HAL
open science

# Evaluation des effets thérapeutiques de neuropeptides contre la sclérose en plaques : les orexines, le vasoactive intestinal peptide, le pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide et leurs analogues

Laurine Becquet

## To cite this version:

Laurine Becquet. Evaluation des effets thérapeutiques de neuropeptides contre la sclérose en plaques : les orexines, le vasoactive intestinal peptide, le pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide et leurs analogues. Médecine humaine et pathologie. Normandie Université, 2018. Français. NNT : 2018NORMR071 . tel-03058914

**HAL Id: tel-03058914**

**https://theses.hal.science/tel-03058914**

Submitted on 12 Dec 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.

Normandie Université

# THÈSE

## Pour obtenir le diplôme de doctorat

**Spécialité SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE**

**Préparée au sein de l'Université de Rouen Normandie**

Effets thérapeutiques de neuropeptides dans des modèles murins de la sclérose en plaques : les orexines, le *vasoactive intestinal peptide* (VIP), le *pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide* (PACAP) et leurs analogues


**Présentée et soutenue par**
**Laurine BECQUET**


| Thèse soutenue publiquement le 11 décembre 2018 devant le jury composé de | | |
|---|---|---|
| Mme Isabelle DUBUS | PR - Université de Rouen Normandie | Présidente |
| Mme Nathalie DAVOUST | MCF - ENS, Lyon | Rapporteur |
| Mme Cécile DELARASSE | CR - ICM, Paris | Rapporteur |
| M. Alain COUVINEAU | DR – Université Paris Diderot | Examinateur |
| M. Olivier BOYER | PUPH - Université de Rouen Normandie | Codirecteur de thèse |
| M. Yossan-Var TAN | MCF - Université de Rouen Normandie | Directeur de thèse |


**Thèse dirigée par Dr. Yossan-Var TAN et Pr. Olivier BOYER,**
**laboratoire UMR INSERM U1234 PANTHER, Université de Rouen Normandie**


UNIVERSITÉ DE ROUEN NORMANDIE · RÉGION NORMANDIE · EdNBISE Ecole doctorale Normande Biologie Intégrative, Santé, Environnement · UNION EUROPÉENNE · Inserm La science pour la santé From science to health

## Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier mon directeur de thèse, le Dr. Yossan-Var TAN, pour sa confiance, sa patience et son temps qu'il m'a accordé tout au long de mon master et de ma thèse.

Je ne remercierais jamais assez le Pr. Olivier Boyer, directeur de l'Unité Inserm U1234 et co-directeur de ma thèse, pour son aide et ses conseils depuis ma 3ème année de licence qui m'ont permis d'effectuer un stage aux Etats-Unis puis de réaliser mes premières armes dans son laboratoire.

J'adresse mes plus sincères remerciements à Catalina Abad pour ses conseils, nos heures passées en manip', son soutien moral et sa grande disponibilité.

Je souhaite aussi fortement remercier Léa, Marie et Mélanie pour tout ce temps passé au laboratoire à partager le même bureau mais aussi pour nos moments à l'extérieur. En plus de ce que cette thèse m'aura apporté professionnellement, elle m'aura aussi permis de gagner trois amies.

A elles s'ajoute tous les membres du laboratoire, Audrey, Baptiste, Catherine, Laëtitia, Marie-Laure, Maud et tous les autres pour leur aide, leur soutien, nos discussions et nos échanges. Une mention spéciale pour Chantal Barou qui permet de faciliter au quotidien l'aventure qu'est la thèse.

Je remercie également l'équipe de recherche dirigée par le Pr. Fabrice Jardin du centre Henri Becquerel (Philippe, Vinciane, Ahmad) pour l'opportunité qu'elle m'a offerte d'apporter au laboratoire la technique de RT-MLPA et pour le temps qu'elle m'a accordé.

Au terme de ce parcours, je remercie enfin celles et ceux qui me sont chers et que j'ai quelque peu délaissé ces derniers mois pour achever cette thèse. Leurs attentions et encouragements m'ont accompagnée tout au long de ces années. Je suis redevable à Pierre-Julien, pour son soutien moral, son oreille compatissante et son aide au quotidien. Je remercie aussi ma famille pour leur patience et leur écoute dans les bons et les mauvais moments.

Je souhaite terminer en remerciant les membres de mon jury pour avoir accepté de faire partie de cette fin d'aventure.

Projet cofinancé par l'Union Européenne et la Région Normandie. L'Europe s'engage en Normandie avec le Fonds Européen de Développement Régional (FEDER).

## Table des matières

**REMERCIEMENTS** ..... **1**
**TABLE DES MATIERES** ..... **2**
**LISTE DES ABREVIATIONS** ..... **4**
**LISTE DES FIGURES** ..... **7**
**LISTE DES TABLEAUX** ..... **8**
**RESUME** ..... **9**
**SUMMARY** ..... **11**
**I. INTRODUCTION** ..... **13**
**Chapitre 1. Le système nerveux central : immuno-privilège et immuno-surveillance** ..... **14**
A. Les cellules du SNC ..... 14
B. L'immuno-privilège ..... 15
C. L'immuno-surveillance ..... 17
**Chapitre 2. La sclérose en plaques** ..... **20**
A. Les formes cliniques et les symptômes ..... 21
B. L'épidémiologie de la SEP ..... 25
C. Les facteurs de risque ..... 25
D. Les mécanismes impliqués au cours de la SEP et de l'EAE ..... 27
E. Les traitements actuels ..... 34
F. Les modèles expérimentaux et les mécanismes associés ..... 38
**Chapitre 3. Le Vasoactive intestinal peptide (VIP) et le Pituitary adenylate cyclase-activated polypeptide (PACAP)** ..... **44**
A. Les récepteurs ..... 45
B. Les voies de signalisation ..... 46
C. La distribution tissulaire ..... 48
D. Les fonctions physiologiques ..... 50
E. Les Analogues ..... 65
**Chapitre 4. Les orexines** ..... **67**
A. Les récepteurs ..... 69
B. La distribution ..... 69
C. Les voies de signalisation ..... 70
D. Les fonctions physiologiques ..... 70
E. Les analogues ..... 75
**II. OBJECTIF** ..... **76**
**III. METHODES** ..... **78**
**IV. RESULTATS** ..... **81**

**Chapitre 1. Les effets thérapeutiques d'un analogue du récepteur VPAC2 ..... 82**
**Chapitre 2. L'implication du neuropeptide de l'orexine A dans l'EAE ..... 116**
**V. DISCUSSION ET PERSPECTIVES ..... 160**
**Chapitre 1. Discussion et perspectives des deux articles présentés ..... 161**
A. L'étude de l'agoniste de VPAC2 ..... 161
B. L'étude de l'orexine A ..... 165
**Chapitre 2. Discussion générale ..... 169**
A. Limites des modèles expérimentaux ..... 169
B. Limites de l'utilisation de molécules peptidiques comme traitement ..... 171
C. Perspectives générales ..... 172
**VI. CONCLUSION ..... 173**
**VII. REFERENCES ..... 175**

## Liste des abréviations

**A**

**AC** Adénylate Cyclase

**AMPc** Adénosine MonoPhosphate cyclique

**ARF** *ADP-Ribosylation Factor*

**AVC** Accident Vasculaire Cérébrale

**B**

**BHE** Barrière Hémato-Encéphalique

**BDNF** *Brain-Derived Neurotrophic Factor*

**BPC** Barrière du Plexus Choroïde

**C**

**CD** *Cluster of differentiation*

**CFA** *Complete Freund's Adjuvant* ou adjuvant complet de Freund

**CMH** Complexe Majeur d'Histocompatibilité

**CPA** Cellule Présentatrice d'Antigène

**CPZ** CuPriZone

**CREB** *cAMP Response Element-Binding protein*

**CTLA-4** *Cytotoxic T-Lymphocyte Associated Protein-4*

**D**

**DAG** DiAcylGlycéride

**E**

**EAE** Encéphalomyélite Autoimmune Expérimentale

**EBV** *Epstein-Barr's Virus* ou virus d'Epstein-Barr

**ERK** *Extracellular signal-Regulated Kinase*

**G-H**

**GRF** *GH-Releasing Factor*

**HLA** Human Leukocyte Antigen

**I**

**ICAM-1** *InterCellular Adhesion Molecule-1*

**icv.** intracérébroventriculaire

**IFN-γ** InTerFéron-γ

**IL** InterLeukine

**IP3** Inositol triPhosphate

**i.p.** intrapéritonéale

**IRF-1** *IFN-γ Regulating Factor-1*

**K**

**KO** *Knock-Out*

**L**

**LCR** Liquide Céphalo-Rachidien

**LPS** LipoPolySaccharide

**M**

**MCAO** *Middle Cerebral Artery Occlusion* ou occlusion de l'artère cérébrale moyenne

**MCP** M*onocyte Chemoattractant Protein*

**MBP** *Myelin Basic Protein*

**MMP** *Matrix MetalloProteinase*

**MOG** *Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein*

**MIP** M*acrophage Inflammatory Protein*

**MPTP** 1-Méthyl-4-Phényl-1,2,3,6-TétrahydroPyridine

**O**

**OX1R** O*reXin 1 Receptor* ou récepteur de l'orexine 1

**OX2R** *OreXin 2 Receptor* ou récepteur de l'orexine 2

**P**

**PACAP** *Pituitary Adenylate Cyclase-Activated Polypeptide*

**PBMC** *Peripheral Blood Mononuclear Cell* ou cellule mononuclée du sang périphérique

**PC** Plexus Choroïde

**PI** PhosphatidylInositol

**PI3K** *PhosphatidylInositol-3-Kinase*

**PKC** *Protein Kinase C*

**PKA** P*rotein Kinase A*

**PLC** *PhosphoLipase C*

**PLD** P*hosphoLipase D*

**PLP** Protéine ProtéoLipide

**R**

**RANTES** *Regulated on Activation, Normal T Cell Expressed and Secreted*

**RCPG** Récepteur Couplé à une Protéine G

**S**

**s.c.** sous-cutané

**SEP** Sclérose En Plaques

**RR** Récurrente-Rémittente

**PS** Progressive Secondaire

**PP** Progressive Primaire

**SI** Système Immunitaire

**SNC** Système Nerveux Central

**T**

**TCR** *T cell receptor*

**TGF-β** *Transforming Growth Factor-β*

**Th** lymphocyte T *helper*

**TLR** *Toll-Like Receptor*

**TNBS** *2,4,6-TriNitroBenzeneSulfonic acid*

**TNF-α** *Tumor Necrosis Factor-α*

**TMEV** *Theiler's Murine Encephalomyelitis Virus* ou virus encéphalomyélite murin de Theiler

**TP** Toxine Pertussique

**Treg** lymphocyte T régulateur

**V**

**VCAM-1** *Vascular Cell Adhesion Molecule-1*

**VIP** *Vasoactive Intestinal Peptide*

## Liste des figures

Figure 1 : Les différentes barrières du SNC ..... 16
Figure 2 : Immuno-surveillance au sein du SNC : focus sur les lymphocytes T..... 20
Figure 3 : Les différentes formes de la SEP en fonction du temps et du handicap ..... 22
Figure 4 : Les grandes étapes du développement de l'EAE après une immunisation contre le MOG.. 30
Figure 5 : Les mécanismes cellulaires induisant la démyélinisation et la mort neuronale..... 33
Figure 6 : Les mécanismes cellulaires de la remyélinisation durant l'inflammation chronique ..... 34
Figure 7 : Représentation de la gravité de la maladie en fonction de l'inflammation, de la neurodégénérescence, du handicap et de la réponse au traitement..... 38
Figure 8 : L'origine et la séquence en acides nucléiques de VIP et PACAP. ..... 45
Figure 9 : Les récepteurs et voies de signalisation de VIP et PACAP ..... 47
Figure 10 : Profils d'expression des récepteurs de VIP et PACAP sur les cellules immunitaires ..... 49
Figure 11 : La modulation de la réponse immunitaire par VIP et PACAP ..... 59
Figure 12 : Les séquences peptidiques et récepteurs des orexines A et B..... 68
Figure 13 : Les voies de signalisation des récepteurs OX1R et OX2R ..... 71
Figure 14 : Schéma récapitulatif des effets potentiels de l'agoniste de VPAC2 au cours de l'EAE chronique ..... 90
Figure 15 : Schéma récapitulatif des effets de l'orexine A au cours de l'EAE chronique..... 94
Figure 16 : Comparaison des zones de démyélinisation au cours de la SEP et de l'EAE ..... 96

## Liste des tableaux

Tableau 1 : Récapitulatif des traitements actuels de la SEP ..... 37
Tableau 2 : Modèles d'EAE chez différentes espèces : signes cliniques et caractéristiques ..... 40
Tableau 3 : La distribution des récepteurs VPAC1, VPAC2 et PAC1 ..... 50
Tableau 4 : Tableau récapitulatif des effets de VIP et PACAP dans le SNC ..... 54
Tableau 5 : Les analogues des récepteurs de VIP et PACAP ..... 66
Tableau 6 : Les analogues des récepteurs des orexines A et B ..... 75

## Résumé

La sclérose en plaques (SEP) est une maladie autoimmune inflammatoire et neurodégénérative du système nerveux central (SNC) chez le jeune adulte résultant d'une altération ciblée de la myéline. Les premiers symptômes de la SEP sont une détérioration cognitive, des vertiges, des douleurs, de la fatigue et une perte de la vision. En condition physiologique, les axones des neurones sont entourés par une gaine de myéline synthétisée par les oligodendrocytes permettant d'accélérer la vitesse de conduction des influx nerveux et de prévenir la mort neuronale. Le modèle expérimental le plus utilisé dans l'étude des mécanismes de la SEP est le modèle de l'encéphalomyélite autoimmune expérimentale (EAE). Après une immunisation contre la glycoprotéine oligodendrocytaire de la myéline 35-55 ($MOG_{35-55}$), les lymphocytes T *Cluster of differentiation* (CD)$4^+$ *helper* (Th)1 et Th17 auto-réactifs induisent une réponse inflammatoire aiguë à la périphérie puis migrent dans le SNC. Ils provoquent alors une réponse inflammatoire dirigée contre la myéline, avec l'intervention des cellules myéloïdes. Cela aboutit à la destruction des gaines de myéline diminuant la vitesse de conduction des influx nerveux et une perte axonale, responsables des symptômes mentionnés précédemment. A l'heure actuelle, les traitements contre la SEP peuvent ralentir la progression de la paralysie et diminuer la sévérité ainsi que l'incidence des symptômes diminuant l'inflammation. En revanche, ils n'ont pas d'effets sur les formes progressives de la maladie au cours desquelles les processus neurodégénératifs s'amplifient et dominent ceux de l'inflammation. Il est donc nécessaire de trouver de nouvelles thérapies qui pourront à la fois bloquer l'inflammation et promouvoir la remyélinisation et la neurorégénération.

Dans cette optique, de nouvelles cibles thérapeutiques ont émergé pour traiter la SEP : le *Vasoactive Intestinal Peptide* (VIP), le *Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide* (PACAP), l'orexine A, leurs récepteurs ainsi que leurs analogues. En effet, ces neuropeptides présentent des activités anti-inflammatoires et neuroprotectrices. Mes travaux de thèse ont porté sur l'étude des effets d'un agoniste de VPAC2, l'un des récepteurs de VIP et PACAP, et de l'orexine A sur les processus inflammatoires et neurodégénératifs dans le modèle d'EAE ainsi que dans le modèle toxique de la cuprizone (CPZ), induisant la mort des oligodendrocytes matures et la démyélinisation indépendamment des lymphocytes T.

Après une immunisation contre la $MOG_{35-55}$, un traitement systémique de court durée avec $BAY_{55-9837}$, un agoniste de VPAC2, diminue la sévérité de l'EAE chronique en

diminuant la réponse inflammatoire à la périphérie avec une baisse de l'activation lymphocytaire, de l'activité de présentation antigénique des cellules dendritiques et des monocytes ainsi qu'une modulation de la population des lymphocytes T régulateurs. Au niveau de la moelle épinière, l'infiltration des cellules immunitaires est moindre et la proportion en microglie/macrophages est plus élevée après traitement par l'agoniste de VPAC2. De plus, $BAY_{55\text{-}9837}$ diminue les processus de démyélinisation et favorise ceux de remyélinisation dans le modèle de la CPZ.

En parallèle, l'administration intrapéritonéale à court terme de l'orexine A diminue drastiquement la sévérité de l'EAE chronique. Le traitement ne présente pas d'effet sur la phase d'immunisation de l'EAE mais limite la phase effectrice avec une diminution de l'infiltration des lymphocytes T $CD4^+$, des médiateurs inflammatoires, de la démyélinisation, de l'astrogliose et de l'activation microgliale au niveau du SNC. Par contre, l'administration systémique de l'orexine A ne semble pas avoir d'effet sur les phases de démyélinisation et de remyélinisation au cours du modèle de la CPZ.

Des perspectives prometteuses sont donc ouvertes pour le développement de stratégies thérapeutiques efficaces utilisant des neuropeptides et leurs analogues contre la SEP ainsi que d'autres maladies inflammatoires et/ou neurodégénératives.

Mots-clés : agoniste de VPAC2, cuprizone, encéphalomyélite autoimmune expérimentale, orexine A, sclérose en plaques, neuropeptides

## Summary


**Therapeutic effects of VIP, PACAP, orexins and their analogs in experimental models of multiple sclerosis**

Multiple sclerosis (MS) is a chronic autoimmune and neurodegenerative disease of the central nervous system (CNS). First MS symptoms are cognitive deterioration, dizziness, pain, fatigue and loss of vision. In physiological condition, the axons of neurons are surrounded by a myelin sheath synthesized by oligodendrocytes to accelerate the conduction velocity of nerve impulses and to prevent neuronal death. The most widely used experimental model of MS is the EAE model. After immunization against $MOG_{35-55}$, self-reactive Th1 and Th17 cells induce an acute inflammatory response at the periphery and then migrate into the SNC. Then they induce an inflammatory response against myelin, with the intervention of myeloid cells. This results in the destruction of myelin sheaths decreasing the rate of conduction of nerve impulses and axonal loss, responsible for the aforementioned symptoms. Currently, MS treatments can slow the progression of paralysis and decrease the severity and the incidence of symptoms by targeting immune responses. However, these treatments have no effect on the progressive forms of the disease when the neurodegenerative processes amplify and dominate the inflammatory component. It is therefore necessary to find effective therapies that can both block inflammation and also promote remyelination and neuroregeneration.

In this context, new therapeutic targets have emerged to treat MS: VIP, PACAP, orexin A, their receptors and their analogs. These neuropeptides have several effects such as anti-inflammatory and neuroprotective activities. My thesis works were focused on the effect of a VPAC2 receptor agonist, one of the three receptors of VIP and PACAP, and orexin A in inflammatory and neurodegenerative processes during $MOG_{35-55}$-induced EAE model and toxic model using CPZ, which induces mature oligodendrocyte death and demyelination without the influence of lymphocytes.

A short term and systemic treatment of $BAY_{55-9837}$, a VPAC2 agonist, decreases chronic EAE severity with less activation of T lymphocytes and antigen presentation activities of dendritic cells and monocytes as well as Treg population modulation at the periphery. In the CNS, immune cell infiltration is reduced in VPAC2-treated mice compared to PBS-treated mice with an higher microglia/macrophage proportion. Moreover, VPAC2 agonist decreases

demyelination processes and enhances remyelination during cuprizone model.

In parallel, short term and intraperitoneal administration of orexin A decreases drastically the severity of chronic EAE. Orexin A treatment has no effect on immunization phase of EAE but limits effective phase with a lower infiltration of $CD4^+$ T lymphocytes, inflammatory mediators, demyelination, astrogliosis and microglial activation in the CNS. In contrast, systemic administration of orexin A seems to have no effect during demyelination and remyelination phases in CPZ model.

Promising perspectives are therefore foreseen for the development of therapeutic strategies using neuropeptides or their analogues against MS or other inflammatory and/or neurodegenerative diseases.

Key words: cuprizone, experimental autoimmune encephalomyelitis, orexin A, multiple sclerosis, neuropeptides, VPAC2 agonist

# I. Introduction

## Introduction

## Chapitre 1. Le système nerveux central : immuno-privilège et immuno-surveillance

Ce chapitre est orienté sur les cellules ainsi que les mécanismes liés au système immunitaire (SI) dans le système nerveux central (SNC) en conditions physiologiques.

### A. Les cellules du SNC

Dans ce paragraphe, seront décrits les astrocytes, la microglie, les oligodendrocytes présents dans le SNC en condition physiologique.

Les astrocytes sont des cellules dynamiques ayant la capacité de communiquer avec les neurones ou d'autres cellules gliales (Kıray *et al.*, 2016; Williams *et al.*, 2007). Ils peuvent également interagir avec les nœuds de Ranvier et la barrière hémato-encéphalique (BHE). Ils jouent un rôle dans la transmission du signal et modulent les synapses neuronales. Les astrocytes sont reliés les uns aux autres *via* des jonctions communicantes de type *gap* et aux oligodendrocytes par des jonctions *gap* hétérotypiques. Ils sécrètent également des cytokines et chimiokines pour moduler la migration, la prolifération, la maturation et les fonctions des oligodendrocytes. Ils apportent aussi de l'énergie et du cholestérol aux neurones et régulent la réactivité astrocytaire (Kıray *et al.*, 2016; Williams *et al.*, 2007).

La microglie regroupe les macrophages résidant dans le SNC (Kipnis *et al.,* 2017 ; (Schwartz and Deczkowska, 2016)). Elle possède la capacité de phagocyter les débris cellulaires (Takahashi et al., 2005). Elle participe également au développement des circuits neuronaux, à la maintenance des synapses, à la neurogénèse et favorise l'apprentissage et la mémoire (Paolicelli *et al.,* 2011). Elle teste en permanence son environnement pour détecter tous les changements de milieu (pH, purines, cytokines, chimiokines, acides aminés ou encore composants non organiques). Au repos, la microglie présente un phénotype anti-inflammatoire avec une signature *transforming growth factor-β* (TGF-β) (Butovsky *et al.,* 2014). Son activation transitoire est essentielle pour l'élimination des pathogènes ou autre danger. La morphologie cellulaire de la microglie est dépendante de son état d'activation. Les cellules microgliales au repos ont un petit soma en forme de tige ou amiboïde avec de longues et nombreuses ramifications. Une fois activées, elles deviennent plus grosses avec un faible nombre de courtes ramifications (Fernández-Arjona *et al.,* 2017).

En plus de la microglie, le SNC est constitué d'autres macrophages qui présentent différentes fonctions selon leurs localisations (Kipnis *et al.,* 2017).

Les macrophages périvasculaires sont localisés dans les espaces situés entre les vaisseaux sanguins et les pieds des astrocytes (Lapenna *et al.*, 2018). De la même façon que la microglie, ils échantillonnent leur environnement et communiquent avec les cellules avoisinantes [macrophages des plexus choroïdes (PC) et des méninges]. Ils préservent l'intégrité des cellules endothéliales et de la BHE, favorisent la stabilité des capillaires sanguins et régulent la constriction vasculaire (Lapenna *et al.,* 2018).

Les macrophages du PC sont localisés et véhiculés par le liquide céphalo-rachidien (LCR). Ils permettent d'éduquer les cellules présentes vers un phénotype anti-inflammatoire pour favoriser la réparation tissulaire en cas de dommages (Shechter *et al.,* 2013).

