neeb, L., et al., *Methyprednisolone iv alters levels of CGRP and melatonin in cluster headache patients*. The journal of headache and pain, 2013. **14**(S1): p. P63.
407. Hauschka, P.V., J.B. Lian, and P.M. Gallop, *Direct identification of the calcium-binding amino acid, gamma-carboxyglutamate, in mineralized tissue*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1975. **72**(10): p. 3925-3929.
408. Turgut, M., et al., *Changes in vascularity of cartilage endplate of degenerated intervertebral discs in response to melatonin administration in rats*. Neurosurgical review, 2003. **26**(2): p. 133-138.
409. Ghareghani, M., et al., *Melatonin therapy reduces the risk of osteoporosis and normalizes bone formation in multiple sclerosis*. Fundamental & clinical pharmacology, 2018. **32**(2): p. 181-187.
410. Ghareghani, M., et al., *Spasticity treatment ameliorates the efficacy of melatonin therapy in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) mouse model of multiple sclerosis*. Cellular and molecular neurobiology, 2018. **38**(5): p. 1145-1151.