Enfin, les macrophages des méninges sont localisés dans les méninges subdurales, leur permettant ainsi de surveiller le LCR et les vaisseaux sanguins présents dans les méninges. Ils sont sensibles à l'homéostasie de leur environnement et agissent comme des sentinelles en cas d'infections ou de dommages tissulaires. De plus, ils peuvent adapter leur phénotype (pro- ou anti-inflammatoire) en fonction de la réponse immunitaire à adopter (Kigerl *et al.,* 2009).

Enfin, les oligodendrocytes sont des cellules gliales du SNC dont la principale fonction est de former la gaine de myéline autour des axones des neurones (Simons and Nave, 2015). Le processus de myélinisation est réalisé en plusieurs étapes :

- Prolifération et migration des oligodendrocytes précurseurs dans la substance blanche ;
- Reconnaissance des axones « cibles » et mise en place de la signalisation axone-glie ;
- Différenciation des oligodendrocytes précurseurs en oligodendrocytes myélinisants ;
- Excroissance de la membrane et enveloppement de l'axone par la membrane ;
- Trafic des composants présents dans la membrane ;
- Compactage de la membrane ;
- Formation de nœuds de Ranvier.

Les oligodendrocytes présentent un rôle de support métabolique pour la fonction axonale. De plus, la gaine de myéline synthétisée par les oligodendrocytes permet d'accélérer la vitesse de conduction des influx nerveux le long des axones et de prévenir la mort neuronale (Simons and Nave, 2015).

## B. L'immuno-privilège

Le SNC est un organe dit immuno-privilégié. Dans des conditions physiologiques, il est protégé des réponses immunitaires par 3 barrières physiques (Herz *et al.*, 2017; Kipnis, 2016, Figure 1).

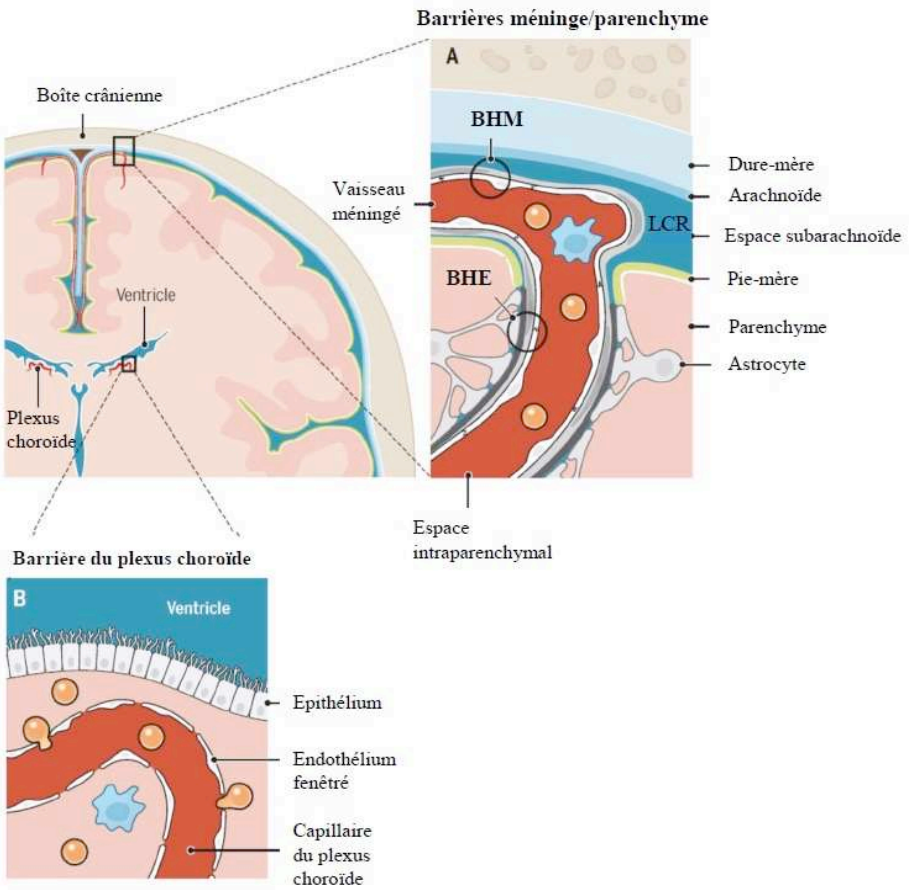



**Figure 1 : Les différentes barrières du SNC**, d'après Kipnis, 2016
BHE : barrière hémato-encéphalique ; BHM : barrière hémato-méningée ; LCR : liquide céphalo-rachidien

### 1) La barrière hémato-encéphalique (BHE)

La BHE ne permet aucun échange cellulaire entre le SI et le SNC en conditions physiologiques à cause de sa structure particulière. En revanche, elle permet le transport de molécules telles que les cytokines. Elle est constituée d'une couche de cellules endothéliales situées entre le parenchyme et les vaisseaux sanguins (elle est imperméable grâce à des jonctions serrées le long de la *lamina propria*) et d'une couche de prolongements d'astrocytes appelée *glia limitans* (Abbott *et al.,* 2010). Cette barrière produit des facteurs inhibiteurs de la réponse immunitaire comme l'IL-25 (Sonobe *et al.,* 2016).

### 2) La barrière hémato-méningée

Les méninges représentent une barrière immunologique active entourant le cerveau et la moelle épinière. Les méninges sont composées de la dure-mère, l'arachnoïde et la pie-mère. Entre ces deux dernières, se trouve l'espace subarachnoïdien contenant le LCR (Louveau *et*

*al.,* 2015). Au repos, des cellules myéloïdes et des lymphocytes T *Cluster of differentiation* (CD)$4^+$ sont retrouvés dans cet espace (Radjavi *et al.,* 2014).

### 3) La barrière du plexus choroïde (BPC)

Contrairement à la BHE, la BPC est considérée comme ayant un rôle essentiel dans la communication neuro-immunitaire bidirectionnelle (Schwartz and Deczkowska, 2016). Elle longe les quatre ventricules du cerveau et est en interface entre le sang et le LCR. Elle est constituée de villosités très vascularisées avec des parois endothéliales fenestrées et entourées d'une monocouche de cellules épithéliales interconnectées par des jonctions serrées. Le PC produit les deux tiers du LCR en remplissant les ventricules et les espaces subarachnoïdiens. La BPC a pour fonction de contrôler le trafic des cellules immunitaires dans le SNC *via* le LCR (Shechter *et al.,* 2013). De plus, elle agit comme une passerelle sélective grâce aux cellules épithéliales qui expriment de façon constitutive des chimiokines [molécules impliquées dans le chimiotactisme et le trafic cellulaire comme la *vascular cell adhesion molecule-1* (VCAM-1)] nécessaires à la transmigration des cellules (passage du sang au LCR) (Engelhardt *et al.,* 2001). L'expression de ces molécules est dépendante des signaux immunologiques provenant du cerveau mais aussi des cellules immunitaires résidentes de la BPC comme les macrophages, les cellules dendritiques et les lymphocytes T.

## C. L'immuno-surveillance

Récemment, un travail révolutionnaire a décrit un système de drainage non classique (Louveau *et al.*, 2015). Le long des sinus duraux, des vaisseaux lymphatiques permettent une circulation lymphatique au niveau des méninges. Par l'expression de molécules caractéristiques des cellules endothéliales, ces vaisseaux sont capables de transporter le LCR contenant notamment des cellules immunitaires et sont connectés aux ganglions lymphatiques cervicaux profonds (Louveau *et al.*, 2015). Les lymphocytes T permettent une immuno-surveillance au sein du LCR. En conditions physiologiques, environ 150 000 lymphocytes T effecteurs circulent dans le LCR du cerveau humain où ils patrouillent à la recherche d'antigènes spécifiques (Engelhardt and Ransohoff, 2005).

Pour une réponse inflammatoire optimale, les lymphocytes T*helper* (Th) se différencient en plusieurs sous-types selon l'environnement cytokinique et possiblement selon la force de l'interaction du *T cell receptor* (TCR) avec l'antigène (Zhou et al., 2009) :

- la polarisation en lymphocytes Th1 a lieu en présence d'interleukine (IL)-12, qui est produite par les macrophages ou encore les cellules dendritiques, et l'interféron (IFN)-γ, qui est produit par les lymphocytes T et les cellules NK (Lighvani *et al.*, 2001). Les Th1 sont impliqués dans la réponse immunitaire contre des micro-organismes intracellulaires, produisent de l'IFN-γ et sont sous le contrôle du facteur de transcription T-bet ;
- l'association du TGF -β avec l'IL-6 permet la polarisation en Th17. Les cytokines IL-21 et IL-23 permettent le maintien de ce phénotype. Les Th17 sont impliqués dans l'auto-immunité et dans la résolution d'une infection par des bactéries extracellulaires et des champignons. Ils produisent de l'IL-17A, de l'IL-17F, de l'IL-21 et de l'IL-22 sous la dépendance du facteur de transcription RORγT ;
- la différenciation en Th2 est permise grâce à l'IL-4 présent dans l'environnement. Les Th2 sont impliqués dans l'immunité humorale, le développement d'allergie et la protection contre les pathogènes intracellulaires en relation avec l'immunité innée. Ils produisent de l'IL-4, de l'IL-5 et de l'IL-13 sous le contrôle du facteur de transcription GATA3.

En plus des lymphocytes T conventionnels, le SI adaptatif possède une population de lymphocytes T régulateurs (Treg). Ces lymphocytes régulent les réponses immunitaires à la périphérie et sont impliqués dans la régulation des lymphocytes T auto-réactifs (Sakaguchi *et al.*, 2007). Parmi les Treg, on distingue :

- les Treg dits naturels qui sont des lymphocytes auto-réactifs ayant échappés à la sélection négative dans le thymus ;
- les Treg induits qui proviennent de la différenciation des lymphocytes T conventionnels en Treg à la périphérie à la suite d'une réponse immunitaire pour contrôler cette dernière.

Pour rappel, les lymphocytes subissent la sélection négative dans le thymus (Starr *et al.,* 2003). Cette dernière est un processus durant lequel les lymphocytes meurent par apoptose lorsqu'ils possèdent un TCR reconnaissant avec une forte affinité un antigène du soi (ou autoantigène) présenté par un complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) des cellules

épithéliales thymiques issues de la médulla et des cellules dendritiques. La sélection négative fait donc partie des mécanismes de tolérance vis-à-vis du soi.

Des lymphocytes Th1, Th2 et Treg sont retrouvés au niveau du PC dans une proportion plus importante que dans le sang. En revanche, la population Th17 n'y est pas observable (Kunis *et al.,* 2013). En présence de leur antigène spécifique dans le SNC, les lymphocytes Th1 et Th2 du PC, spécifiques pour cet antigène rencontré à la périphérie, interagissent avec les cellules présentatrices d'antigène (CPA) puis sont restimulés pour sécréter des cytokines telles que respectivement l'IFN-γ et l'IL-4 (Baruch *et al.,* 2013).
L'activité d'immuno-surveillance par les lymphocytes se divise en 3 fonctions (Ellwardt *et al.,* 2016 et Figure 2) :

- en cas d'infections opportunistes (herpès, toxoplasmose, virus JC), les lymphocytes T $CD4^+$ et $CD8^+$ interagissent et stimulent la microglie. Les lymphocytes $CD4^+$ produisent des cytokines telles que l'IFN-γ, l'IL-2, le *tumor necrosis factor-α* (TNF-α) pour moduler la réponse immunitaire. Les lymphocytes $CD8^+$ produisent de la perforine et de la granzyme B. Cette réponse immunitaire aide à la clairance du pathogène ;
- en cas de pathologie neurodégénératrice (comme les maladies d'Alzheimer, de Parkinson) ou d'un traumatisme, les lymphocytes Th2 produisent des facteurs neurotrophiques comme le BDNF et des cytokines anti-inflammatoires comme l'IL-4 et l'IL-10. Ils induisent aussi la croissance neuronale *via* l'IL-4 ;
- afin d'éviter des réactions autoimmunes, les lymphocytes Treg inhibent l'inflammation (inhibition de l'activité effectrice des Th1 et Th17) par la sécrétion de cytokines anti-inflammatoires (IL-10 et TGF-β), par la production d'adénosine monophosphate cyclique (AMPc) *via* CD39 ou encore par les mécanismes contact-dépendant faisant intervenir la protéine associée aux lymphocytes T cytotoxiques (*Cytotoxic T-Lymphocyte Associated Protein 4* ou CTLA-4) et le TGF-β.

Enfin, en absence de reconnaissance antigénique, les lymphocytes retournent à la périphérie par les vaisseaux lymphatiques.

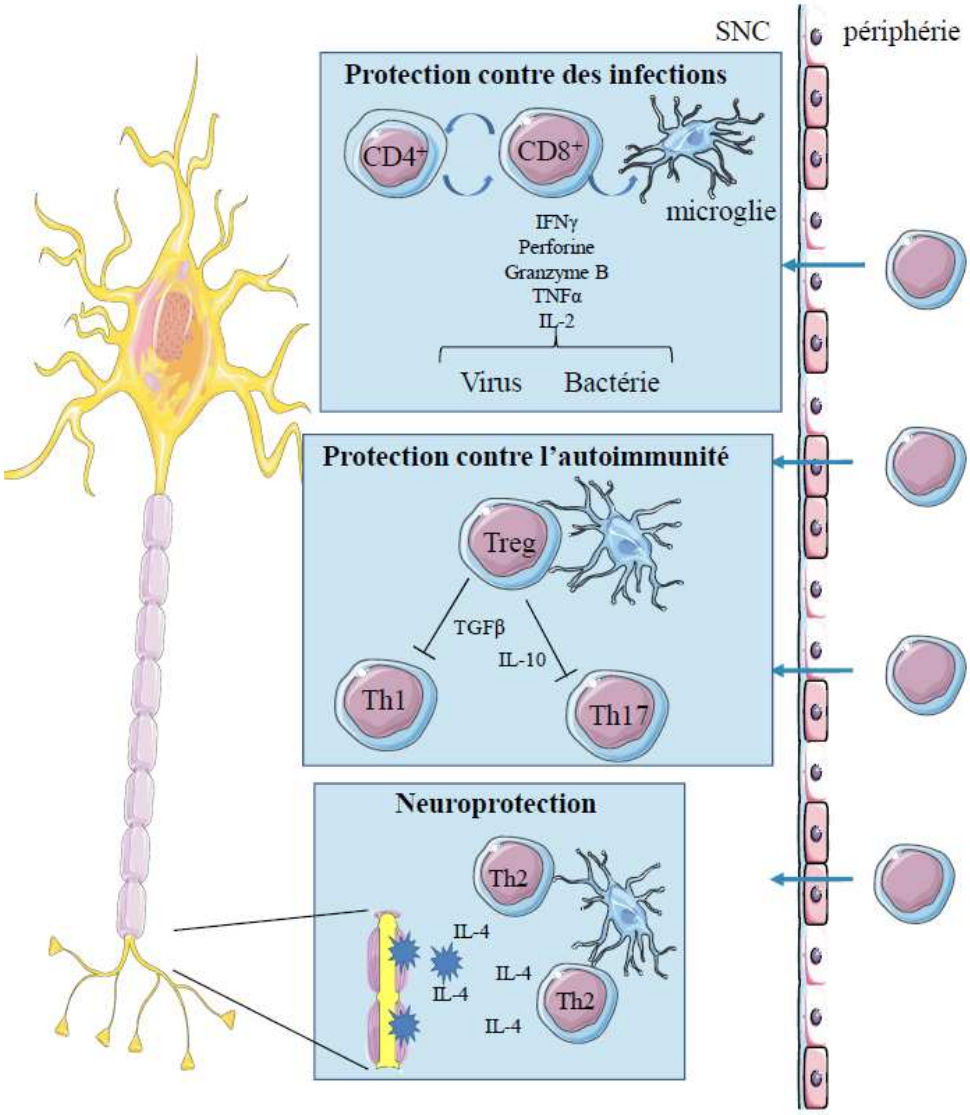



**Figure 2 : Immuno-surveillance au sein du SNC : focus sur les lymphocytes T**, d'après Ellwardt *et al.,* 2016
L'immuno-surveillance dans le SNC permet de protéger contre les infections de pathogènes opportunistes ainsi que l'auto-immunité et favorise la neuroprotection.

## Chapitre 2. La sclérose en plaques

La sclérose en plaques (SEP) est une maladie autoimmune inflammatoire et neurodégénérative du SNC diagnostiquée généralement chez le jeune adulte (entre 20 et 40 ans) (Compston and Coles, 2002; (Thompson et al., 2018). Dans le SNC, les neurones peuvent à la fois recevoir et envoyer des messages nerveux (courant électrique faible) provenant de ou allant vers la périphérie (hors du SNC). Les messages nerveux sont véhiculés grâce aux axones et dendrites (prolongements de la cellule). Pour permettre un influx nerveux rapide et optimal, les axones sont entourés par la gaine de myéline produite par les

prolongements des oligodendrocytes. Cette gaine de myéline permet aussi de conserver l'intégrité des neurones et de les protéger contre la mort neuronale. Chez un individu atteint de SEP, les lymphocytes Th $CD4^+$ auto-réactifs dirigés contre la myéline (Th1 et Th17) provoquent une réponse inflammatoire aigüe. L'inflammation et les processus neurodégénératifs deviennent chroniques. La destruction des gaines de myéline induit la mort neuronale, la démyélinisation et la formation de lésions, appelées plaques.

Le premier cas recensé, selon un journal intime, semble être celui d'Auguste d'Esté, cousin de la reine Victoria en 1822 alors qu'il était âgé de 28 ans. Le diagnostic posé fut une « paraplégie active ou passive, fonctionnelle ou biologique » (Landtblom *et al.*, 2010). Aujourd'hui, les symptômes (difficultés de reconnaissance spatiale, douleurs, fatigues, problèmes de vision et d'équilibre, paralysie…) et l'évolution de la maladie ne laissent aucun doute sur le diagnostic. Mais le nom « Sclérose en plaques » a été utilisé pour la première fois en 1868 par Jean-Marie Charcot, neurologue français.

## A. Les formes cliniques et les symptômes

Le diagnostic de la SEP est établi grâce aux critère de McDonald révisés en 2017 (Thompson et al., 2018). Ce diagnostic nécessite l'association de plusieurs critères cliniques et para-cliniques de dissémination temporelle et spatiale des lésions du SNC en dehors d'une autre maladie évolutive. L'établissement du diagnostic est permis grâce à un examen clinique, à l'imagerie résonnance magnétique et à la détection de bandes oligoclonales spécifiques d'IgG sur gel à partir du LCR (Thompson *et al.* 2018).

Il existe deux types de SEP : la forme récurrente-rémittente et la forme progressive (Compston and Coles, 2002 ; Lublin *et al.*, 2014). La forme récurrente/rémittente (RR) est la forme la plus répandue avec plus de 80 % des patients atteints (Figure 3) présentant une alternance de périodes de poussées et de rémissions complètes durant lesquelles le patient ne présente aucun symptôme neurologique en dehors des périodes de poussées (apparitions de symptômes durant au moins 24 heures) (Compston and Coles, 2002 ; Lublin *et al.*, 2014). Les patients atteints d'une forme progressive présentent des périodes de rémissions incomplètes. Elle est divisée en deux sous-types :

- 10 à 60% des patients atteints d'une forme RR vont développer une forme progressive secondaire (PS) au cours du temps (Tremlett *et al.,* 2008; University of California, San Francisco MS-EPIC Team: et al., 2016). Au déclenchement de la maladie, le patient

présente une forme SEP RR. Au fil des années, la maladie évolue de façon continue : les périodes de poussées sont toujours présentes mais les rémissions deviennent incomplètes et les symptômes s'aggravent (Compston and Coles, 2002; Thompson *et al.,* 2018).

- la SEP progressive primaire (SEP PP) est une forme évoluant en continu dès le déclenchement de la maladie avec une augmentation constante de la gravité des symptômes sans périodes de rémission ou avec des rémissions incomplètes (Compston and Coles, 2002 ; Thompson *et al.,* 2018). Cette forme représente 10 à 15% des patients atteints de SEP (Miller and Leary, 2007).

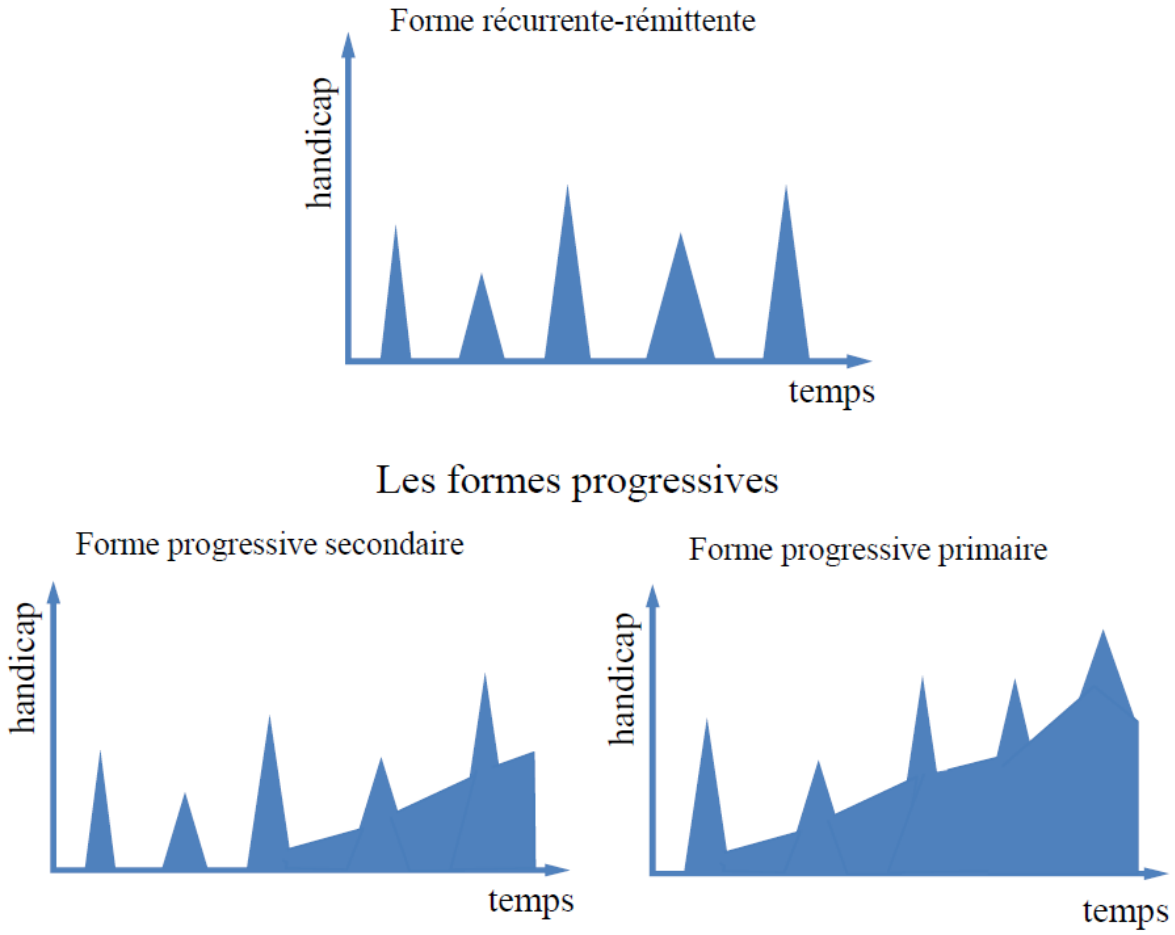



**Figure 3 : Les différentes formes de la SEP en fonction du temps et du handicap**
La SEP peut se présenter sous 4 formes schématisées dans cette figure.
a) La forme récurrente-rémittente se présente avec une alternance des périodes de poussées et de rémissions complètes.
b) La forme progressive secondaire est caractérisée par une forme récurrente-rémittente au début puis une aggravation des poussées et des rémissions devenant incomplètes.
c) La forme progressive primaire est définie par une aggravation continue des poussées sans rémission complète entre chaque poussée.

Au cours de la phase progressive de la maladie, les processus de démyélinisation s'amplifient au niveau du SNC tels que la mort par apoptose des oligodendrocytes, la dégénération axonale ou encore la perte des neurones corticaux qui entraîne des régressions neurologiques irréversibles (Compston and Coles, 2002; Lublin *et al.*, 2014).

Les symptômes associés aux épisodes de rechute sont divers et dépendent de la localisation de l'atteinte au niveau du SNC (Gelfand, 2014). Des symptômes peuvent être ressentis sans être significativement corrélés avec la SEP comme des troubles de l'équilibre, de la dépression, de la fatigue, de la sensibilité à la chaleur et/ou des maux de tête. Cependant, certains symptômes sont caractéristiques des périodes actives de la maladie comme la névrite optique, les symptômes du tronc cérébral et moteurs, les troubles sensoriels, la déficience cognitive et le dysfonctionnement du système gastro-urinaire, définis ci-dessous..

### 1) La névrite optique

D'un point de vue clinique, une névrite optique est provoquée par une inflammation du nerf optique induisant une baisse de l'acuité visuelle unilatérale pouvant aller jusqu'à une perte visuelle de plusieurs heures ou jours. Elle est d'intensité variable et est associée à des douleurs oculaires. La névrite optique est, dans environ 20% des cas, le premier signe clinique de SEP et 50% des patients présentent ce symptôme au moins une fois durant leur maladie.

### 2) Les symptômes du tronc cérébral

Les patients atteints de SEP peuvent présenter des symptômes en lien avec une atteinte du tronc cérébral. Ces symptômes touchent principalement le visage mais peuvent également impacter les mouvements corporels. En fonction des nerfs affectés, les symptômes sont multiples : une vision dédoublée, des ophtalmoplégies internucléaires (troubles de la motricité oculaire), des faiblesses faciales, de la myokymie (tremblements involontaires des paupières), des vertiges, des troubles de la déglutition, de l'élocution, des faiblesses de la langue et/ou des troubles sensoriels au niveau du visage. De façon moins commune, une perte de l'audition et des signes bulbaires sévères peuvent faire partie du spectre des symptômes. De plus, l'implication des réseaux cérébelleux connectés au tronc cérébral peut entraîner des dysfonctionnements au niveau des mouvements involontaires comme une ataxie unilatérale (perte de la coordination motrice), une dysmétrie (exagération de l'amplitude d'un mouvement) ou encore une dysdiadococinésie (difficulté à réaliser des mouvements rapides).

### 3) Les symptômes moteurs

D'un point de vue de l'activité motrice, jusqu'à 80% des patients disent ressentir une faiblesse musculaire dans les membres. En général, ces faiblesses proviennent du tractus corticospinal, responsable des mouvements volontaires. Elles sont souvent accompagnées d'hyper-réflexie (exagération des réflexes myotatiques ou des réflexes d'étirement), de spasticité (augmentation du tonus musculaire) pouvant aboutir à des spasmes, des crampes ou encore des faiblesses dans la marche.

### 4) Les troubles sensoriels

Les deux troubles sensoriels les plus souvent ressentis sont les engourdissements et la paresthésie (fourmillements, picotements, etc…). Ils doivent être ressentis pendant plusieurs heures voire plusieurs jours certainement dus à une lésion inflammatoire et démyélinisante aigüe. Ces troubles touchent plus de 85% des patients atteints de SEP. De plus, des douleurs ou d'autres sensations dites « déplaisantes » sont ressenties par 55% des patients. Par exemple, un tiers des patients présente un signe de Lhermitte (sensations de décharges électriques).

### 5) La déficience cognitive

La déficience cognitive est associée à une atteinte de la substance blanche mais aussi à une atrophie du cerveau et aux plaques corticales démyélinisées. Elle touche au moins 40% des patients. Il s'agit en général d'un ralentissement du traitement de l'information, de dysfonctionnements exécutifs et d'une détérioration de la mémoire verbale et visuelle à long terme.

### 6) Le dysfonctionnement du tractus gastro-urinaire

Les patients peuvent avoir une vessie dite hyperactive du fait de la perte de l'inhibition du réflexe de miction (effet d'éliminer l'urine de la vessie). Ainsi, certains patients ressentent des symptômes d'urgence urinaire et d'incontinence et augmentent leur fréquence de miction. Ce type de symptômes serait ressenti dans 25% des cas. De plus, les patients présentent de fréquents cas d'infections urinaires, signe du dysfonctionnement du système urinaire. Moins fréquemment, un dysfonctionnement des intestins peut être le signe d'une atteinte importante de la moelle épinière.

## B. L'épidémiologie de la SEP

Les nombres ci-dessous sont issus des sites arsep.org et msif.org (Browne *et al.*, 2014) qui actualisent régulièrement les informations chiffrées sur la SEP.

En France, entre 30 à 80 individus pour 100 000 personnes sont atteintes de SEP, alors que la moyenne mondiale est de 30 à 33 personnes pour 100 000 en 2013. Une inégalité entre les hémisphères Nord et Sud (Browne *et al.*, 2014) est observée. En effet, l'hémisphère Nord présente entre 20 et plus de 100 personnes atteintes de SEP pour 100 000 individus en 2013 alors que pour les pays présents au sud de l'équateur, la prévalence est de 0 à 20 personnes atteintes pour 100 000 individus. En 2018, 100 000 et 2,3 millions d'individus sont atteints de SEP, respectivement, en France et dans le Monde.

Selon le site arsep.org, actualisé en 2018, 3 patients atteints de SEP sur 4 sont des femmes en France et dans le Monde. L'âge moyen d'apparition de la maladie en France est de 29 ans et se situe entre 26 et 35 ans dans le Monde. Une étude française nommée SURVIMUS a démontré que, dans les 20 premières années de la maladie, les patients présentent le même taux de mortalité que la population générale. Néanmoins, la maladie réduirait à terme la durée de vie de 6 à 7 ans (Leray *et al.*, 2015).

## C. Les facteurs de risque

Aujourd'hui, l'étiologie de la maladie reste encore inconnue. La SEP est une maladie multifactorielle, c'est à dire impliquant à la fois des facteurs environnementaux et génétiques. En 2015, la méta-analyse de Balbasis *et al.* a mis en avant deux grands facteurs de risque : l'infection par le virus d'Epstein-Barr et le tabagisme, auxquels s'ajoutent le régime alimentaire ainsi que la position géographique du patient. La susceptibilité génétique s'additionne aux facteurs de risques environnementaux. Tous ces facteurs sont développés dans ce paragraphe (Ghasemi *et al.*, 2017; Leray *et al.*, 2016; Reich *et al.*, 2018).

### 1) Les facteurs environnementaux

#### (a) Les infections virales

La susceptibilité d'être atteint de SEP est augmentée en cas d'infections virales et dépend de l'âge à laquelle l'infection a eu lieu. L'exemple le plus connu est l'infection par le virus d'Epstein-Barr (EBV) induisant le développement d'une mononucléose infectieuse. En effet, l'agent pathogène peut produire des molécules ayant une structure proche des

composants de la myéline tels que la protéine protéolipide (PLP), la *myelin basic protein* (MBP) ou encore les glycoprotéines associées à la myéline comme par exemple la *myelin oligodendrocyte glycoprotein* (MOG). Cela induit un mimétisme moléculaire qui est responsable d'une réponse immunitaire. Les lymphocytes T seront donc dirigés à la fois contre les molécules de l'agent pathogène mais aussi contre les protéines du soi associées à la myéline aboutissant à la création de lésions. Le risque de développer la maladie est 15 fois plus important lorsque l'infection avec l'EBV est survenue pendant l'enfance et 30 fois plus important lorsque le patient a été infecté à partir de l'adolescence.

#### (b) Le tabagisme

Différentes méta-analyses ont démontré l'association entre l'apparition de la maladie et le tabagisme. En effet, la consommation de tabac induit la production d'oxyde nitrique et de monoxyde de carbone, deux éléments néfastes pour l'organisme. L'oxyde nitrique est un gaz soluble toxique et, à des concentrations pathologiques, induit la peroxydation des lipides endommageant les mitochondries des neurones et des oligodendrocytes. Le monoxyde de carbone induit le blocage de l'oxygénation des tissus, la dégradation du MBP, l'endommagement axonal et une réponse inflammatoire dirigée contre la myéline. La méta-analyse de Wingerchuk a démontré que le risque relatif de développer la SEP est d'environ 1,5 fois plus important pour les fumeurs que pour les non-fumeurs (Wingerchuk, 2012).

#### (c) La localisation géographique

La localisation géographique semble être corrélée de façon non significative au développement de la maladie principalement dû aux nombreux mouvements migratoires. Le développement de la SEP semble être associé à l'exposition au soleil et au taux de vitamine D sanguin. Cette dernière est produite à partir de l'exposition aux radiations ultra-violettes provenant de la lumière du soleil. La vitamine D et sa forme active, le calcitriol, ont un rôle dans la prolifération et la différenciation des cellules et dans la régulation de l'immunité par l'augmentation de la synthèse de la cytokine anti-inflammatoire IL-10 d'une part et la diminution de la production de cytokines pro-inflammatoires d'autre part. Ainsi, le manque de soleil et une déficience en vitamine D semblent induire un environnement inflammatoire propice au développement de la maladie.

### 2) Les facteurs génétiques

#### (a) La prédisposition familiale

De nombreuses études ont mis en lumière l'existence de familles à risque avec l'existence d'une corrélation significative entre l'apparition de la maladie et les liens de parenté. Par exemple, des études de liaison sur des jumeaux monozygotes ont montré une forte probabilité de co-ségrégation si l'un d'entre eux était atteint par la maladie avec un facteur de risque allant de 30 à 50 %. Ces données suggèrent très fortement une pénétrance de la maladie en lien avec des facteurs génétiques. *A contratio*, des jumeaux dizygotes ou un individu avec un parent du 1er degré atteint présentent un risque seulement plus élevé de 2 à 4% par rapport à la population générale, qui est de 0,1%. Ce risque diminue à mesure que le lien de parenté diminue.

#### (b) Les gènes en relation avec l'immunité

Les molécules du CMH de classe II sont présentes à la surface des CPA et elles permettent la reconnaissance antigénique par les lymphocytes T qui modulent la réponse immunitaire. Chez l'Homme, ce complexe se nomme *human leucocyte antigen* (HLA). La reconnaissance antigénique est déterminante dans la réponse immunitaire. Il n'est donc pas surprenant que certains HLA augmentent le risque de développer la maladie. Les gènes HLA sont des gènes de susceptibilité au développement de la maladie.

De la même façon, des gènes associés à la réponse immunitaire pro-inflammatoire tels que les gènes codant pour le récepteur de l'IL-17 et la sous-unité α du récepteur de l'IL-2 favorisent l'apparition de la maladie. En effet, des études d'association à partir de séquençage de génomes entiers démontrent que certains polymorphismes nucléotidiques constitutionnels sur ces gènes augmentent les risques de développer la SEP.

## D. Les mécanismes impliqués au cours de la SEP et de l'EAE

L'EAE est le modèle expérimental de la SEP le plus utilisé impliquant à la fois le SI et le SNC. Seuls les mécanismes cellulaires et moléculaires spécifiques de la SEP au sein de ces deux systèmes seront détaillés dans cette section.

### 1) Au niveau du SI

La SEP est une maladie autoimmune entrainée par l'activation des lymphocytes Th1 et Th17 encéphalogènes et auto-réactifs contre la myéline. Les 3 hypothèses à l'origine de l'activation inappropriée de ces lymphocytes sont :

- le mimétisme moléculaire induit par une exposition fréquente à des infections virales ;
- une sensibilité accrue du SI (c'est-à-dire un seuil d'activation plus bas) et/ou
- une perte de la tolérance périphérique avec un défaut dans la sélection négative induisant un échappement de lymphocytes reconnaissant la myéline ou encore un déséquilibre du ratio Treg/Th (Dendrou *et al.,* 2015).

#### (a) Chez l'Homme

Chez les patients atteints de SEP, les indices indiquant une réponse immunitaire inappropriée sont nombreux (Hohlfeld *et al.,* 2016; Macchi *et al.,* 2015). En effet, des lymphocytes T $CD8^+$ et $CD4^+$ sont retrouvés dans les lésions cérébrales de patients atteints de SEP avec une proportion en $CD8^+$ plus importante que celle en $CD4^+$. Le développement et l'activité de ces derniers sont dirigés par les gènes HLA de classe II. Des études ont déterminé ces gènes comme des gènes de susceptibilité au développement de la maladie.

D'autre part, une augmentation de la production en protéines associées à la matrice extracellulaire comme la *matrix metalloproteinase* (MMP)-9 et de facteurs neurotrophiques comme le *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF) est observée *in vitro* dans une culture de cellules mononucléées du sang périphérique (*peripheral blood mononuclear cells* ou PBMC) de patients au cours d'une rechute.

Les SEP PP et PS sont caractérisées par le développement d'une réponse périphérique de type Th1 avec l'expression du facteur de transcription T-bet. Cependant, les lymphocytes Th17 jouent aussi un rôle important de par la sécrétion d'IL-17 par les cellules $CD4^+CD127^{hi}$ des patients après une stimulation par des antigènes spécifiques de la myéline (Venken *et al.*, 2010). Dans le même sens, une diminution du rapport Treg/Th17 est observée dans le sang périphérique des patients avec une déficience fonctionnelle de ces Treg (Jamshidian *et al.*, 2013; Viglietta *et al.*, 2004). Cette déficience en Treg est la signature de l'auto-immunité. Enfin, issues des PBMC de patients atteint d'une SEP PP, les CPA présentent une activation préférentielle du *Toll-like receptor 3* (TLR3) (par un ARN double-brin, signe d'une infection virale) permettant l'activation de voies de signalisation conduisant à l'augmentation de l'expression génique de facteurs pro-inflammatoires [IFN-γ, TNF-α, IL-2, IL-12 et CXCL10].

### (b) Dans l'EAE

Pour déterminer les mécanismes impliqués dans la SEP, les études du SI adaptatif au cours de l'EAE se sont multipliées (Fletcher *et al.*, 2010).

Après une immunisation contre la $MOG_{35-55}$ chez des souris C57BL/6, les CPA présentent le peptide aux lymphocytes T naïfs (Figure 4). Grâce à l'environnement inflammatoire produit par l'immunisation, ces lymphocytes naïfs se différencient en lymphocytes Th1 et Th17 pro-inflammatoires auto-réactifs contre le peptide de la myéline. Cette polarisation provoque un déséquilibre dans la balance des lymphocytes T en défaveur des lymphocytes Th2 et des Treg. Ensuite, la perméabilisation de la BHE permet à ces lymphocytes auto-réactifs d'accéder au SNC (Fletcher *et al.,* 2010).

L'implication des lymphocytes Th pro-inflammatoires a été démontrée par l'utilisation de différents *knock-out* (KO) de gènes caractéristiques de la population étudiée. Dans un premier temps, seuls les lymphocytes Th1 semblaient être les lymphocytes pathogéniques majeurs de la SEP et de l'EAE. En effet, après une immunisation, des souris déficientes pour l'IL-12p40, nécessaire à la différenciation des Th1, ne développent pas la maladie (Fletcher *et al.,* 2010). Pourtant, l'absence d'IFN-γ (Ferber *et al.,* 1996) ou de STAT1 (Bettelli *et al.*, 2004) provoque une exacerbation de la gravité de l'EAE. Cette différence dans la réponse immunitaire peut être expliquée par le partage de la sous-unité p40 par l'IL-12 (spécifique des Th1) et l'IL-23 (nécessaire à l'induction et/ou à l'expansion des Th17). La déficience en IL-23p40 permet aux souris immunisées d'être résistantes à l'EAE démontrant donc dans un deuxième temps l'implication des Th17 dans la pathogénèse de l'EAE (Cua *et al.*, 2003).

Chacun de ces deux acteurs semblent avoir un rôle bien distinct. Une immunisation passive avec des lymphocytes Th1 sensibilisés à la MOG permet l'induction de l'EAE alors qu'un transfert de lymphocytes Th17 dans les mêmes conditions expérimentales n'aboutit pas au développement de la maladie (O'Connor *et al.*, 2008). Les lymphocytes Th1 sont nécessaires à la phase effectrice de la maladie et permettent le recrutement des lymphocytes Th17 (O'Connor *et al.*, 2008). En revanche, la gravité de la maladie est dépendante de l'implication des lymphocytes Th17. Le transfert de lymphocytes Th1 chez des souris KO pour l'IL-17 induit un développement de la maladie moins sévère que chez des souris sauvages.

En plus de ces lymphocytes pro-inflammatoires, les lymphocytes Treg modulent la réponse immunitaire au cours de l'EAE. Les lymphocytes T $CD4^{+}CD25^{+}$ suppriment *in vitro* l'activité des lymphocytes T effecteurs spécifiques de la MOG (diminution de la sécrétion

d'IFN-γ par les Th1). Le transfert de ces cellules, 3 jours après une immunisation active, provoque *in vivo* une diminution de la gravité de l'EAE chez les souris receveuses (Kohm *et al.*, 2002). De plus, des lymphocytes Treg issus de souris déficientes pour l'IL-10 (nécessaire à l'activité des lymphocytes Treg) n'ont plus cette activité suppressive au cours de l'EAE.

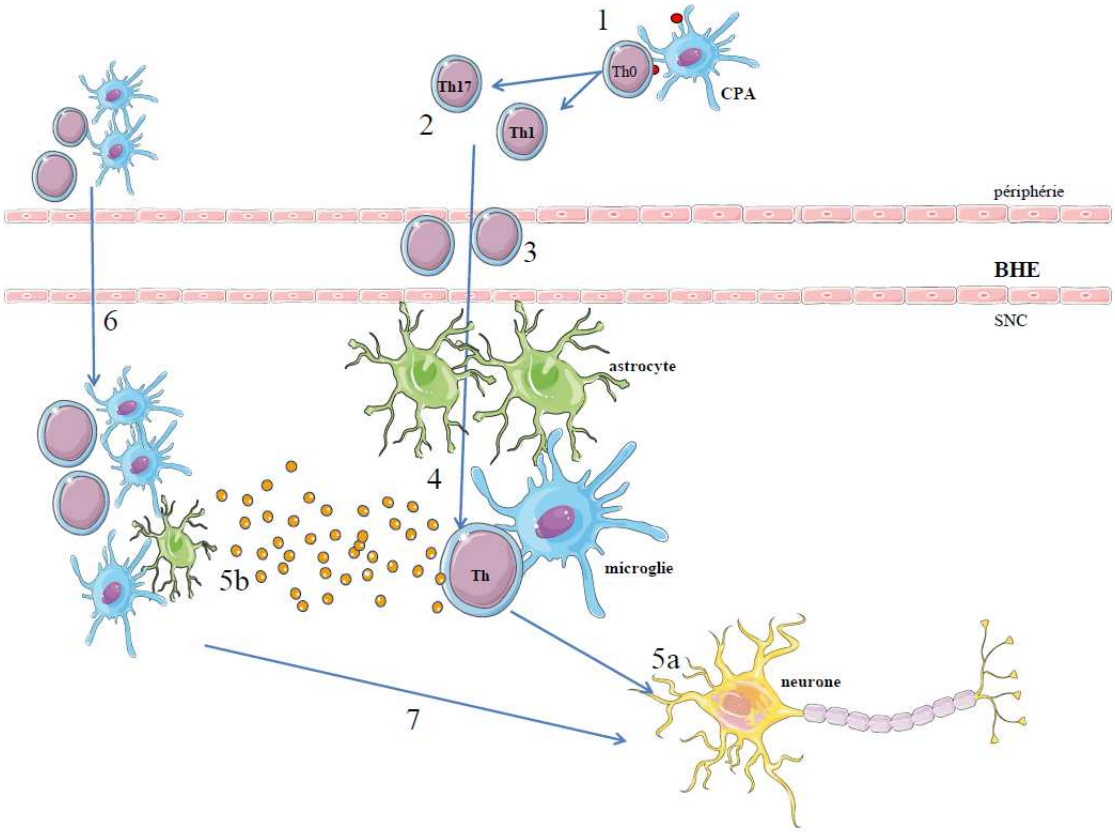



**Figure 4 : Les grandes étapes du développement de l'EAE après une immunisation contre la MOG**

Représentation schématique de la réponse immunitaire durant la pathogénèse de l'EAE.

1) A la suite de l'induction de l'EAE, les CPA présentent la MOG aux lymphocytes Th naïfs (Th0).

2) Ces derniers se différencient alors en lymphocytes auto-réactifs et encéphalogènes Th1 et Th17, caractéristiques de l'immunité associée à l'EAE.

3) Puis ils cellules migrent et atteignent le SNC. Cette migration est facilitée grâce aux astrocytes présents dans le SNC.

4) Dès leur entrée, ces lymphocytes spécifiques de la MOG sont réactivés par les CPA. Cette réactivation entraine leur prolifération et la sécrétion de nombreuses cytokines et chimiokines pro-inflammatoires.

5) Cela aboutit à une robuste amplification de la réponse autoimmune contre la myéline endogène (5a) et provoque une démyélinisation, une neurodégénescence ainsi qu'une activation des cellules myéloïdes, propre à la pathogénie de l'EAE (5b).

6) Cela favorise le recrutement et l'activation de lymphocytes Th1/Th17 ainsi que de macrophages.

7) Leur recrutement et leur activation peuvent alimenter la réponse immunitaire contre la myéline.

BHE : barrière hémato-encéphalique ; CPA : cellule présentatrice d'antigène ; Th0 : Lymphocytes T*helper* précurseur ; SNC : système nerveux central

### 2) Au niveau du SNC

Les mécanismes explicités précédemment sont impliqués en cas d'inflammation ponctuelle, en réponse à une infection ou à un dommage tissulaire. Si l'inflammation devient chronique même après l'élimination de l'élément déclencheur de la réponse immunitaire, cela peut engendrer ou augmenter des lésions tissulaires voire aboutir au déclenchement d'une pathologie. Il a été admis que, dans de nombreuses pathologies du SNC, la neuroinflammation est un facteur commun et aggravant de ces maladies (Aktas *et al.*, 2010; Hemmer *et al.*, 2003).

Au cours de l'initiation de la SEP ou de l'EAE, les astrocytes expriment à leur surface la molécule VCAM-1, le récepteur de l'intégrine α4. Cette dernière est exprimée par les lymphocytes T effecteurs. Les astrocytes produisent aussi des MMP-7, -9 et -12, enzymes pouvant modifier la matrice extracellulaire localement. En même temps, les cellules gliales produisent des chimiokines comme le *monocyte chemoattractant protein-1* (MCP-1/CCL2) dont le récepteur CCR2 est exprimé par les lymphocytes T. L'implication des astrocytes, des chimiokines et des MMPs permettent aux lymphocytes Th1 et Th17 auto-réactifs dirigés contre la myéline de sortir de la lumière des vaisseaux sanguins, d'intégrer les espaces périvasculaires et les méninges afin d'atteindre le SNC en traversant la *glia limitans.* Ces lymphocytes sont de nouveau activés par les cellules résidantes du SNC ou infiltrantes telles que la microglie ou les cellules dendritiques (Greter et al., 2005); Fletcher *et al.,* 2010 ; Dendrou *et al.,* 2015) aboutissant à leur réactivation et leur expansion. Ils produisent alors localement des signaux de danger et des cytokines (TNF-α, IFN-γ et IL-1β). En conséquence, la microglie et les cellules myéloïdes répondent à cette réponse inflammatoire aboutissant à son amplification et à une tempête cytokinique pro-inflammatoire (production de cytokines : TNF-α, IFN-γ, IL-1β, IL-23 et IL-12 et de chimiokines : CCL2, CCL20, CXCL19 et CXCL10). Cette tempête permet le recrutement d'autres cellules immunitaires (lymphocytes T et B, macrophages...) de la périphérie vers le site d'inflammation.

Les anticorps produits par les lymphocytes B à la périphérie et traversant la BHE ou produits par les lymphocytes B du SNC et le système du complément formant d'un complexe anticorps-complément attaquant la membrane des oligodendrocytes (Hemmer *et al.*, 2003 ; Figure 7). La microglie et les macrophages sont activés par les lymphocytes T $CD4^+$. Ils attaquent la gaine de myéline par leur capacité phagocytaire, leur production de cytokines et leur sécrétion de médiateurs toxiques comme l'acide nitrique (Hemmer *et al.*, 2003). De plus, par leur capacité effectrice, les lymphocytes T $CD4^+$ sécrètent des médiateurs inflammatoires

(cytokines, chimiokines et MMPs) pour amplifier la réponse inflammatoire aboutissant à la destruction de la gaine de myéline. Les lymphocytes T $CD8^+$, quant à eux, sont capables d'attaquer directement l'axone et les oligodendrocytes par la sécrétion de perforine et de granzyme B. L'ensemble des signaux toxiques et l'interaction axone-oligodendrocyte endommagée conduit à la mort des oligodendrocytes. La démyélinisation va progressivement mettre à découvert l'axone induisant une dépolarisation (Hemmer *et al.*, 2003). Cette dernière et la perturbation de la balance ionique induit également l'augmentation de l'activité des canaux calciques et donc de l'influx calcique conduisant au dysfonctionnement axonal. Les pertes de l'activité de signalisation et du support trophique peuvent contribuer à la dégénération axonale des neurones connectés et à la mort neuronale. Les cellules myéloïdes et les lymphocytes T auto-réactifs contre la myéline jouent donc un rôle majeur dans la formation des lésions de la substance blanche du cerveau. La progression de la pathologie serait alors due à une activation inappropriée et chronique du SI et non à un dysfonctionnement des processus neurodégénératifs du SNC (Aktas e*t al.*, 2010).

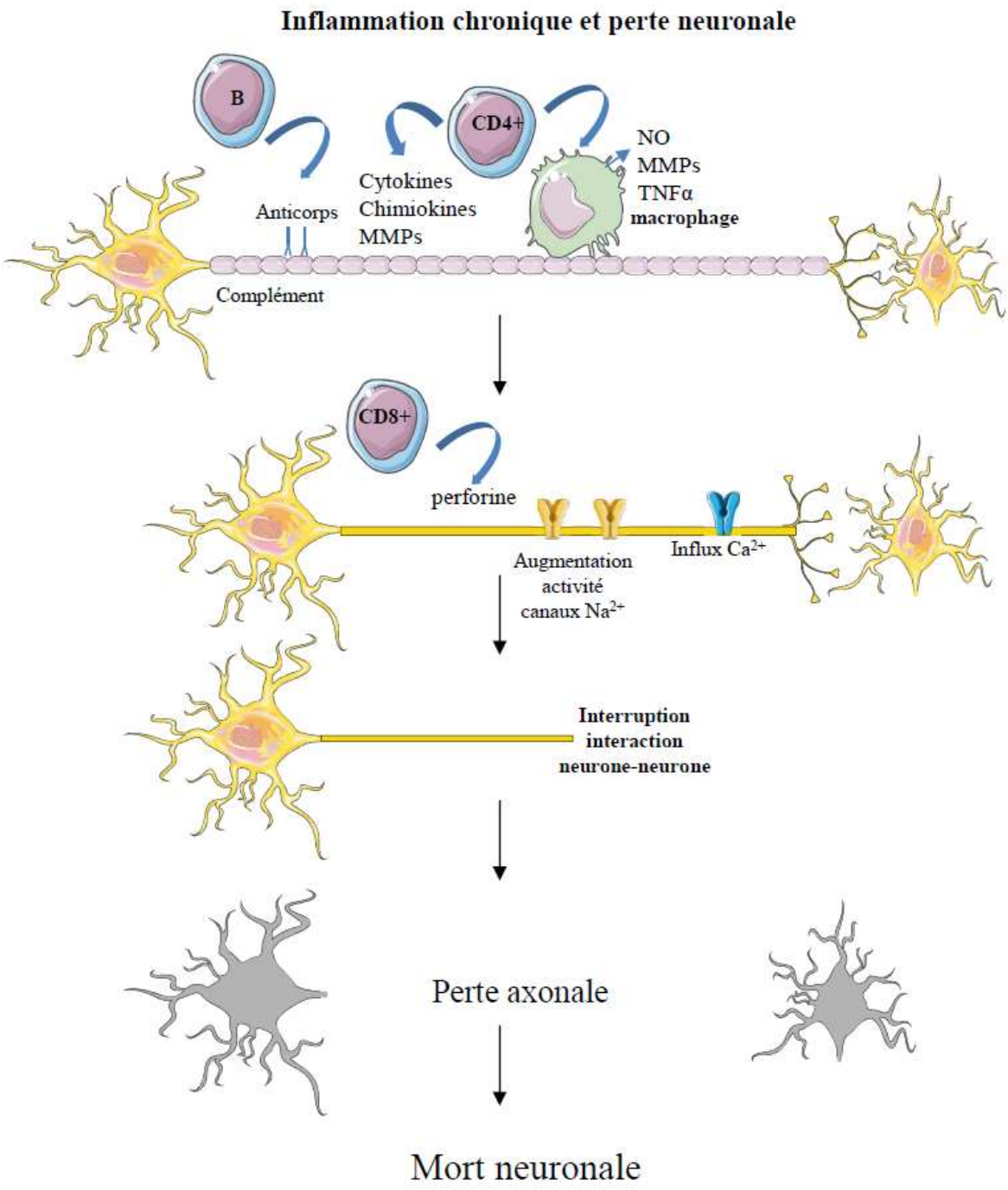



**Figure 5 : Les mécanismes cellulaires induisant la démyélinisation et la mort neuronale** d'après Hemmer *et al.,* 2003

Il existe également des processus de neurorégénération pour compenser les mécanismes de démyélinisation induite (Aktas *et al.*, 2010; Figure 6). Les astrocytes agissent sur les précurseurs des oligodendrocytes en favorisant leur migration, leur prolifération et leur survie. Ils permettent également la différenciation et la maturation des oligodendrocytes permettant la remyélinisation des axones. De plus, les cellules myéloïdes interviennent dans

l'établissement d'une rémission temporaire. Majoritaires au sein des lésions, elles favorisent la phagocytose des débris de la myéline (inhibiteurs de la croissance), sécrètent des médiateurs neuroprotecteurs et permettent la remyélinisation (Aktas *et al.*, 2010).

La stimulation chronique du SI contre la myéline et l'amplification de la neurodégénérescence submergent finalement les processus de remyélinisation conduisant au développement d'une forme progressive (Aktas *et al.*, 2010).

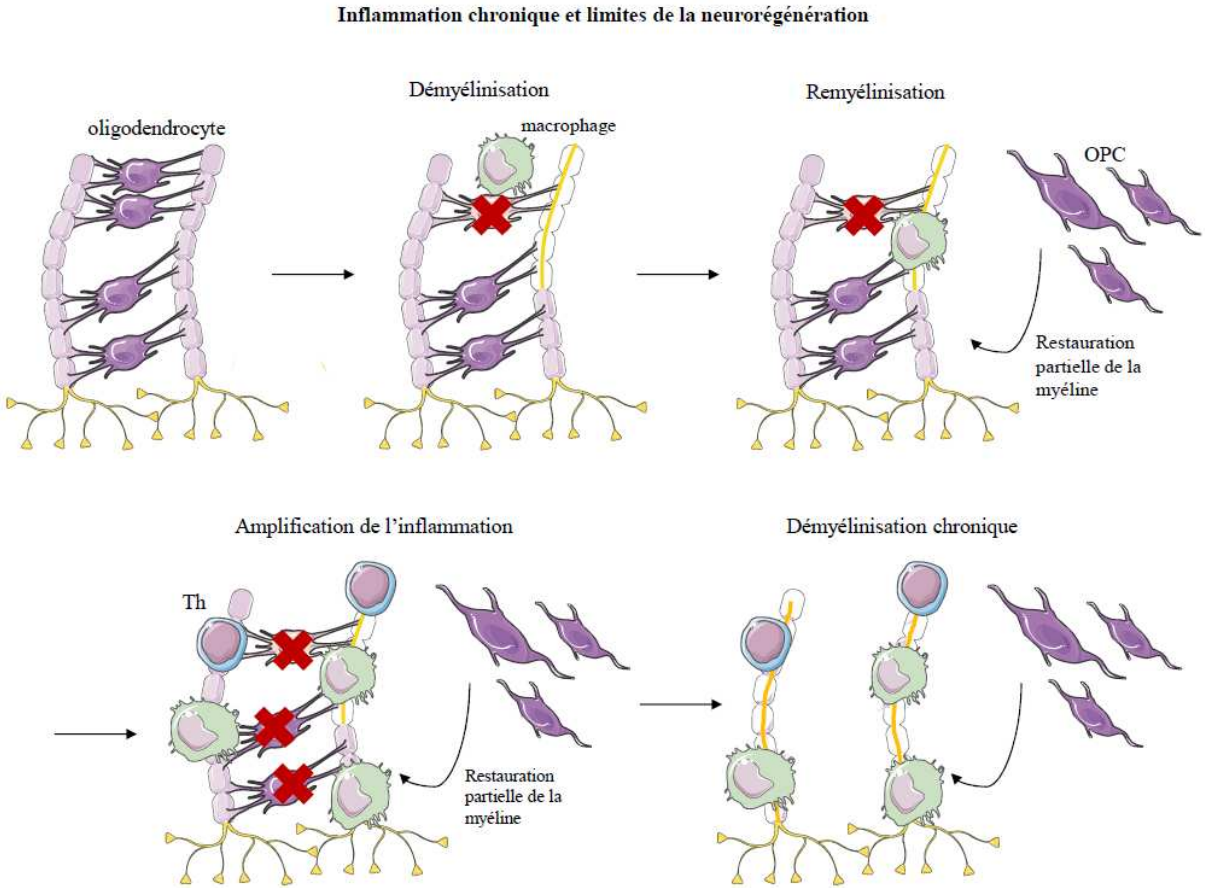



**Figure 6 : Les mécanismes cellulaires de la remyélinisation durant l'inflammation chronique**
d'après Aktas *et al.,* 2010
OPC : *oligodendrocyte precursor cell* ; Th : lymphocyte T*helper*

## E. Les traitements actuels

Actuellement, différents traitements sont disponibles pour les patients atteints de SEP en fonction de la forme de la maladie. Ils ont été développés à partir des découvertes issues des modèles expérimentaux. Voici un résumé des traitements mis sur le marché aux Etats-Unis et dans l'Union européenne (Dargahi *et al.*, 2017).

La thérapie initiale contre la SEP corrèle avec l'agressivité et le développement de la maladie (Tableau 1).

Les molécules utilisées en première ligne de traitement pour les patients atteints d'une SEP moyennement active (correspondant en général à la forme RR) sont :

- l'interféron β1 qui modifie la balance de cytokines pro- et anti-inflammatoires et diminue la proportion en lymphocytes Th17. Il peut être utilisé en cas de SEP PS ;
- l'acétate de glatiramère qui bloque le CMH agissant comme un leurre et permettant de dévier la différenciation des lymphocytes T pro-inflammatoires en lymphocytes T anti-inflammatoires ;
- le teriflunomide qui inhibe la déshydrogénase dihydroorotate (enzyme permettant la synthèse *de novo* des pyrimidines indispensables à l'ADN) et l'action des lymphocytes B et T (principalement sur les lymphocytes Th1) ;
- le diméthylfumarate qui permet de diminuer le stress oxydatif et l'inflammation.

Ces traitements de première ligne présentent des effets secondaires tels que des maux de tête, des douleurs aux sites d'injection ou encore des douleurs intestinales. De plus, leur efficacité tend à diminuer lorsque la maladie évolue les rendant ainsi inefficaces pour des stades avancés.

En cas de SEP agressive et progressive ou après l'échec des traitements de première ligne, les traitements utilisés en deuxième ligne sont :

- le fingolimod qui est un antagoniste du récepteur de la sphingosine-1-phosphate permettant d'inhiber l'infiltration des lymphocytes dans les ganglions lymphatiques et dans le SNC. Les effets secondaires majeurs sont l'apparition d'une bradyarythmie, (c'est-à-dire une diminution transitoire de la fréquence cardiaque) et le développement d'infections opportunistes ;
- l'alemtuzumab qui est dirigé contre la molécule de surface CD52 permettant la déplétion des lymphocytes T (principalement Th1) et B. Les effets secondaires majeurs sont des infections des voies respiratoires et hépatiques, le développement de la maladie de Basedow (autoimmunité au niveau de la thyroïde) et du purpura thrombocytopénique idiopathique ;
- le daclizumab qui permet de bloquer la molécule de surface IL-2R (récepteur pour l'IL-2), indispensable au développement des lymphocytes T. Ce traitement aboutit à une diminution des lymphocytes T et une augmentation de la population NK. Les effets secondaires majeurs sont des infections des voies respiratoires supérieures et des troubles hépatiques ;

- le natalizumab qui se fixe sur la chaine α4 de l'intégrine α4β1, présente à la surface des lymphocytes T. Il affecte la migration cellulaire des lymphocytes au travers de la BHE mais aussi leur prolifération, leur croissance et leur survie cellulaire. Les effets secondaires majeurs sont des infections des voies urinaires et respiratoires inférieurs et le développement de leucoencéphalopathie multifocale progressive (LMP) (conséquence de l'infection par le virus JC au niveau du SNC) ;
- la mitoxantrone qui inhibe la prolifération des lymphocytes T (principalement les Th1) et B mais aussi des macrophages. Il est utilisé en cas d'intolérance au natalizumab. Les effets secondaires majeurs sont le développement d'une insuffisance cardiaque et des infections ;
- l'ocrelizumab qui se fixe sur le CD20 et qui induit la déplétion des lymphocytes B par les processus de cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps et celle dépendante du complément. Les effets secondaires sont des difficultés respiratoires et des infections.

| substance active | 1ère AMM | formes de la SEP | ligne de traitement | mode d'action | effets indésirables |
|---|---|---|---|---|---|
| Interféron β1a | 1996 (FDA) 1997 (AEM) | RR | 1ère | modification balance cytokines pro- et anti-inflammatoires, diminution Th17 | maux de tête, symptômes de la grippe, inflammation et douleurs au site d'injection |
| Interféron β1b | 1993 2000 | RR, PS | 1ère | | maux de tête, symptômes de la grippe, inflammation et douleurs au site d'injection, faible taux de globules blancs |
| Acétate de glatiramère | 1996 2004 | RR | 1ère | blocage pMHC | réaction au niveau du site d'injection |
| Teriflunomide | 2012 2013 | RR | 1ère | inhibition déshydrogénase dihydroorotate et lymphocytes B et T (surtout Th1) | effets gastrointestinaux indésirables (nausées, diarrhées), anomalies d'enzyme du foie, maux de tête |
| Diméthylfumarate | 2013 2014 | RR | 1ère | anti-inflammatoire et anti-stress oxidatif | rougeurs, problèmes intestinaux |
| Fingolimod | 2010 2011 | RR | 2ème (sauf USA 1ère) | antagoniste du récepteur S1P, diminution lymphocytes T et B | maux de tête, grippe, diarrhée, taux élevé d'enzymes hépatiques, sinusites, douleurs, bradyarythmie, infections, PML |
| Mitoxantrone | 2000 1985 | RR, SP, PS | 2ème et 3ème | suppression lymphocytes T et B et macrophages, réduction cytokines type Th1 | nausées, perte de cheveux, infection des voies respiratoires supérieures, du système urinaire, changements menstruels, plaies buccales, insuffisance cardiaque, diarrhées, constipation, douleurs du dos, sinusites, maux de tête, urine bleue-verte |
| Alemtuzumab | 2014 2013 | RR | 2ème et 3ème | anticorps monoclonal humanisé contre le CD52, déplétion lymphocytes T et B, augmentation Treg et Th2 | fièvre, maux de tête, malaises, poussées d'urticaire, infections des voies respiratoires et urinaires, infections hépatiques, autoimmunité de la thyroïde (maladie de Grave), purpura thrombocytopénique idiopathique |
| Daclizumab | 2016 2016 | RR | 2ème | anticorps monoclonale humanisé du sous-type IgG1 blocage IL-2R, diminution lymphocytes T, augmentation NK | infection des voies respiratoires supérieures, grippe, bronchite, eczéma, dépression, taux d'enzymes hépatiques élevé |
| Natalizumab | 2006 2006 | RR | 2ème | anticorps monoclonal humanisé recombinant de la chaine α4 de l'intégrine α4β1, diminution migration cellulaire, division, croissance et survie | PML, maux de tête, fatigue, douleurs musculaires, douleur de poitrine, infection des voies urinaires, des voies respiratoires inférieures, gastroentérite, vaginite, dépression… |
| Ocrelizumab | 2017 2018 | RR, PP | 2ème | anticorps monoclonal humanisé anti CD20, déplétion B par CDC et CCDA | démangeaisons, éruption, difficultés respiratoires, infections |

**Tableau 1 : Récapitulatif des traitements actuels de la SEP**

Ce tableau résume pour chaque substance active la première autorisation de mise sur le marché (1ère AMM), la forme de la SEP traitée, la ligne de traitement ainsi que leur mode d'action. Les deux dates de la colonne correspondant à la 1ère autorisation de mise sur le marché correspondent respectivement à celle aux Etats-Unis et en Europe.

AEM : Agence européenne des médicaments ; CCDA : cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps ; CDC : cytotoxicité dépendante du complément ; FDA : *Food and Drug Administration* ; LMP : leucoencéphalopathie multifocale progressive ; PP : progressive primaire ; PS : progressive secondaire ; RR : récurrente-rémittente ; Th : lymphocyte T*helper*

Pour éviter les effets néfastes des traitements précédents, de nombreuses études sont actuellement menées pour développer des stratégies en immunothérapie comme la transplantation de cellules souches hématopoïétiques ou encore l'utilisation de vaccins à ADN codant pour le gène MBP. Cependant, leurs effets bénéfiques restent à démontrer sur le long terme.

Les traitements actuels, qui ciblent principalement le SI, démontrent des effets bénéfiques chez les patients atteints de la forme RR de la SEP. Cependant, ces traitements présentent des effets modestes avec de nombreux effets secondaires sur sa phase progressive, durant laquelle la composante neurodégénérative est prédominante (Figure 7).

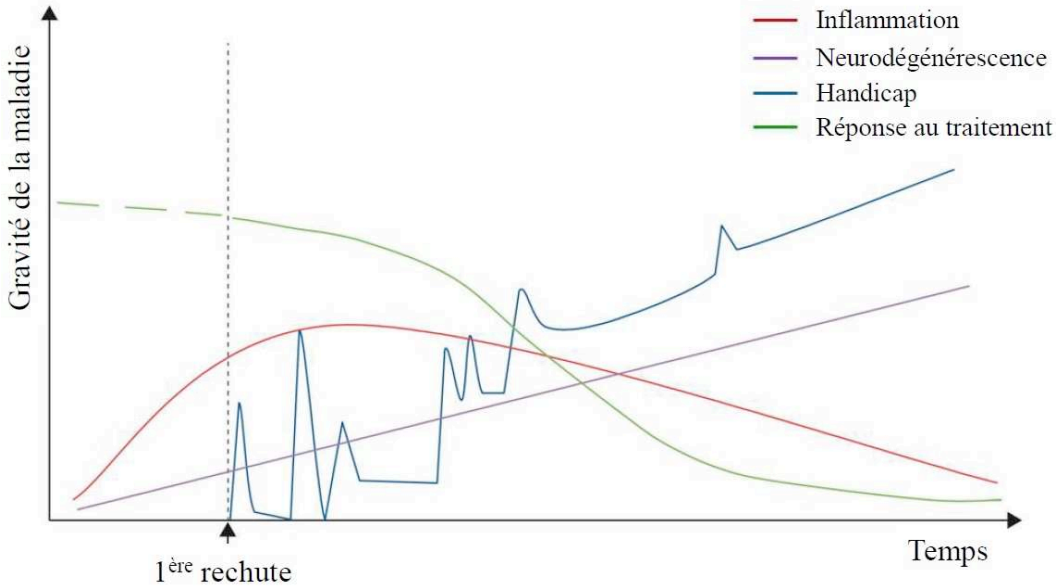



**Figure 7 : Représentation de la gravité de la maladie en fonction de l'inflammation, de la neurodégénérescence, du handicap et de la réponse au traitement,** d'après Comi *et al.,* 2017

Au début de la maladie, la réponse inflammatoire (ligne rouge) augmente fortement au cours du temps sans symptôme apparent. En parallèle, la neurodégénérescence (ligne violette) augmente doucement. Lorsqu'elle atteint un certain niveau, les patients connaissent leur première rechute. A ce moment-là, les patients présentent de phases de rechute et de rémission augmentant leur handicap (ligne bleue) au cours de temps. Au début de la maladie, les traitements immunomodulateurs (ligne verte) permettent de contrôler et diminuer les périodes de rechute. Lorsque l'inflammation diminue et que la neurodégénérescence prédomine l'inflammation, la réponse au traitement diminue induisant une fortement augmentation du handicap.

## F. Les modèles expérimentaux et les mécanismes associés

Les traitements utilisés actuellement (l'acétate de glatiramère, la mitoxantrone ou encore le natalizumab) ont été développés grâce à l'utilisation de modèles animaux mimant les caractéristiques de la SEP. Comme dans tous modèles expérimentaux, le transfert des connaissances est limité dû aux différences dans le développement et les mécanismes sous-

jacents impliqués par rapport à l'Homme. L'utilisation de modèles expérimentaux a permis d'augmenter notre compréhension de la physiopathologie de la maladie.

### 1) L'encéphalomyélite autoimmune expérimentale

En 1885, la vaccination a été utilisée cliniquement par Louis Pasteur pour soigner la rage (Baxter, 2007). Pour cela, le virus de la rage est inoculé par voie intracrânienne chez le lapin puis la moelle épinière de ce dernier est prélevée, broyée et séchée durant 5 à 14 jours. La virulence du virus est inversement corrélée au temps de séchage. L'émulsion de moelle épinière a été ensuite utilisée comme traitement. Durant deux années, ce traitement a été largement utilisé sans sévères complications observées. Lorsque la vaccination n'était pas efficace, Louis Pasteur a intensifié le traitement en utilisant une émulsion plus virulente (diminution du temps de séchage des moelles épinières à une journée). Cela a eu pour conséquence des effets néfastes chez les patients. La majorité des cas a développé des effets secondaires dits moyens avec des paralysies temporaires au niveau du visage ou des membres. Cependant, dans un tiers des cas, les effets secondaires ont été plus importants : des douleurs, des paralysies pouvant affecter la respiration et la déglutition entraînant la mort du patient dans 30% de ces cas. Il est important de noter que les caractéristiques cliniques et histologiques sont différentes de celles observées au cours de la rage : absence d'hydrophobie et présence d'infiltrations de cellules lymphoïdes et démyélinisation au niveau du SNC.

Plus tard, cette pathologie sera déterminée comme une encéphalomyélite post-vaccinale. La relation entre les symptômes observés et la SEP n'a été étudiée qu'en 1933 par Thomas Rivers, un virologue souffrant des mêmes symptômes depuis de nombreuses années. En utilisant des macaques, il a démontré que les paralysies étaient induites par des injections fortement répétées d'émulsions (plus de 50 injections) de broyats de cerveaux sains de lapins et non dues aux virus. Les symptômes observés chez les macaques ont été une démarche vacillante, des faiblesses musculaires associées à des infiltrations périvasculaires ainsi qu'une démyélinisation au niveau du SNC. D'autres expériences qui consistaient à injecter des émulsions de cerveaux de lapin chez d'autres lapins, ont démontré une corrélation entre le titre en anticorps anti-cerveau et la prévalence et/ou la gravité de la maladie. La démyélinisation observée semblait être provoquée par une réponse inflammatoire autoimmune (dirigée contre un antigène présent dans le SNC).

Pour optimiser la réponse immunitaire, Thomas Rivers a démontré que l'utilisation de l'adjuvant complet de Freund (CFA) associé à l'émulsion permettait d'induire une

encéphalomyélite autoimmune chez plusieurs espèces animales avec seulement une ou deux injections d'émulsions (Tableau 2). Ces travaux de recherche ont permis de développer le protocole d'immunisation pour induire l'EAE, l'un des premiers modèles expérimentaux.

| Espèce | Signes cliniques | Caractéristiques |
|---|---|---|
| Macaque | Formes PP et RR, ataxie du tronc, faiblesse des membres et faciale | Inflammation périvasculaire avec neutrophiles et macrophages, hémorragies, nécroses, lésions axonales, démyélinisation, localisation principalement dans le tronc cérébral et le cérébéllum, nerfs optiques touchés |
| Cochon d'Inde | Paralysie des membres postérieurs, incontinence urinaire | Méningite, hémorragies associées aux vaisseaux, infiltrations monocytaires et granulocytaires, astrocytoses, hémisphères cérébraux les plus touchés |
| Lapin | Faiblesse progressive, principalement dans les membres, absence de coordination, perte des réflèxes tendineux | Méningite, infiltrations lymphocytaires périvasculaires disséminées dans les substances blanches et grises, hyperplasie microgliale et démyélinisation |
| Souris | Nombreux modèles , faiblesse ascendante et paralysie | Multiples foyers périvasculaires d'inflammation mononucléaire, démyélinisation dans les modèles chroniques |
| Rat | Paralysie des membres postérieurs, incontinence urinaire occasionnelle, impaction fécale | Infiltrations périvasculaires lymphocytaires, monocytaires voir granulocytaires |
| Hamster | Développement très variable, avec occasionnellement incontinence urinaire, impaction fécale | Granulomes périvasculaires de lymphocytes, d'histiocytes, de cellules plasmatiques et parfois de granulocytes |
| Chien | Début soudain de l'ataxie rapidement suivie de la paralysie, cécité occasionnelle | Démyélinisation focale périvasculaire associée à des infiltrats de neutrophiles et de lymphocytes, moelle épinière le plus souvent touchée, parfois des hémorragies, nécrose |
| Mouton | Forts tremblements, trébuchant, ataxie, paralysie spasmodique | Lésions étendues à travers le SNC incluant les méninges, inflammation périvasculaire, infiltrations lymphocytaires majoritairement, granulomes, pas de réponse microgliale, faible démyélinisation |
| Ouistiti | Formes RR et PP, ataxie, paraparésie, perte sensorielle, paralysie du regard, dysarthrie, perte visuelle | Démyélinisation primaire, gliose entourant les infiltrats périvasculaires des cellules mononucléées fréquemment dans le périventriculaire profond de la substance blanche |

**Tableau 2 : Modèles d'EAE chez différentes espèces : signes cliniques et caractéristiques**

Il existe deux types d'EAE selon le mode d'induction (Bjelobaba *et al.*, 2018) : l'EAE active et l'EAE passive.

L'EAE active est induite par une immunisation sous cutanée (s.c.) d'un antigène ou peptide, provenant de la myéline, émulsionné avec du CFA et du *Mycobacterium tuberculosis* inactivé par la chaleur. Le CFA exerce 3 rôles :

- il favorise une réponse immunitaire de type Th1 ;
- il augmente la stabilité de l'émulsion permettant de protéger le peptide contre la dégradation et induisant ainsi une plus longue réponse immunitaire ;

- il facilite la diffusion du peptide au travers de la BHE sans l'activation non spécifique de la microglie et des astrocytes (Rabchevsky *et al.*, 1999).

L'inconvénient de l'utilisation du CFA est l'apparition potentielle de granulomes au niveau du site d'inoculation ou de lésions. Le protocole d'immunisation nécessite deux injections supplémentaires de toxine pertussique (TP) le jour de l'immunisation puis deux jours après. La TP semble faciliter la migration des lymphocytes T auto-réactifs dans le SNC, la rupture de la tolérance des lymphocytes T et celle de la perméabilité de la BHE (Hofstetter *et al.*, 2002).

L'EAE active présente deux phases :

- une phase d'immunisation : la reconnaissance antigénique par lymphocytes T auto-réactifs spécifiques du peptide induit la prolifération de ces lymphocytes puis de leur différenciation ;
- une phase effectrice : les lymphocytes T migrent dans le SNC à travers la BHE, leur réactivation est induite par la microglie et leur réponse immunitaire contre la myéline est augmentée.

L'EAE passive est induite par le transfert de lymphocytes T auto-réactifs, contre la myéline réactivés *in vitro*, à des souris naïves syngéniques. Cette induction permet d'étudier le rôle central des lymphocytes T au cours de la phase effectrice de la maladie.

### 2) Les différents modèles d'EAE chez la souris

Le modèle d'EAE chez la souris est le plus couramment utilisé en raison de son faible coût, de l'expansion rapide des colonies et de la manipulation génétique facile. Ce modèle permet d'étudier :

- la réponse immunitaire au niveau du SI et l'implication des processus de neurodégénérescence ;
- l'implication d'un gène ou d'une protéine par l'utilisation de modèles transgéniques et de KO (invalidation d'un gène).

Selon la souche, l'âge et le sexe des souris étudiées ainsi que le microbiote et le stress, la susceptibilité à un antigène de la myéline donné ainsi que le développement de la maladie seront différents. Dans cette section, seuls les modèles les plus connus seront décrits.

### (a) Les modèles inflammatoires

#### (i) Le modèle récurrent-rémittent

Les souris SJL sont sensibles à une immunisation s.c. contre différents peptides de la myéline comme le PLP, la MOG ou le MBP pour induire l'EAE. En général, après immunisation, elles développent une forme d'EAE récurrente-rémittente avec des périodes de poussées et de rémissions, similaire à la forme RR humaine (Bjelobaba *et al.*, 2018).

#### (ii) Les modèles aigüe et chronique

Le peptide MOG, émulsionné avec du CFA, est très encéphalogène lorsqu'il est injecté en s.c. (et avec deux injections de TP aux jours 0 et 2) à des souris C57BL/6 (Bjelobaba *et al.*, 2018). Selon le protocole et l'environnement, les souris développent :

- une EAE aigüe monophasique. Les symptômes apparaissent 10 à 15 jours après l'immunisation puis augmentation du score clinique jusqu'à atteindre un pic et enfin diminution des symptômes jusqu'à une rémission complète après 30-40 jours post-immunisation. Ce modèle mime une SEP aigüe.
- une EAE chronique plus sévère. L'apparition de la maladie est similaire à celle de l'EAE aigüe mais, après le pic, le score clinique atteint un plateau. Les souris restent malades sans phase de rémission pendant au moins 20 jours. Ce modèle chronique mime la phase progressive de la SEP.

#### (iii) Le modèle utilisant le virus encéphalomyélite murin de Theiler

Le modèle utilisant le virus encéphalomyélite murin de Theiler ou *Theiler's murine encephalomyelitis virus* (TMEV) permet d'étudier l'implication des virus dans la susceptibilité au développement de la SEP chez l'Homme (Oleszak *et al.*, 2004). Le TMEV est un virus à ARN simple brin appartenant à la famille des *picornaviridae*. Ces virus sont capables de se loger dans le SNC induisant des paralysies (caractéristiques de l'EAE) chez l'animal infecté. L'EAE est induite par l'inoculation intracrânienne chez des souris SJL, d'une des souches TMEV selon la forme d'EAE souhaitée. En effet, il existe deux sous-groupes caractérisés selon leur virulence et leur capacité antigénique.

Le premier sous-groupe est composé des souches GDVII et FA qui sont des variants extrêmement neurovirulents. Ils induisent une forme aigüe, lorsque les animaux survivent à l'infection, le virus ne persiste pas.

Le second sous-groupe est composé des souches BeAn et DA. Dans les deux cas, la maladie est composée d'une phase aigüe et d'une phase chronique (Zoecklein *et al.*, 2003).

- la souche DA induit une maladie avec une phase aigüe précoce avec une forte atteinte au niveau de la matière grise et une phase chronique de démyélinisation tardive. Les signes cliniques apparaissent approximativement 140 à 180 jours après l'infection.
- la souche BeAn, quant à elle, présente une phase aigüe plus atténuée que celle observée avec la souche DA puis une phase chronique de démyélinisation tardive. L'apparition de la maladie se fait environ 30 à 50 jours après l'infection.

A partir des deux souches, la phase aigüe précoce est similaire à une polioencéphalomyélite. Elle est associée à la réplication du virus dans le SNC et à la destruction des neurones. De plus, l'infection induit une infiltration de cellules immunitaires dans le SNC.

La phase chronique tardive est associée à des lésions démyélinisées et des cellules immunitaires dans la moelle épinière. La phase chronique induit une atrophie progressive de la moelle épinière ainsi qu'une perte axonale. En revanche, les souris C57BL/6 développent une maladie précoce et aigüe (3 semaines après l'infection) et ne présentent pas de phase chronique tardive à cause d'une forte réponse immunitaire. Cette dernière permet une élimination complète du virus (Zoecklein *et al.*, 2003).

#### (b) Le modèle neurodégénératif de la cuprizone

A l'opposé des modèles inflammatoires, les modèles toxiques permettent d'étudier la démyélinisation et la remyélinisation en absence d'inflammation tels que celui induit par la cuprizone (ou *oxalic acid bis [cyclohexylidene hydrazide]* ou CPZ). Il s'agit d'un chélateur du cuivre qui provoque la mort spécifique des oligodendrocytes matures de façon très reproductible. La CPZ est ajoutée au régime alimentaire de l'animal (nourriture ou eau de boisson). Son action sur les oligodendrocytes n'est pas clairement définie. La CPZ induit un fort stress oxydatif qui semblerait être dû à un dysfonctionnement mitochondrial conduisant à un stress métabolique des oligodendrocytes. La démyélinisation est observable après 3 semaines de CPZ avec une forte activation de la microglie et des astrocytes ainsi que la présence d'axones endommagés. Les zones les plus touchées par la démyélinisation après 6 semaines (correspondant à une démyélinisation aigüe) sont le corps calleux et les pédoncules cérébelleux postérieurs. La démyélinisation aigüe est suivie par une remyélinisation spontanée après l'arrêt de l'administration de la CPZ. Les précurseurs des oligodendrocytes peuvent alors

se différencier en l'absence de CPZ et permettre la remyélinisation. Ce modèle ne fait pas intervenir le SI adaptatif (Hiremath *et al.*, 2008). En effet, les souris Rag-1$^{-/-}$ (déficientes en lymphocytes T et B) présentent le même phénotype que des souris sauvages en présence de CPZ. De la même façon que pour l'EAE, l'intoxication par la CPZ induit différents degrés de démyélinisation en fonction de la souche, l'âge et le sexe des souris étudiées. L'utilisation de souris Swiss, BALB/c et SJL permet d'obtenir une démyélinisation mais elle est retardée ou incomplète. La souche C57BL/6 est la plus utilisée du fait de la reproductibilité des phases de démyélinisation et de remyélinisation. Aucune différence entre les mâles et les femelles de cette souche n'est observée à la suite d'un régime avec de la CPZ. De plus, l'âge des souris ne semble pas impacter la phase de démyélinisation néanmoins un âge avancé des souris provoque une diminution de la remyélinisation spontanée.

## Chapitre 3. Le Vasoactive intestinal peptide (VIP) et le Pituitary adenylate cyclase-activated polypeptide (PACAP)

Said *et al.* ont découvert et isolé un peptide pouvant induire une vasodilatation périphérique, graduelle et prolongée à partir d'un tissu de poumon sain (Said and Mutt, 1969) et d'intestin (Said and Mutt, 1970), appelé VIP à cause de son rôle hormonal dans l'intestin. VIP est aussi un neuropeptide puisqu'il est présent dans les systèmes nerveux central et périphérique (Said and Rosenberg, 1976). Il est composé de 28 acides aminés. VIP et PACAP proviennent de gènes précurseurs, respectivement pré-pro VIP et pré-pro PACAP (Figure 8).

La première purification de PACAP date de 1989 par Miyata *et al.* à partir d'un extrait d'hypothalamus de mouton. Il se présente sous deux formes : un peptide de 38 acides aminés et un peptide de 27 acides aminés (Miyata *et al.*, 1989).

VIP et PACAP appartiennent à la superfamille des hormones peptidiques structurellement liées, composée de 9 membres : PACAP, sécrétine, peptide histidine méthionine (ou *peptide histidine methionine*), VIP, glucagon, peptides proche du glucagon 1 et 2 (ou *glucagon-like peptide-1* et *-2*), facteur libérant l'hormone de croissance (ou *GH-releasing factor/*GRF) et polypeptide insulinotrope dépendant du glucose (ou *glucose-dependent insulinotropic polypeptide*) (Sherwood *et al.*, 2000). Les membres de cette superfamille possèdent des caractéristiques communes :

- leur structure : une taille de 27 à 44 acides aminés avec une configuration en hélice α du résidu 6 jusqu'à l'extrémité C-terminale du peptide et une partie N-terminale labile sans structure définie ;

- leur distribution : essentiellement dans le cerveau et les intestins ;
- leur fonction : activation des mêmes voies de signalisation comme celle de l'adénylate cyclase (AC) ;
- leurs récepteurs : récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés à des protéines G (RCPG).

VIP et PACAP-27 partagent une forte identité sur le plan de leur séquence peptidique (68%) indiquant une forte conservation au cours de l'évolution (Miyata *et al.*, 1990).

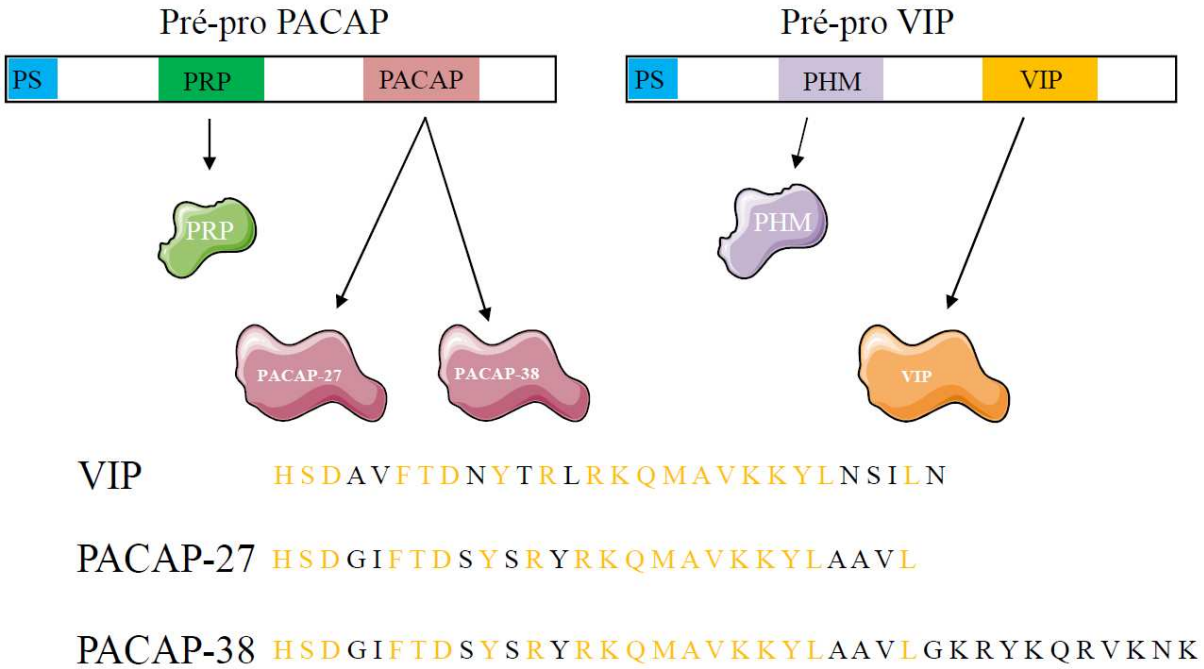



**Figure 8 : L'origine et la séquence en acides nucléiques de VIP et PACAP**
VIP et PACAP proviennent respectivement des gènes pré-pro VIP et PACAP. Les séquences en acides nucléiques de VIP et PACAP sont représentées avec en orange les acides nucléiques identiques et en noir ceux qui diffèrent entre les trois formes des neuropeptides.
PS : peptide signal

## A. Les récepteurs

VIP et PACAP sont les ligands de 3 RCPGs : PAC1, VPAC1 et VPAC2. Le récepteur VPAC1 a été le premier des trois à être cloné à partir de poumons de rat (Couvineau *et al.*, 1994; Ishihara *et al.*, 1992). Puis VPAC2 et PAC1 ont été clonés à partir respectivement de bulbes olfactifs de rat (Lutz *et al.*, 1993) et d'une lignée cellulaire de carcinome acinaire pancréatique de rat (Pisegna and Wank, 1993). PACAP se lie aux 3 récepteurs alors que VIP se fixe seulement sur VPAC1 et VPAC2. Les récepteurs VPAC tiennent leur nom de la contraction des noms de leurs ligands (Laburthe *et al.*, 2002). Ces récepteurs appartiennent à

la famille des RCPGs de classe II. Elle comprend les récepteurs de la sécrétine, des peptides proches du glucagon 1 et 2 (ou *glucagon-like peptides 1 and 2*), de l'hormone libérant l'hormone de croissance (ou *growth hormone-releasing hormone*), de l'hormone parathyroïde, du peptide lié au gène de la calcitonine (ou *calcitonin gene-related peptide*) et du facteur libérant de la corticotropine (ou *corticotropin-releasing factor*) (Laburthe *et al.*, 1996).

## B. Les voies de signalisation

L'étude des voies de signalisation à la suite de l'activation d'un récepteur est très compliquée à mettre en place et se fait toujours à partir de l'utilisation d'une lignée cellulaire spécifique (généralement les cellules CHO : lignée cellulaire issue d'ovaire de hamster de Chine) (Kukkonen and Leonard, 2014; Tsujino and Sakurai, 2009).

Les récepteurs RCPG peuvent être associés à différentes protéines G et en fonction de la protéine G activée ainsi que du type cellulaire étudié, différentes voies de signalisation sont stimulées. Pour cette section, les différentes voies de signalisation pouvant être induites à la suite de la fixation de VIP et de PACAP seront résumées avec quelques exemples expérimentaux *in vitro* (Figure 9).

Les récepteurs VPAC sont préférentiellement couplés aux protéines $G\alpha_S$ qui induisent la stimulation de l'AC. Cette dernière induit la production d'AMPc intracellulaire activant la protéine kinase A (PKA) (Gonzalez-Rey *et al.*, 2007) et la voie de signalisation *extracellular signal-regulated kinases* (ERK) dans des cellules pituitaires (Le Péchon-Vallée *et al.*, 2000) ou dans des cellules endocrines de la prostate (Gutiérrez-Cañas *et al.*, 2005). La protéine $G\alpha_S$, associée au récepteur VPAC2, induit aussi l'activation de la *phosphatidylinositol-3-kinase* (PI3K) *via* la voie de l'AC au sein des cellules β pancréatiques (Straub and Sharp, 1996).

Le récepteur VPAC1 est aussi couplé à la protéine $G\alpha_i$ qui active la phospholipase C (PLC) de façon indépendante à la TP. La PLC permet la production de l'inositol triphosphate (IP3) et du diacylglycéride (DAG) agissant sur la protéine kinase C (PKC) qui favorise l'ouverture de canaux calciques membranaires (Langer, 2012; MacKENZIE *et al.*, 2006). Par cette protéine $G\alpha_i$ et la protéine $G\alpha_q$ (Langer and Robberecht, 2005; Langer *et al.*, 2005; MacKenzie *et al.*, 1996), VIP et PACAP induisent une augmentation de la concentration en calcium intracellulaire dans différents types cellulaires *in vitro* comme par exemple les cellules issues de ganglions cervicaux supérieurs de rat (Audigier *et al.*, 1986) ou encore les cellules pituitaires (Canny *et al.*, 1992).

De plus, la protéine $G\alpha_q$ associée au récepteur PAC1 induit la production de la phospholipase D (PLD) par l'intermédiaire de la PLC aboutissant à l'activation de la cascade phosphatidylinositol (PI). Un relargage du calcium issu du réticulum endoplasmique est également observé, résultant en une augmentation de la concentration calcique intracellulaire (McCulloch *et al.*, 2000).

D'autre part, la protéine Gβγ est associée au récepteur VPAC2 et permet d'activer la voie de la PLC de façon dépendante à la TP induisant l'ouverture des canaux calciques membranaires (MacKENZIE *et al.*, 2006). Enfin, la petite protéine G *ADP-ribosylation factor* (ARF) est liée aux récepteurs VPAC et PAC1 murins et induit l'activation de la PLD de façon indépendante de la PLC (McCulloch *et al.*, 2000).

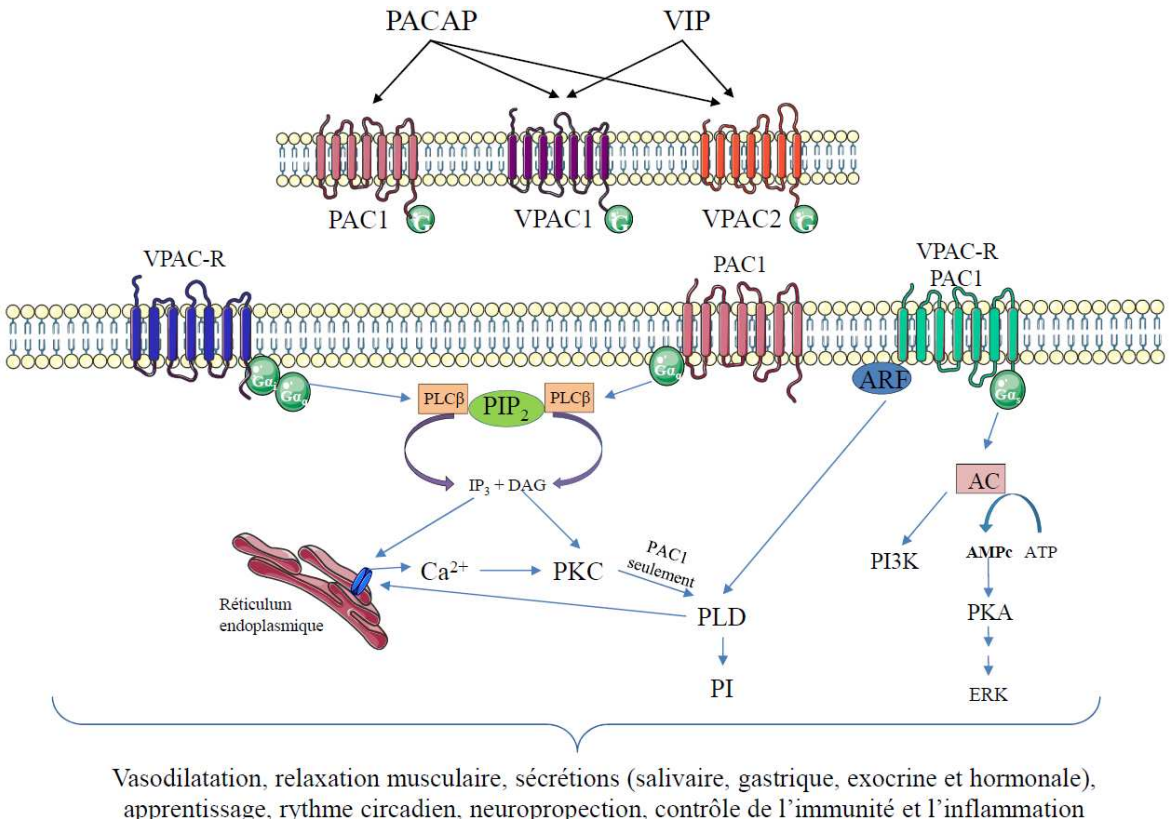



**Figure 9 : Les récepteurs et voies de signalisation de VIP et PACAP**

VIP et PACAP possède trois récepteurs : PACAP peut se fixer sur les trois récepteurs alors que VIP ne peut se fixer que sur VPAC1 et VPAC2. La fixation d'un des ligands à leur récepteurs induit l'activation de différentes voies de signalisation selon les protéines G impliquées telles que la voie de l'AC, de la PLC ou encore PLD. Cela aboutit à des effets pléiotropiques : vasodilatation, relaxation musculaire, neuroprotection ou encore contrôle de l'inflammation.

AC : adénylate cyclase ; AMPc : Adénosine monophosphate cyclique ; ARF : ADP-ribosylation factor; ATP : adénosine triphosphate ; Ca2+ : calcium 2+ ; DAG : diacylglycérol ; ERK : extracellular signal-regulated kinase ; IP3 : inositol triphosphate ; PI : phosphatidylinositol ; PI3K : phospho-inostiol 3 kinase ; PIP2 : Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate ; PKA : protéine kinase A ; PKC : protéine kinase C ; PLC : phospholipase C ; PLD : phospholipase D ; VPAC-R : récepteurs VPAC1 et VPAC2.

## C. La distribution tissulaire

### 1) Au niveau du système nerveux central

De nombreuses études sur la localisation des ARNm de ces récepteurs ont été réalisées à partir de SNC de rat (Tableau 3). Ces récepteurs sont présents au niveau du cortex cérébral, du bulbe olfactif, du thalamus ou encore de l'hypothalamus. Les taux en ARNm de PAC1 sont plus importants dans le SNC que ceux des récepteurs VPAC.

Les transcrits de PAC1 ont été observés dans le bulbe olfactif, le gyrus danté de l'hippocampe, le noyau supra-optique de l'hypothalamus, le cortex cérébelleux, l'*area postrema*, dans différentes régions du thalamus, les noyaux gris centraux, les noyaux de Raphé et le colliculus supérieur (Hashimoto *et al.*, 1996; Shioda *et al.*, 1997). Les transcrits de PAC1 sont également présents dans les neurones (principalement dans les corps cellulaires et les dendrites) et les cellules gliales (Shioda *et al.*, 1997; Tatsuno *et al.*, 1991a).

Les ARNm de VPAC1 sont principalement présents dans le cortex cérébelleux et l'hippocampe (Sheward *et al.*, 1995; Usdin *et al.*, 1994).

Au contraire, les ARNm de VPAC2 sont retrouvés dans le thalamus, le noyau supra-optique, le noyau central des amygdales et du noyau pontique (Ishihara *et al.*, 1992; Usdin *et al.*, 1994).

### 2) Au niveau du système immunitaire

Les trois récepteurs sont localisés au niveau du thymus et de la rate. Delgado *et al.* (Delgado *et al.*, 2004b) ont regroupé différentes études sur la localisation des transcrits au niveau des cellules immunitaires pour les récepteurs VPAC (Figure 10). VPAC1 est exprimé constitutivement au niveau des lymphocytes, des cellules dendritiques et des macrophages. VPAC2 est exprimé par les lymphocytes activés, les cellules dendritiques activées (Delneste *et al.*, 1999) et les macrophages activés. Dans le péritoine, les transcrits de PAC1 sont exprimés au niveau des macrophages mais pas au niveau des lymphocytes (Delgado *et al.*, 1996; Pozo *et al.*, 1997).

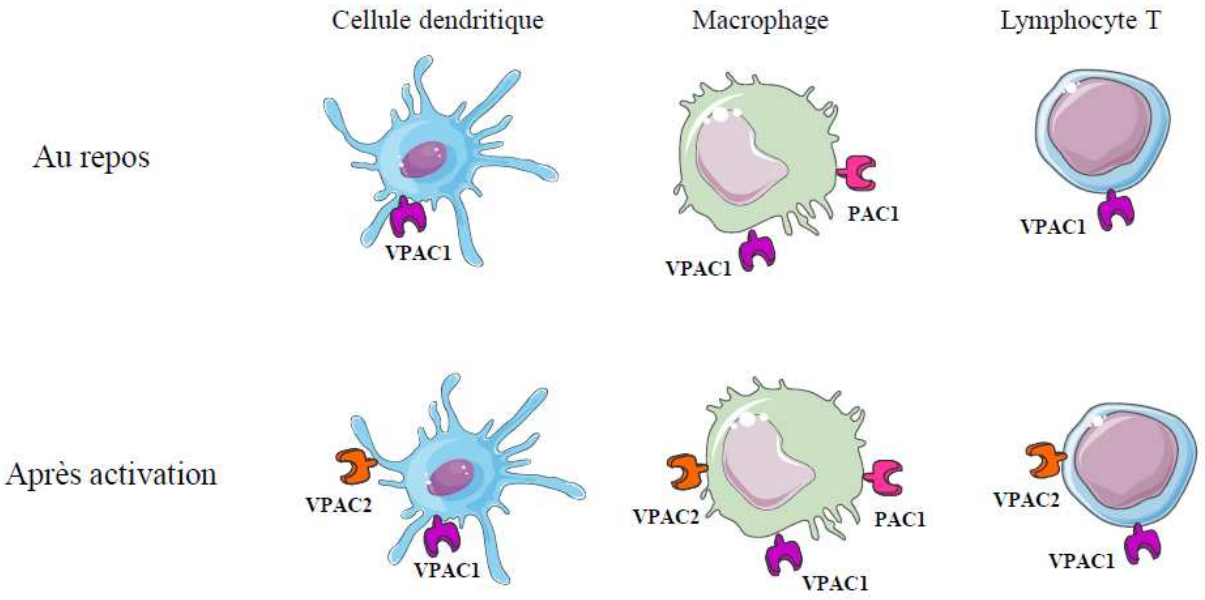



**Figure 10 : Profils d'expression des récepteurs de VIP et PACAP sur les cellules immunitaires**

### 3) Autres localisations

Les données des taux de transcrits en dehors du SNC chez l'Homme mais aussi chez les rongeurs ont été compilées par Vaudry *et al.* (Vaudry *et al.*, 2000) (Tableau 3).

Dans le système cardiovasculaire, les trois transcrits sont retrouvés au niveau du cœur (Usdin *et al.*, 1994; Ushiyama *et al.*, 2006). Par contre, seuls les ARNm de VPAC2 sont présents dans des tissus aortiques dé-endothélisés et des cellules musculaires lisses vasculaires (Miyata *et al.*, 1998).

Au niveau du système respiratoire, les trois transcrits sont présents avec une prédominance pour le transcrit de VPAC1.

Au niveau du tractus gastro-intestinal, les transcrits de VPAC1 et VPAC2 sont détectés au niveau de l'intestin et du colon de rat. Les ARNm de VPAC2 sont retrouvés dans l'estomac et le duodénum (Ishihara *et al.*, 1992; Usdin *et al.*, 1994). Les transcrits de PAC1 sont retrouvés dans l'estomac (Zeng *et al.*, 1999).

Au niveau du système urinaire, les transcrits de VPAC1 et VPAC2 sont détectés dans les reins.

Les transcrits des trois récepteurs sont largement exprimés au niveau du système endocrinien tels que l'hypophyse, les glandes surrénales, le pancréas et le foie (Hashimoto *et al.*, 1993, 1996; Shioda *et al.*, 1997; Usdin *et al.*, 1994).

Au niveau des appareils reproducteurs, les transcrits de VPAC2 sont présents à la fois dans les testicules et les ovaires. Par contre, seuls les transcrits de PAC1 sont retrouvés dans les ovaires et ceux de VPAC1 dans les testicules.

| Chez le rat | | | |
|---|---|---|---|
| Tissus | VPAC1 | VPAC2 | PAC1 |
| Hippocampe | +++ | + | ++ |
| Cortex cérébral | ++ | + | ++ |
| Cortex cérébelleux | + | ND | + |
| Noyau amygdaloïde latéral | ++ | +++ | + |
| Glande pinéale | + | + | ++ |
| Thalamus | - | ++ | ++ |
| Mésencéphale | ND | + | + |
| Hypophyse | ND | ND | + |
| Hypothalamus | - | ++ | ++ |
| Bulbes olfactifs | + | + | +++ |
| Glandes pituitaires | - | + | + |
| Tronc cérébral | - | + | + |
| Yeux | + | + | + |
| Thymus | + | + | + |
| Rate | ± | + | ND |
| Cœur | + | + | ± |
| Poumon | +++ | + | + |
| Foie | + | ND | + |
| Estomac | - | + | + |
| Duodénum | - | + | ND |
| Intestin | + | + | + |
| Colon | + | + | ND |
| Reins | + | + | ND |
| Glandes surrénales | + | + | + |
| Pancréas | + | + | + |
| Gonades | ± | + | ± |

Système nerveux
Système immunitaire
Système cardiovasculaire
Système respiratoire
Système digestif
Système urinaire
Système endocrinien

**Tableau 3 : La distribution des récepteurs VPAC1, VPAC2 et PAC1**
- Non exprimé ; -+ faiblement exprimé ; + exprimé ; ++ fortement exprimé ; +++ très fortement exprimé ; ND : non déterminé

## D. Les fonctions physiologiques

Les deux neuropeptides présentent des fonctions physiologiques pléïotropiques. Les principales fonctions de VIP et de PACAP sont décrits ci-dessous.

VIP et PACAP jouent un rôle dans la vasodilatation. Au niveau du système respiratoire, ils permettent la relaxation des muscles lisses de la trachée, la bronchodilatation et augmentent la résistance nasale des voies respiratoires. Au sein du tractus gastro-intestinal,

ils agissent sur la sécrétion salivaire et gastrique, la relaxation des muscles lisses gastriques ou encore le péristaltisme. Ils permettent aussi des sécrétions exocrines et hormonales et régulent la croissance cellulaire chez le fœtus. Au niveau du SNC, VIP et PACAP jouent un rôle dans l'apprentissage, le rythme circadien, le développement cérébral embryonnaire, la réponse à la douleur ou encore dans la neuroprotection. Ils contrôlent l'immunité et suppriment aussi l'inflammation (Delgado *et al.*, 2004b; Vaudry *et al.*, 2000). Les deux prochaines parties vont se concentrer sur la modulation de la réponse immunitaire (Figure 11) et l'activité neuroprotectrice (Tableau 4) de VIP et PACAP *via* leurs récepteurs dans le contexte de la SEP et de l'EAE.

## 1) L'activité neuroprotectrice

### (a) Le développement des cellules du SNC

PACAP favorise la sortie des précurseurs du cycle cellulaire (Lu and DiCicco-Bloom, 1997). Il diminue la proportion des cellules en mitose dans une culture de précurseurs corticaux embryonnaires de rat au stade E13.5 permettant ainsi la différenciation neuronale par l'intermédiaire du récepteur PAC1 (Lu *et al.*, 1998). Il permet aussi le développement des neurites dans des cultures de neuroblastes cérébelleux de rat (Gonzalez *et al.*, 1997) et de cellules PC12 (lignée cellulaire issue d'un phéochromocytome permettant d'étudier la différenciation neuronale) (Deutsch and Sun, 1992) par l'activation de STAT3 (Ishido, 2010). De plus, PACAP favorise la prolifération cellulaire dans des cultures d'astrocytes de rat (Moroo *et al.*, 1998). D'ailleurs, Zupan *et al.* ont démontré que l'astrocytogénèse néocorticale est induite par le récepteur VPAC2 (Zupan *et al.*, 1998). Enfin, Lee *et al.* ont démontré que PACAP agit sur le développement des oligodendrocytes en stimulant leur prolifération retardant leur maturation et/ou la myélinogénèse (Lee *et al.*, 2001).

### (b) La survie des cellules neuronales

En plus de leurs effets sur le développement des cellules gliales, VIP et PACAP protègent les neurones de la mort cellulaire en condition physiologique mais aussi pathologique.

L'ajout de β-amyloïde$_{(1-42)}$ (Onoue *et al.*, 2002) dans une culture de PC12 permet de mimer *in vitro* la maladie d'Alzheimer alors que l'ajout de la roténone (un inhibiteur du complexe mitochondrial I) (Wang *et al.*, 2005), ou encore d'6-OHDA (neurotoxine utilisée pour induire la mort spécifiquement les neurones dopaminergiques et noradrénergiques)

(Offen *et al.*, 2000) dans une culture de cellules PC12, de cellules granulaires cérébelleuses ou de cellules de neuroblastome permettent de mimer *in vitro* la maladie de Parkinson. La forte toxicité des agents induit la mort cellulaire. VIP et PACAP diminuent cette toxicité favorisant la survie cellulaire.

En condition physiologique, PACAP protège les cellules granulaires du cortex en culture contre la mort cellulaire programmée (Gonzalez *et al.*, 1997). En condition pathologique, Vaudry *et al.* ont démontré le rôle neuroprotecteur de VIP et de PACAP dans une culture de neurones granulaires cérébelleux de rat contre le stress oxydatif (Vaudry *et al.*, 2002a) et l'alcool (Vaudry *et al.*, 2002b).

De plus, la privation d'oxygène et de glucose (modèle *in vitro* de stress cellulaire ischémique) diminue la viabilité cellulaire dans une culture d'astrocytes ou de neurones (Jóźwiak-Bębenista *et al.*, 2015). PACAP (et à moindre effet, VIP) diminue la mort cellulaire induite par cette privation d'oxygène et de glucose *via* la voie de l'AMPc.

Les mécanismes impliqués dans une lésion nerveuse peuvent être étudiés *in vitro* par le grattement d'une monocouche cellulaire d'astrocytes. Nakamachi *et al.* ont montré que PACAP, *via* PAC1, augmente la prolifération des astrocytes à la suite d'une lésion nerveuse (Nakamachi *et al.*, 2011). De plus, Brenneman *et al.* ont induit une perte de cellules neuronales issues de la moelle épinière par un traitement à la tétrodotoxine (toxine bloquant les canaux sodium voltage-dépendant empêchant le passage de l'influx nerveux). La perte des cellules neuronales est diminuée par l'ajout de VIP (Brenneman *and* Eiden, 1986).

VIP et PACAP sont impliqués dans la production de molécules ayant un rôle neuroprotecteur telles que l'ADNP et l'ADNF par les cellules gliales et les astrocytes (Bassan *et al.*, 1999; Brenneman *and* Gozes, 1996; Brenneman *et al.*, 1997). *In vitro*, l'ajout d'un agoniste de VIP dans une culture de PC12 en présence d'iodoacétate (inhibant la glycolyse et induisant la mort cellulaire) permet d'augmenter l'expression en ARNm de l'ADNP corrélant avec l'augmentation de la survie cellulaire.

En plus des effets *in vitro* de VIP et PACAP sur la survie cellulaire, de nombreuses études *in vivo* ont démontré l'efficacité de ces deux neuropeptides.

L'accident vasculaire cérébrale (AVC) ischémique est étudié grâce au modèle murin d'occlusion de l'artère cérébrale moyenne (appelé MCAO pour *middle cerebral artery occlusion)*. Ce modèle consiste à insérer un filament chirurgical dans l'artère carotide externe et à l'insérer dans l'artère carotide interne. La technique peut être utilisée pour modéliser

l'occlusion permanente ou transitoire. Si la suture est enlevée après 30 min, la reperfusion est réalisée permettant d'obtenir une MCAO transitoire ; si le filament est laissé en place (24 h), la procédure est donc un modèle de MCAO permanent. Shioda *et al.* ont démontré que PACAP diminue la mort neuronale en condition ischémique *via* le récepteur PAC1 (Ohtaki *et al.*, 2006). Une leucomalacie périventriculaire (lésion ischémique) chez les prématurés peut être mimée *in vivo* par l'administration de l'iboténate (excitotoxine) chez des souriceaux induisant des lésions de la substance blanche. VIP et ses analogues protègent la substance blanche contre les lésions excitotoxiques et induisent une neuroprotection de la substance blanche en formation (Gressens *et al.*, 1999) *via* le récepteur VPAC2 (Rangon *et al.*, 2005).

De plus, le 1-méthyl-4-phényl-1,2,3,6-tétrahydropyridine (MPTP) est une neurotoxine permettant de mimer la maladie de Parkinson *in vitro* et *in vivo* en induisant la mort neuronale dans la *subtantia nigra* du cerveau (au niveau du mésencéphale et du diencéphale sus-jacent). VIP permet de diminuer cette mort neuronale *via* le récepteur VPAC2 (Delgado and Ganea, 2003a; Olson *et al.*, 2015). D'ailleurs, les souriceaux déficients pour VIP ont des caractéristiques proches de l'autisme (Wu *et al.*, 1997) qui peuvent être expliquées par la diminution de l'expression de l'ADNP chez ces souris (Giladi *et al.*, 2007).

Enfin, la régénération axonale est étudiée *in vivo* par l'écrasement du nerf facial. Les souris déficientes pour le gène PACAP présentent un retard dans la régénération axonale après une lésion par écrasement avec une diminution du nombre d'axones en régénération (Armstrong *et al.*, 2008).

#### (c) Les effets sur la réponse inflammatoire

Les effets de VIP et de PACAP sur le développement des cellules gliales et la survie neuronale s'accompagnent d'une modulation de la réponse inflammatoire.

L'ajout de PACAP dans une culture primaire d'astrocytes de rat en présence d'IL-1β induit leur prolifération et une augmentation de la production d'IL-6, facteur neurotrophique et témoin de leur activation (Tatsuno *et al.*, 1996). L'ajout de PACAP ou de VIP dans des cultures de lignées cellulaires microgliales activées par l'IL-10 induit une diminution de l'expression d'IP-10, d'iNOS, de CD40 et de B7.2 (Delgado, 2003; Kim *et al.*, 2002). De plus, VIP et PACAP diminuent la capacité chimiotactique de la microglie activée par le lipopolysaccharide (LPS) via une diminution de la production des chimiokines : CCL3/*macrophage inflammatory protein* (MIP)-1α, CCL4/MIP-1β, CCL5/*Regulated on*

*Activation, Normal T Cell Expressed and Secreted* (RANTES), CCL2/MCP-1, CXCL1/KC et CXCL2/MIP-2. Ils inhibent aussi la réponse inflammatoire avec une diminution de la production en TNF-α, IL-1β et iNOS et favorisent la production de cytokines anti-inflammatoires (TGF-β, IL-1ra, IL-10) par les cellules microgliales (Delgado, 2002, 2003; Delgado and Ganea, 2003b; Delgado *et al.*, 2003) *via* VPAC1 et PAC1 en stimulant la voie de signalisation de l'AMPc (Kim *et al.*, 2000) (Figure 9).

VIP et PACAP induisent *in vivo* la production d'IL-6 après un dommage neuronal ischémique chez le rat (Ohtaki *et al.*, 2006) ou un choc traumatique par l'administration de LPS dans le 3ème ventricule du cerveau de souris adulte (Delgado and Ganea, 2003b). De plus, Amstrong *et al.* ont étudié l'impact de PACAP sur des lésions induites par écrasement chez des souris KO PACAP. Cette absence induit une augmentation des cytokines pro-inflammatoires ainsi qu'un retard dans la régénération axonale (Armstrong *et al.*, 2008). Enfin, le MPTP induit une neurodégénérescence inhibée par VIP *in vivo*. Les auteurs ont observé une diminution de la réponse microgliale et une production de cytokines pro-inflammatoires (comme l'IL-17α, l'IL-6 et l'IFN-γ) *via* VPAC2 (Olson *et al.*, 2015).

| | Diminution | Augmentation |
|---|---|---|
| *In vitro* | • Apoptose neuronale et astrocytaire<br>• Activité pro-inflammatoire microgliale | • Développement des neurites<br>• Prolifération des oligodendrocytes précurseurs et des astrocytes<br>• Production des facteurs neuroprotecteurs |
| *In vivo* | | • Neuroprotection dans les modèles d'AVC, de Parkinson et d'écrasement du nerf facial |

**Tableau 4 : Tableau récapitulatif des effets de VIP et PACAP dans le SNC**

## 2) Les effets immunomodulateurs

Cette section décrit les effets immunodulateurs de VIP et PACAP sur le versant de l'immunité innée avec un focus sur les macrophages et sur le versant de l'immunité adaptative concentré sur les balances Th1/Th2 et Th17/Treg (Figure 11).

### (a) Les macrophages, les neutrophiles et les cellules dendritiques

Comme mentionné précédemment, les CPA expriment des molécules de co-stimulation telles que les molécules B7.1 et B7.2 (respectivement nommées CD80 et CD86) pour activer les lymphocytes T. Dans une culture de macrophages péritonéaux au repos, VIP

et PACAP augmentent *in vitro* le taux en ARNm et l'expression protéique de la molécule B7.2 (mais pas de B7.1) et stimulent, de façon surprenante, la production d'IL-6, cytokine pro-inflammatoire dans ce contexte, *via* l'implication des voies de signalisation de PKC et de PKA (Delgado *et al.*, 1999b; Martinez *et al.*, 1998).

Dans des cultures de macrophages stimulés par du LPS, VIP et PACAP agissent selon deux voies de signalisation de façon dépendante et indépendante de l'AMPc. L'activation de la voie de signalisation de l'AMPc par VIP et PACAP dans une culture de macrophages péritonéaux et de la lignée cellulaire de macrophages Raw 264.7 (Leceta *et al.*, 2000). Cela diminue la fixation du facteur de régulation de l'IFN-γ (*IFN-γ regulating factor* ou (IRF-1) sur l'ADN et l'expression d'iNOS et augmente celle de la protéine se fixant à CRE (*cAMP response element-binding protein* ou CREB) et la production d'IL-10. VIP et PACAP activent également une voie indépendante de l'AMPc diminuant la dégradation d'IκBα ainsi que la translocation nucléaire de NFκB. Cette diminution permet de réduire l'expression d'iNOS, la production de TNF-α (par l'intervention des complexes de fixation à CRE) et la production d'IL-12 (par l'intervention des complexes Ets-2) (Leceta *et al.*, 2000). De plus, VIP et PACAP inhibent la sécrétion de l'IL-6, de l'IL-12 et du TNF-α ainsi que la production de NO de façon dose- et temps-dépendante. Ils stimulent également la sécrétion des cytokines anti-inflammatoires comme l'IL-10 (Delgado *et al.*, 1999c, 1999d, 1999e; Soares *et al.*, 1998).

De plus, *in vitro*, les macrophages humains présentent soit un phénotype pro-inflammatoire (IL-6, TNF-α, IL-12p40, INHBA, CCR2, EGLN3 et MMP-12), soit un phénotype anti-inflammatoire (OLR2 et IL-10) après stimulation avec respectivement du GM-CSF ou du M-CSF. VIP augmente l'expression génique d'OLR2 et d'IL-10 par les macrophages pro-inflammatoires polarisés par du GM-CSF. Cette étude démontre donc que VIP peut diminuer l'acquisition du phénotype pro-inflammatoire des macrophages dans un contexte inflammatoire (Carrión *et al.*, 2016).

Dans des cocultures de macrophages et de lymphocytes T stimulés avec des anticorps anti-CD3, VIP et PACAP induisent la prolifération de lymphocytes T en présence de macrophages péritonéaux au repos. En présence de LPS, VIP et PACAP diminuent l'expression de B7.1 et B7.2 à la surface des macrophages péritonéaux ainsi que la prolifération des lymphocytes T après stimulation avec des anticorps anti-CD3. L'activation de la voie de l'AC par la production de l'AMPc par le VPAC1 induit ces modifications. Les auteurs ont d'ailleurs émis l'hypothèse que VIP pourrait contribuer à la tolérance périphérique par l'anergie des lymphocytes T (Delgado *et al.*, 1999a; Ganea and Delgado, 2002). Après

stimulation par l'endotoxine (ou LPS), VIP inhibe l'expression de CXCL1/KC, de CXCL2/MIP-2, de CCL2/MCP-1, de CCL3/MIP-1α, de CCL4/MIP-1β et de CCL5/RANTES par des macrophages affectant le recrutement des polynucléaires, les macrophages et les lymphocytes (Delgado and Ganea, 2001; Pozo *et al.*, 2002).

De plus, VIP et PACAP inhibent la capacité de chimiotactisme des neutrophiles. En effet, VIP et PACAP (en se fixant sur PAC1) diminuent l'expression de molécules d'adhésion telles que l'*intercellular adhesion molecule-1* (ICAM-1), la VCAM-1 et le fibrinogène sur ces neutrophiles (Kinhult *et al.*, 2001, 2002; Martínez *et al.*, 2005).

Les chimiokines MIP-3β et 6Ckine (ligands de CCR7) induisent la capacité migratoire des cellules dendritiques matures *in vitro*. VIP inhibe cette capacité migratoire de façon dépendante de CCR7. Néanmoins, il peut agir comme un chimioattractant pour les cellules dendritiques immatures, n'exprimant pas ce récepteur (Dunzendorfer *et al.*, 2001).

### (b) La balance Th1/Th2

VIP et PACAP peuvent également moduler l'activité des lymphocytes T $CD4^+$. VIP inhibe la production d'IL-2 (nécessaire à la prolifération des Th1) et de l'IL-4 *via* l'activation de la voie de l'AMPc par les lymphocytes T $CD4^+$ stimulés par des mitogènes (comme la concanavaline A) ou activés par le TCR (anticorps anti-CD3 avec ou sans *Phorbol Myristate Acetate*) (Ganea and Sun, 1993; Sun and Ganea, 1993; Tang *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 2000; Ottaway, 1987; Tatsuno *et al.*, 1991b). Selon l'état de différenciation des lymphocytes *in vitro*, VIP augmente (Jabrane-Ferrat *et al.*, 1999), ne modifie pas (Sun and Ganea, 1993; Tang *et al.*, 1995) ou diminue (Muscettola and Grasso, 1990; Taylor *et al.*, 1994) la production d'IFN-γ. De plus, VIP favorise i*n vitro* la différenciation en lymphocytes Th2 (augmentation de la production d'IL-4), en défaveur du phénotype Th1. Cependant, VIP n'a pas d'effet sur la production en IL-4 lorsque les lymphocytes sont déjà différenciés (Delgado *et al.*, 1999f, 2002; Ganea *et al.*, 2003; Voice *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 1996). Les macrophages et les lymphocytes T stimulés favorisent cette différenciation par l'intermédiaire de l'expression de la molécule B7.2 (Delgado *et al.*, 1999f) et par l'augmentation de l'expression en facteur de transcription spécifiques des Th2 : JunB (nécessaire à la différenciation en Th2) et c-Maf (essentiel pour l'expression de l'IL-4) (Voice *et al.*, 2004). De plus, lorsque des macrophages sont pré-traités avec PACAP, ils polarisent la différenciation des lymphocytes T vers un phénotype Th2 avec une production augmentée d'IL-4 et d'IL-5 (Delgado *et al.*, 1999f).

VIP et PACAP ont donc des effets paracrines sur les cellules environnantes, mais ils ont aussi des effets autocrines. Comme expliqué ci-dessus, de façon paracrine, VIP et PACAP favorise la différenciation en lymphocytes Th2. Ces derniers vont produire de l'IL-4 et du VIP (Vassiliou *et al.*, 2001). La production de VIP favorise la différenciation des Th2 et leur survie, de façon autocrine (Delgado *et al.*, 2002; Voice *et al.*, 2001). Pour réguler cette augmentation, la production d'IL-4 observée inhibe la production de VIP par les macrophages et diminue l'expression de VPAC2 à la surface des lymphocytes Th2 (sans effet sur son expression sur les lymphocytes Th1) (Metwali *et al.*, 2000, 2002). Par un rétro-contrôle négatif, l'IL-4 aurait donc un rôle de régulateur dans la réponse immunitaire dirigée par VIP et les lymphocytes Th2 (Delgado *et al.*, 2002; Ganea *et al.*, 2003; Voice *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 1996).

De plus, les éosinophiles, les basophiles et les mastocytes vont faciliter la différenciation des lymphocytes en Th2 en présence de VIP ayant ainsi un rôle protecteur dans le cas d'infections par des helminthes *in vivo*. Néanmoins, cela peut conduire à des maladies allergiques chroniques *via* la production de cytokines telles que l'IL-4, l'IL-5, l'IL-9 et l'IL-13 (Sher and Coffman, 1992; Verma *et al.*, 2018).

Goetzl *et al*. ont démontré également que la surexpression du récepteur VPAC2 induit une différenciation préférentielle des lymphocytes naïfs en lymphocytes Th2 *in vivo* (Goetzl *et al.*, 2001). D'ailleurs, l'absence du récepteur VPAC2 induit une prédominance de la réponse Th1, indiquant l'implication de ce récepteur dans la différenciation des lymphocytes naïfs en faveur des Th2 (Voice *et al.*, 2003).

Au niveau des cellules immunitaires, le contrôle du trafic lymphocytaire est dépendant de l'expression de chimiokines, de celle de leurs récepteurs mais aussi de la régulation de cette expression en fonction de l'environnement. Le CXCL10/IP-10 et le CCL22/MDC sont produits par les cellules dendritiques issues de la moelle épinière (Delgado *et al.*, 2004c). Le CXCL10/IP-10 peut se fixer seulement à son récepteur CXCR3 qui est exprimé à la surface des Th1 alors que le MDC peut se fixer au CCR4 et au CCR8 exprimés par les Th2. La fixation de l'un ou l'autre sur leurs récepteurs respectifs induit alors la migration des Th1 ou des Th2 préférentiellement. VIP et PACAP diminuent *in vitro* et *in vivo* la production de IP-10 et augmentent celle de MDC, favorisant la migration des Th2 (Jiang *et al.*, 2002).

Ottaway a démontré que VIP induit de façon dose et temps dépendante une diminution de l'expression des récepteurs VPAC à la surface des lymphocytes T mésentériques. Des lymphocytes T, issus des ganglions mésentériques de souris naïves et incubés avec du VIP

radioactifs puis injectés à une souris naïve, sont incapables d'entrer dans les ganglions mésentériques et dans les plaques de Peyer de la souris receveuse. L'expression des récepteurs VPAC sur les lymphocytes T est donc essentielle à leur entrée dans ces tissus. Cependant, elle ne semble pas nécessaire pour leur entrée dans la circulation sanguine, la rate ou d'autres organes (Ottaway, 1984).

Plus tard, l'implication du récepteur VPAC2 dans cette capacité de migration a été confirmé grâce à différentes lignées de lymphocytes T issus de lymphomes (Xia *et al.*, 1996). La lignée cellulaire exprimant VPAC2 voit son activité migratoire augmentée avec une élévation de la sécrétion en MMP-9 et MMP-2 en présence d'IL-4 et de TNF-α. Les auteurs posent l'hypothèse qu'un ratio VPAC1/VPAC2 module le chimiotactisme en présence de VIP et qu'un ratio en faveur de VPAC1 serait responsable de la stabilisation des populations lymphocytaires T dans les organes lymphoïdes et les infiltrats tissulaires (Xia *et al.*, 1996).

### (c) Les lymphocytes Th17

Une autre population sensible à VIP et PACAP est la population lymphocytaire Th17. VIP et PACAP présentent des effets contradictoires en fonction de l'état de différenciation des lymphocytes Th17 étudiés. En présence du TGF-β, la fixation de VIP au récepteur VPAC1 de splénocytes active *in vitro* la voie de l'AMPc et facilite la différenciation en lymphocytes Th17 avec une augmentation de la production d'IL-17 (Yadav *et al.*, 2008). Dans une culture de lymphocytes Th17 différenciés humains, VIP permet le maintien de leur phénotype (facteurs de transcription spécifiques et signature cytokinique) et augmente leur taux de prolifération (Jimeno *et al.*, 2014). En présence de VIP, ce maintien phénotypique permet d'augmenter l'expression du récepteur VPAC1 pour inverser le ratio VPAC2/VPAC1 à la surface des lymphocytes $CD4^+$. De plus, l'utilisation d'un agoniste de VPAC1 permet d'augmenter les taux d'expression d'IL-17α, de RORC, de RORA et de STAT3 au sein de lymphocytes Th17 différenciés (Jimeno *et al.*, 2014).

Enfin, VIP et PACAP favorisent une réponse immunitaire de type Th17 après une présentation antigénique dans une culture de cellules de Langerhans épidermiques *in vitro* ou une stimulation épidermique *in vivo*. Cela induit une augmentation du taux d'expression de RORγT et une diminution de celle de T-bet en corrélation avec la baisse de la sécrétion d'IFN-γ (Ding *et al.*, 2012).

### (d) Les lymphocytes Treg

Les lymphocytes Treg sont capables d'inhiber l'activité effectrice des lymphocytes T. De nombreuses études ont donc disséqué l'ajout de VIP et de PACAP sur cette population. Delgado *et al.* ont démontré que l'administration de VIP à faible dose après une stimulation antigénique permet *in vitro* d'augmenter la proportion en Treg et leur activité suppressive vis-à-vis des lymphocytes T effecteurs (Delgado *et al.*, 2005a). Dans la même étude, le transfert de lymphocytes Treg, issus de souris ayant été traitées par VIP, permet de diminuer l'hypersensibilité de type retardée et de prévenir une réaction de greffe contre l'hôte après une greffe allogénique en maintenant l'activité suppressive de ces lymphocytes Treg *(Delgado et al.*, 2005a).

Enfin, les cellules dendritiques deviennent tolérogéniques lorsqu'elles sont stimulées par VIP ou PACAP *in vitro* et *in vivo* (Delgado *et al.*, 2005b), c'est-à-dire qu'ils permettent de produire des lymphocytes Treg fonctionnels avec une faible capacité de prolifération et produisant de l'IL-10.

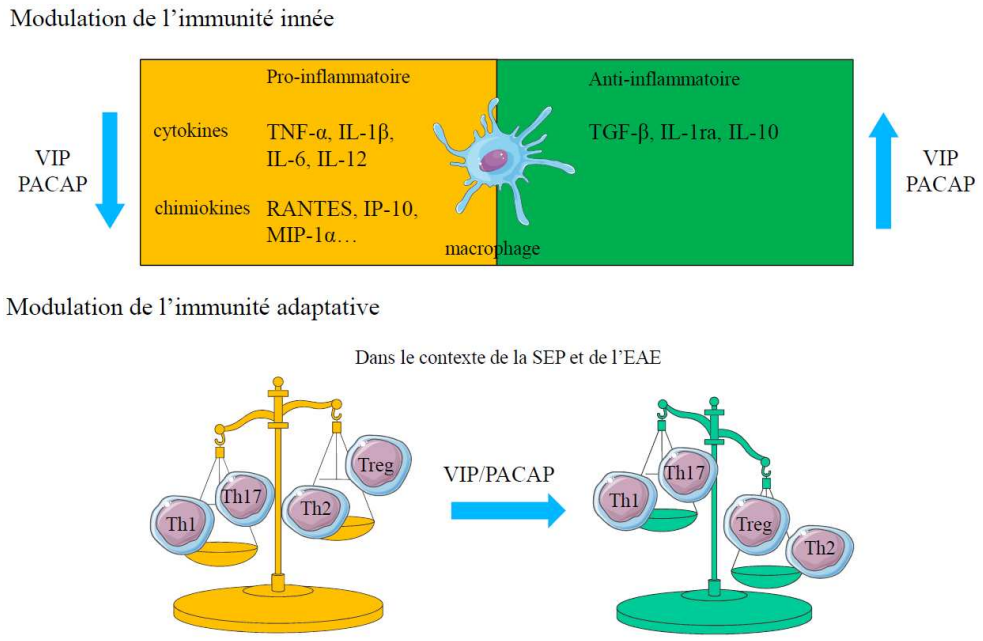



**Figure 11 : La modulation de la réponse immunitaire par VIP et PACAP**
VIP et PACAP diminue l'expression de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires et augmente celle de cytokines anti-inflammatoires par les macrophages. Dans le contexte de la SEP et de l'EAE, ces deux neuropeptides diminuent la différenciation des lymphocytes Th1 et Th17 en faveur des Th2 et Treg.
SEP : sclérose en plaques ; EAE : encéphalomyélite autoimmune expérimentale ; Th : lymphocyte Thelper ; Treg : lymphocyte T régulateur

## 3) Effets thérapeutiques de VIP et PACAP dans des modèles expérimentaux

### (a) L'endotoxémie induite par le LPS

Un choc septique (ou endotoxémie ou encore péritonite aigüe) est une réponse immunitaire systémique à une infection bactérienne. L'un des modèles expérimentaux le plus utilisé est l'administration intrapéritonéale (i.p.) d'une dose sublétale de LPS induisant une forte mortalité. Ce modèle est caractérisé par une massive infiltration de leucocytes dans les poumons et de l'intestin ainsi qu'une forte production de cytokines pro-inflammatoires (IFN-γ, TNF-α, IL-1β et IL-6) par les macrophages dans le sérum et le péritoine.

L'administration en i.p. de VIP diminue la létalité (Delgado *et al.*, 1999g, Delgado and Ganea, 2001) ainsi que l'infiltration des leucocytes dans les poumons et le tractus intestinal. De plus, VIP réduit la production du TNF-α et de l'IL-6 (Delgado *et al.*, 1999g) et des chimiokines de type CXC (MIP-2) et augmente celle des chimiokines CC (MIP-1α, MIP-1β, MCP-1 et RANTES) dans le sérum et le fluide provenant du péritoine (Delgado and Ganea, 2001). Ganea *et al*. ont démontré que VIP et PACAP agissent *via* le récepteur VPAC1 et induisent la diminution de l'activation de la voie du NFκB (Delgado and Ganea, 2001).

### (b) La polyarthrite rhumatoïde

La polyarthrite rhumatoïde est une maladie inflammatoire affectant les articulations. Le modèle murin de la polyarthrite rhumatoïde le plus utilisé est induit par une immunisation contre le collagène de type II administrée en s.c. Le développement de la maladie se traduit par une réponse immunitaire forte (production de facteurs pro-inflammatoires : TNF-α, IL-6, IL-12, IL-18, IL-1β, IL-1α et iNOS; et de chimiokines pro-inflammatoires : RANTES, MCP-1, MIP-1α, MIP-1β et MIP-2) contrôlée par les lymphocytes Th1 auto-réactifs contre le collagène.

Un traitement par VIP administré en i.p. diminue l'incidence et la gravité de la maladie avec une diminution des caractéristiques histologiques observées dans le groupe témoin (infiltration de cellules mononuclées dans la cavité articulaire et hyperplasie synoviale) (Delgado *et al.*, 2001). De plus, VIP diminue la prolifération de splénocytes issus de souris immunisées contre le collagène ainsi que la production en IFN-γ, en MMP-2 (ayant pour rôle l'élimination des protéoglycanes et du collagène au niveau des articulations) et d'autres

cytokines et chimiokines pro-inflammatoires mentionnées ci-dessus et augmente la production en IL-4, modifiant la balance Th1/Th2 en faveur des lymphocytes Th2.

Plus tard, Delgado *et al.* ont démontré que VIP induit un retard dans l'apparition de la maladie et une diminution de sa gravité en réduisant la population Th17 (diminution des taux en ARNm d'IL-17, RORγT et d'IL-22) et favorise la génération de Treg (Gonzalez-Rey *et al.*, 2006a). De plus, le transfert de lymphocytes Treg, issus de souris ayant reçu du VIP, diminue la gravité de la maladie (Gonzalez-Rey *et al.*, 2006a).

Le [$Lys^{15}$, $Arg^{16}$, $Leu^{27}$] VIP-(1-7)/GRF-(8-27)-NH2), le $Ro_{25-1553}$ et le maxalidane sont respectivement des agonistes des récepteurs VPAC1, VPAC2 et PAC1 (décrits plus tard dans la partie I.B.4). Leur utilisation a démontré que l'action de VIP est médiée par le récepteur VPAC1. Une thérapie génique à partir d'un lentivirus exprimant VIP permet, en une seule injection, la diminution de la gravité de la maladie avec une réduction de la production d'auto-anticorps et de la réponse immunitaire Th1 ainsi qu'une augmentation de la population Treg (Delgado *et al.*, 2008).

Enfin, Abad *et al*. ont montré l'effet thérapeutique de PACAP avec les mêmes caractéristiques que VIP dans le même modèle expérimental de la polyarthrite rhumatoïde (Abad *et al.*, 2001).

#### (c) La maladie de Crohn

La maladie de Crohn appartient à la famille des maladies inflammatoires de l'intestin regroupant les désordres d'origine autoimmune du colon. De nombreux facteurs génétiques, immunologiques, hormonaux et environnementaux sont impliqués dans le déclenchement de la maladie. Il s'agit d'une maladie autoimmune récurrente-rémittente granulomateuse pouvant affecter chacun des segments du tractus gastro-intestinal causant des lésions au niveau de la paroi des muqueuses du colon. Le modèle murin permettant d'étudier cette maladie est induit par une instillation intra-rectale d'acide sulfonique 2,4,6-trinitrobenzoïque (TNBS) provoquant des symptômes similaires à ceux observés chez l'Homme comme le développement d'une colite et une perte de poids. En parallèle des symptômes, une réponse immunitaire adaptative se développe avec l'augmentation de cytokines (TNF-α, IL-6, IL-1β, IL-12, IFN-γ) et de chimiokines (MCP-1, MIP-1α, MIP-1β et MIP-2) pro-inflammatoires. L'administration en i.p. de VIP chez des souris TNBS induit une diminution de la gravité de la maladie, une moindre perte de poids, une réduction des infiltrats de cellules immunitaires ainsi que des dommages tissulaires (Abad *et al.*, 2003).

Au niveau du colon, en se fixant sur le récepteur VPAC1, VIP diminue la production de cytokines et de chimiokines pro-inflammatoires caractéristiques de la maladie et augmente la production en IL-10 et IL-4, modifiant la balance Th1/Th2. En particulier, VIP diminue la production d'IL-12 et d'IL-18 (nécessaire à la différenciation des Th1) par les macrophages. De plus, chez ces souris, les cellules dendritiques au niveau des muqueuses présentent une augmentation de l'expression des récepteurs VPAC1 et VPAC2 dans les plaques de Peyer. VIP module le ratio Th17/Treg avec une diminution les taux en ARNm d'IL-23 (nécessaire à la différenciation en Th17) sur des cellules dendritiques et une augmentation de l'expression de FoxP3 et du TGF-β par les lymphocytes $CD4^+$ situés dans les ganglions mésentériques et d'IL-10 dans le colon des souris TNBS (Abad *et al.*, 2012).

### (d) L'EAE

L'EAE permet d'étudier les effets de VIP et PACAP sur le SI et le SNC. Au cours de l'EAE, PACAP retarde l'apparition et diminue la gravité de la maladie de façon dose-dépendante lorsqu'il est administré en i.p. un jour sur deux du jour 0 au jour 25 après l'immunisation contre la $MOG_{35-55}$ chez des souris C57BL/6. Une diminution de l'infiltration cellulaire est observée dans la moelle épinière au pic de la maladie (jour 23) (Kato *et al.*, 2004). PACAP diminue *in vitro* l'expression de B7.2 ainsi que la production de cytokines pro-inflammatoires (TNF-α, IL-1β et IL-12) par les macrophages et par la microglie et la production d'IFN-γ par lymphocytes provenant des souris traitées par PACAP. Les auteurs ont donc conclu que PACAP diminuait la gravité de l'EAE en inhibant les fonctions des CPA (Kato *et al.*, 2004).

Un traitement de 3 jours avec VIP diminue la gravité de la maladie au cours de l'EAE chronique induite chez des souris C57BL/6 et de l'EAE RR induite chez des souris SJL/J à partir d'une immunisation contre le peptide PLP (Gonzalez-Rey *et al.*, 2006b). Au pic de l'EAE RR, VIP diminue l'infiltration de cellules immunitaires avec une diminution de cytokines (TNF-α, IL-6, IL-12, IL-1β, IL-18 et IL-15) et de chimiokines (RANTES, IP-10, MCP-1, MIP-1α, MIP-1β, MIP-2, CCR-1, CCR-2 et CCR-5) pro-inflammatoires. VIP augmente également l'expression de cytokines anti-inflammatoires comme l'IL-10, l'IL-1Ra et le TGF-β. Cela aboutit à une diminution de la mort de oligodendrocytes et de la démyélinisation. A la périphérie, après stimulation *ex-vivo* contre le PLP, les lymphocytes issus de souris traitées par VIP prolifèrent moins que ceux issus des souris témoins. L'étude du profil lymphocytaire démontre que VIP diminue la proportion des lymphocytes Th1

produisant de l'IL-2, du TNF-α et de l'IFN-γ et augmente celle des lymphocytes Th2 produisant de l'IL-10, de l'IL-4 et de l'IL-5 (Gonzalez-Rey *et al.*, 2006b).

Afin de mieux appréhender l'action immunoprotectrice de ces deux neuropeptides endogènes dans le contexte de l'EAE, notre laboratoire a utilisé des souris déficientes pour les gènes codant pour VIP et pour PACAP.

Les expériences menées à partir de souris KO PACAP ont confirmé le rôle immunoprotecteur du PACAP endogène. En effet, après une immunisation contre la $MOG_{35-55}$, ces souris KO PACAP présentent une forme plus agressive de l'EAE comparées aux souris sauvages avec une augmentation de la démyélinisation et de l'infiltration de cellules immunitaires au niveau de la moelle épinière (Tan *et al.*, 2009). Au pic de la maladie, l'absence de PACAP endogène augmente l'expression de cytokines (TNF-α, IFN-γ et IL-17) et de chimiokines (ICAM-1, MCP-1, MIP-1α, RANTES, VCAM-1, CCR1, CCR2 et CCR5) pro-inflammatoires et diminue celle des cytokines anti-inflammatoires (IL-10, IL-4 et TGF-β) au niveau de la moelle épinière et des ganglions lymphatiques. Au cours de l'EAE, les souris KO PACAP présente donc une réponse Th1/Th17 favorisée et une réponse Th2 diminuée dans la moelle épinière et à la périphérie (c'est-à-dire en dehors du SNC). Par ailleurs, le nombre total et la prolifération des lymphocytes Treg diminuent chez les souris KO PACAP dans les ganglions lymphatiques, le thymus et le SNC durant l'EAE. Le défaut en Treg semble être dû à une diminution de l'expression de l'IL-7, qui est impliqué dans leur prolifération, dans le thymus (Tan *et al.*, 2013). Ces résultats mettent en lumière le rôle de PACAP comme modulateur de la balance de l'activité des lymphocytes Th1/Th2/Th17 et comme facteur endogène important dans l'expansion des lymphocytes Treg.

En revanche, les résultats obtenus chez les souris KO VIP montrent un phénotype opposé par rapport à celui des souris KO PACAP (Abad *et al.*, 2010). En effet, les souris KO VIP sont « résistantes » à l'EAE avec des symptômes retardés et moins sévères, accompagnés d'une infiltration cellulaire amoindrie au niveau de la moelle épinière par rapport aux souris sauvages. Les auteurs ont donc testé les deux phases d'induction de la maladie :

1) la phase d'immunisation au niveau du SI par une étude i*n vitro* montrant que des lymphocytes T KO VIP, issus de ganglions lymphatiques, répondent spécifiquement à l'antigène $MOG_{35-55}$ avec une capacité proliférative et une réponse inflammatoire augmentées (élévation de la production d'IFN-γ et d'IL-17). La phase d'immunisation est donc optimale avec des lymphocytes T KO VIP fonctionnels.

2) la phase effectrice au niveau du SNC par immunisation passive montrant que les lymphocytes T injectés issus de souris KO VIP préalablement immunisées contre la MOG sont capables d'induire l'EAE chez des souris sauvages.

L'hypothèse émise est que la résistance à l'EAE proviendrait vraisemblablement d'une altération de la phase effectrice de l'EAE qui implique l'entrée des lymphocytes T dans le SNC et les étapes consécutives d'amplification cellulaire (la réactivation des lymphocytes T par la microglie induisant la production de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires). Enfin, des expériences d'immunofluorescence montrent la présence de lymphocytes T $CD4^+$ au niveau des méninges mais pas au niveau du parenchyme du SNC. Ces expériences démontrent donc que le VIP endogène est un facteur permissif au cours de la phase effectrice de l'EAE (Abad *et al.*, 2010).

Suite aux études de l'implication des ligands VIP et PACAP dans la physiopathologie de l'EAE, les mécanismes impliqués ont été disséqués grâce à l'utilisation de souris déficientes pour VPAC1 (Abad *et al.*, 2016), VPAC2 (Tan *et al.*, 2015) et PAC1 (Van *et al.*, 2018).

De façon similaire aux souris KO PACAP (Tan *et al.,* 2009, 2013), les souris KO VPAC2 présentent une exacerbation des caractéristiques cliniques, histopathologiques et immunologiques de l'EAE par rapport aux souris sauvages. De plus, l'abondance et la prolifération des lymphocytes Tregs diminuent dans les organes lymphoïdes et le thymus des souris KO VPAC2 par rapport aux souris sauvages (Tan *et al.*, 2015). PACAP et le récepteur VPAC2 modulent ainsi l'homéostasie des lymphocytes Treg au niveau du thymus et des ganglions lymphatiques afin d'alléger la gravité de l'EAE.

Des résultats équivalents à ceux obtenus avec les souris KO VIP (Abad *et al.*, 2010) sont observés lorsque des souris KO VPAC1 sont immunisées contre la $MOG_{35-55}$. Ces souris sont résistantes à l'EAE avec une diminution de l'infiltration de cellules immunitaires et de l'expression de cytokines pro-inflammatoires dans le SNC (Abad *et al.*, 2016). Malgré une phase d'immunisation efficace, les souris déficientes pour VPAC1 ne semblent pas présenter de phase effectrice au cours de l'EAE. En effet, l'absence de VPAC1 induit une infiltration défaillante des cellules immunitaires au niveau du SNC (absence de cellules $CD3^+$ par immunofluorescence) (Abad *et al.*, 2016). Les travaux à partir des souris KO VIP et KO VPAC1 démontrent qu'au cours de l'EAE, VIP agit par l'intermédiaire du récepteur VPAC1.

Une autre étude a démontré que la déficience conditionnelle pour PAC1 dans les neurones catécholaminergiques au niveau du SNC provoque un retard dans l'apparition de

l'EAE mais une phase chronique exacerbée par rapport aux souris sauvages (Van *et al.*, 2018). Au pic de la maladie (11 à 12 jours post-immunisation), les souris PAC1 KO présentent une augmentation de la proportion en Th2 et une diminution de la proportion en Th17 dans la rate ainsi qu'une diminution de la production en IFN-γ (spécifique des lymphocytes Th1) dans les ganglions lymphatiques. Dans le thymus, la proportion en Treg est diminuée dans le groupe des souris conditionnelles par rapport au groupe témoin. Les auteurs ont conclu qu'aux premiers temps de la maladie, PAC1 améliore la polarisation des lymphocytes Th vers un état inflammatoire. Il permet ensuite d'atténuer la réponse inflammatoire par l'intervention des Treg. Néanmoins, la discordance des résultats observés avec ceux obtenus à partir de souris déficientes pour PACAP peut être expliquée par le fait que seuls les neurones sont déficients pour PACAP dans cette étude alors que ce dernier agit sur l'inflammation par l'intermédiaire de plusieurs récepteurs et types cellulaires au cours de l'EAE (Van *et al.*, 2018).

## E. Les Analogues

VIP et PACAP ont des effets pléiotropiques avec des activité anti-inflammatoire et neuroprotective. Ils apparaissent donc comme des cibles à haut potentiel thérapeutique. Dans cette optique, des analogues à visée thérapeutique ont été développés pour cibler les différents récepteurs de VIP et PACAP. Actuellement, peu de molécules sélectives (agonistes et antagonistes) pour les récepteurs ont été développés. Dans ce paragraphe, seuls ceux avec la meilleure efficacité seront décrits (Tableau 5).

L'agoniste le plus spécifique pour PAC1 est la maxalidane, isolé initialement à partir d'extrait de glandes salivaires de *Lutzomyia longipalpis* (Moro and Lerner, 1997). L'antagoniste M65 est l'antagoniste le plus spécifique de PAC1. Il s'agit d'un variant synthétique de la maxalidane délétée des acides aminés 25 à 41 (maxadilane Δ25-41).

[Ala$^{11, 22, 28}$]VIP (Nicole *et al.*, 2000) et [Lys$^{15}$, Arg$^{16}$, Leu$^{27}$] VIP-(1-7)/GRF-(8-27)-$NH_2$ (Gourlet *et al.*, 1997a, 1997b) sont des agonistes spécifiques de VPAC1. Le peptide [Ala$^{11, 22, 28}$]VIP a été obtenu par la combinaison de 3 mutations aux positions 11, 22 et 28 pour obtenir des alanines. Le second peptide [Lys$^{15}$, Arg$^{16}$, Leu$^{27}$]VIP-$(_{1-7})$/GRF-$(_{8-27})$-$NH_2$ est l'association des 7 premiers acides aminés de VIP et la séquence d'acides aminés de 8 à 27 de GRF, qui est capable de reconnaitre les récepteurs VPAC1 et VPAC2 et pour augmenter l'affinité du peptide pour VPAC1, 3 acides aminés aux positions 15, 16 et 27 ont été modifiés par respectivement la lysine, l'arginine et la leucine. L'antagoniste le plus spécifique de

VPAC1 est $PG_{97-269}$ (Gourlet *et al.*, 1997b), obtenu par l'introduction d'un résidu D-Phe en position 2 et une acétylation N-terminale du résidu histidine en position 1 du peptide [$Lys^{15}$,$Arg^{16}$,$Leu^{27}$] VIP-(1-7)/GRF-(8-27)-$NH_2$.

$Ro_{25-1392}$ et $BAY_{55-9837}$ sont des agonistes sélectifs de VPAC2 et de moindre affinité pour VPAC1. Le premier agoniste $Ro_{25-1392}$ ou Ac-$Glu_8$,$OCH_3$-$Tyr^{10}$,$Lys^{12}$,$Nle^{17}$,$Ala^{19}$,$Asp^{25}$,$Leu^{26}$,- $Lys^{27,28}$-VIP(cyclo 21–25) est un peptide cyclique rendant difficile sa production et donc sa disponibilité (Xia *et al.*, 1997). En revanche, $BAY_{55-9837}$ a été créé grâce à la mutagénèse dirigée et à partir des séquences peptidiques de VIP, de PACAP et de leurs analogues. Le peptide est linéaire permettant une production plus facile que celle de l'agoniste $Ro_{25-1392}$ (Tsutsumi *et al.*, 2002). Les antagonistes disponibles pour VPAC2 sont aussi des antagonistes pour le récepteur VPAC1.

| | Nom | Affinité | Unité | Nom | Affinité | Unité |
|---|---|---|---|---|---|---|
| VPAC1 | Agonistes Endogènes | | | Agonistes Exogènes | | |
| | VIP | 8,5-9,8 | pKi | [$Ala^{11,22,28}$]VIP | 8,1 | pKi |
| | | 7,9-10 | $pEC_{50}$ | | 7,6-10,2 | $pEC_{50}$ |
| | | 8,7-9,3 | $pIC_{50}$ | [$Lys^{15}$, $Arg^{16}$, $Leu^{27}$]VIP-(1-7)/GRF-(8-27)-$NH_2$ | 8,3 | $pEC_{50}$ |
| | $PACAP_{27}$ | 8,9 | pKi | | 7,7-9 | $pIC_{50}$ |
| | | 7,6-9,9 | $pEC_{50}$ | $PG_{99-465}$ | <5,5-8,1 | $pEC_{50}$ |
| | | 7,8-9 | $pIC_{50}$ | | 6,7 | $pIC_{50}$ |
| | $PACAP_{38}$ | 8,2 | pKi | N-stearyl-[$NIe^{17}$]VIP | 8,3-8,7 | $pIC_{50}$ |
| | | 7,4-9,7 | $pEC_{50}$ | | | |
| | Antagonistes Exogènes | | | | | |
| | $PG_{97-269}$ | 7,1-8,7 | $pIC_{50}$ | N-stearyl-[$NIe^{17}$]neurotensin-(6-11)/VIP-(7-28) | 7,5 | $pIC_{50}$ |

| | Nom | Affinité | Unité | Nom | Affinité | Unité |
|---|---|---|---|---|---|---|
| VPAC2 | Agonistes Endogènes | | | Agonistes Exogènes | | |
| | VIP | 7,8-8,8 | pKi | $Ro_{25-1392}$ | 8 | pKi |
| | | 7,3-9,3 | $pEC_{50}$ | | 8,5 | $pEC_{50}$ |
| | | 7,7-8,5 | $pIC_{50}$ | $BAY_{55-9837}$ | 9,4 | pKi |
| | $PACAP_{27}$ | 7,6-9,4 | $pEC_{50}$ | | 7,2 | $pIC_{50}$ |
| | | 7,6-8 | $pIC_{50}$ | $Ro_{25-1553}$ | 8,3-8,7 | $pEC_{50}$ |
| | $PACAP_{38}$ | 7,7-9,3 | $pEC_{50}$ | N-stearyl-[$NIe^{17}$]VIP | 9 | $pEC_{50}$ |
| | Antagonistes Exogènes | | | | | |
| | $PG_{97-465}$ | 8,7 | $pIC_{50}$ | N-stearyl-[$NIe^{17}$]neurotensin-(6-11)/VIP-(7-28) | 7,3 | $pIC_{50}$ |

| | Nom | Affinité | Unité | Nom | Affinité | Unité |
|---|---|---|---|---|---|---|
| PAC1 | Agonistes Endogènes | | | Agonistes Exogènes | | |
| | $PACAP_{27}$ | 6,9-8,8 | pKi | maxalidan | 6,2-10,3 | $pEC_{50}$ |
| | | 10,0-10,1 | $pEC_{50}$ | PG99-465 | 7,1 | $pEC_{50}$ |
| | | 7,6 | $pIC_{50}$ | Antagonistes Exogènes | | |
| | $PACAP_{38}$ | 6,9-9 | pKi | PACAP-(6-38) | 7,5-8,1 | pKi |
| | | 9,5-10,0 | $pEC_{50}$ | N-stearyl-[$NIe^{17}$]neurotensin-(6-11)/VIP-(7-28) | 7,2 | $pIC_{50}$ |
| | | | | M65 | 6,6-6,8 | $pIC_{50}$ |

**Tableau 5 : Les analogues des récepteurs de VIP et PACAP**

Ces tableaux résument les analogues (agonistes endogènes et exogènes et antagonistes exogènes) des récepteurs PAC1, VPAC1 et VPAC2 selon leur affinité.

Il existe donc des analogues peptidiques des récepteurs de VIP et PACAP. Même si leur efficacité a été démontré *in vitro* et *in vivo* dans des modèles expérimentaux, l'utilisation

de molécules peptidiques n'est cependant pas appropriée en thérapeutique à cause de leur susceptibilité aux protéases leur conférant une faible demi-vie au sein de l'organisme.

Afin d'augmenter leur potentiel thérapeutique, le criblage de banques permet donc de développer des molécules non peptidiques. Depuis la découverte de VIP et PACAP, seules quelques molécules non peptidiques antagonistes ont été développées.

La première étude sur un antagoniste non-peptidique date de 2008 (Beebe *et al.*, 2008). Les hydrazides sont des composés organiques possédant une liaison simple azote-azote avec 4 substituants dont l'un étant un groupe acyle provenant de la librairie de composés Abbott et sont des antagonistes pour PAC1.

D'autre part, Chu *et al.* ont identifié une molécule appelée « Compound 1 » grâce à un criblage à haut-débit en utilisant un test fonctionnel détectant l'activité de l'AC (production d'AMPc) par des cellules HEK293 (Chu *et al.*, 2010). Cette molécule est un antagoniste spécifique pour le récepteur VPAC2 humain. Il inhibe l'activation du récepteur en interagissant avec des résidus présents dans la région transmembranaire 7. Néanmoins, il est important de préciser que cette région n'est pas conservée entre l'Homme et la souris rendant inutilisable cette molécule en expérimentation animale.

Finalement, en 2012, Harikrishnan *et al.* ont réalisé un criblage à haut-débit à partir de la collection de composés de chez Bristol-Myers Squibb. Ils ont sélectionné et modifié deux séries de composés chimiques ayant pour caractéristiques d'être des antagonistes pour VPAC1 (Harikrishnan *et al.*, 2012). Au sein de trois lignées cellulaires (H727, H1299 et Calu6), ces composés induisent la production d'AMPc mais n'ont pas d'effet sur la prolifération cellulaire.

Le développement de molécules non peptidiques reste donc un enjeu majeur actuellement.

## Chapitre 4. Les orexines

Les orexines A et B ont été découvertes en 1998 par deux équipes indépendantes comme étant des ligands endogènes d'un récepteur orphelin, le HFGAN72.

La première équipe a utilisé une méthode de pharmacologie inversée pour identifier les ligands des récepteurs encore orphelins. Les auteurs ont nommé ces ligands "orexines", noms issus du grec *orexis* signifiant appétit parce que des injections de ces ligands

permettaient de réguler la prise alimentaire. En effet, leur première localisation est l'aire hypothalamique latérale connue comme le centre de l'alimentation (Sakurai *et al.*, 1998).

La deuxième équipe, quant à elle, a découvert les deux formes à partir d'ADN complémentaire isolé et exprimé sélectivement dans l'hypothalamus. Les deux peptides présentant de fortes homologies de séquence avec la famille de peptides ayant une activité hormonale/sécrétrice au niveau de l'intestin, ils ont décidé de nommer ces peptides hypocrétines (de Lecea *et al.*, 1998).

Les deux orexines sont produites à partir d'un même polypeptide précurseur, la pré-pro orexine (Figure 12). Leur production est permise grâce à des processus protéolytiques réalisés par des convertases prohormones. L'orexine A et B sont respectivement des peptides de 33 et 28 acides aminés et appartiennent à la grande famille des neuropeptides parce qu'elles sont produites par des neurones et possèdent des effets modulateurs (Inutsuka and Yamanaka, 2013).

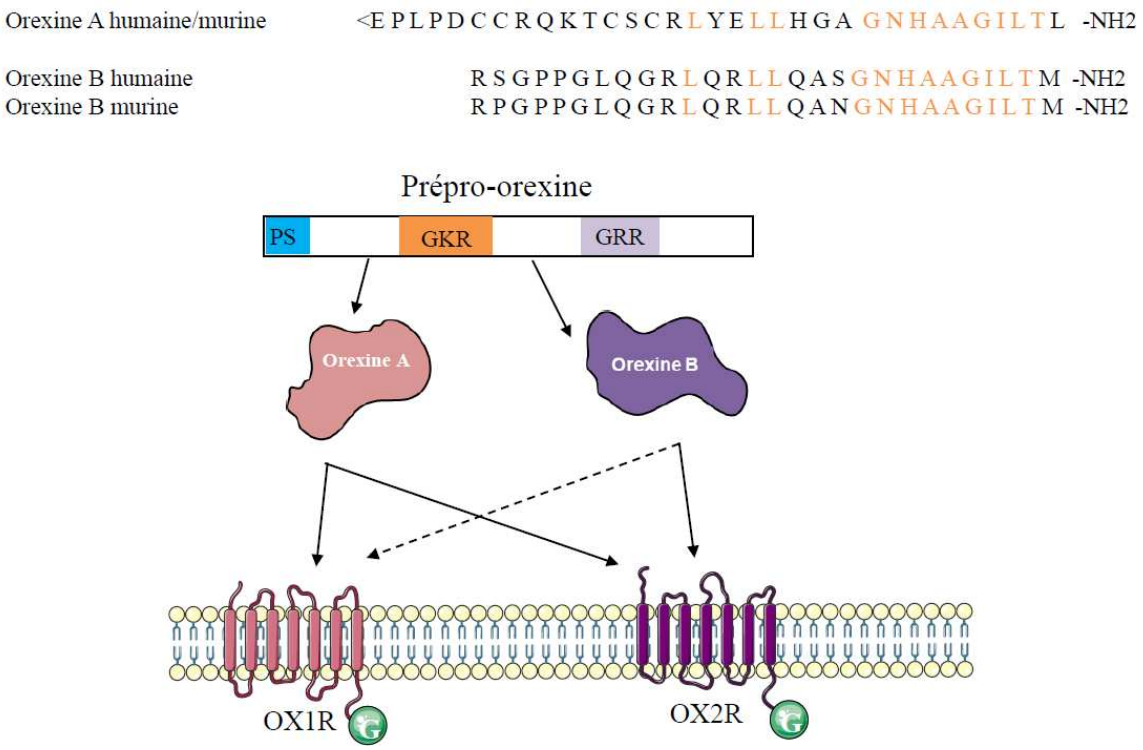



**Figure 12 : Les séquences peptidiques et récepteurs des orexines A et B**

Les séquences en acides nucléiques des deux orexines A et B (humaines et murines) sont représentées avec en orange les acides nucléiques identiques et en noir ceux qui différent entre deux formes de l'orexine. Les orexines A et B sont produits par le clivage d'un gène précurseur : la prépro-orexine au niveau des deux sites contenant des résidus d'acides aminés basiques GKR et GRR. L'orexine A peut se fixer sur les deux récepteurs de l'orexine 1 et 2 et l'orexine B se fixe uniquement sur le récepteur de l'orexine 2.

GKR et GRR : résidus d'acides aminés basiques ; OX1R : récepteur de l'orexine 1 ; OX2R : récepteur de l'orexine 2 ; PS : peptide signal

L'orexine B ne présente que 46% d'identité avec l'orexine A. Les neurones exprimant l'orexine sont exclusivement localisés au niveau du SNC, et plus précisément, dans l'aire périfornicale et les zones hypothalamiques postérieure et latérale. Ces neurones projettent dans tout le cerveau et au niveau de la périphérie.

### A. Les récepteurs

Comme mentionnée précédemment, en 1998, l'orexine A puis l'orexine B ont été caractérisés comme étant les ligands endogènes du récepteur HFGAN72, renommé par la suite le récepteur de l'orexine-1 ou OX1R (Inutsuka and Yamanaka, 2013). Puis le récepteur OX2R a été identifié grâce à l'utilisation de banque de données et par homologie avec OX1R. Ces deux récepteurs sont des RCPGs à sept domaines transmembranaires avec 64% d'identité. Entre les séquences chez l'Homme et chez le rat, les identités de séquence sont de 94 et 95% pour respectivement les récepteurs OX1R et OX2R. Enfin, l'orexine A se fixe sur les deux récepteurs, OX1R et OX2R, avec la même affinité. L'orexine B active plus sélectivement le récepteur OX2R par rapport au récepteur OX1R (Sakurai *et al.*, 1998).

### B. La distribution

Les récepteurs OX1R et l'OX2R sont largement distribués et complémentaires au niveau du SNC (Jöhren *et al.*, 2001; Tsujino and Sakurai, 2009).

L'OX1R est localisé dans le cortex préfrontal et intra-limbique, l'hippocampe, les amygdales, l'hypothalamus antérieur, la région tegmentale ventrale, le *locus coeruleus* et différents noyaux (du lit de la strie terminale, thalamique paraventriculaire, de raphé dorsal et tegmental latérodorsal).

L'OX2R est présent au niveau des amygdales, de différents noyaux (de la strie terminale, thalamique paraventriculaire, arqué de l'hypothalamus, du raphé dorsal, de la région tegmentale ventrale, tubéro-mamillaire, hypothalamique dorsolatéral et septal latéral) et du *cornu amonis* dans l'hypothalamus.

Outre le SNC, chez le rat, OX1R est exprimé au niveau des reins, des surrénales, de la thyroïde, des testicules, des ovaires et du jéjunum. L'OX2R est exprimé au niveau des glandes surrénales, des poumons et de l'hypophyse. Les deux récepteurs sont également localisés au niveau des glandes pituitaires et adrénales. Néanmoins, chez le rat, les récepteurs ne sont pas exprimés dans l'estomac, le duodénum, le pancréas, le foie, la rate, le cœur, l'aorte, le tissu

adipeux et les muscles. Enfin, il est possible que l'expression de ces récepteurs soit différentielle en fonction de l'état physiologique ou inflammatoire comme dans le foie (Yan *et al.*, 2005).

### C. Les voies de signalisation

La fixation de ligand au récepteur OX1R ou OX2R provoque l'activation de la PLC et de la cascade PI par la protéine Gαq aboutissant à l'activation de kinases telles qu'Akt (démontré dans des cellules embryonnaires humaines du rein HEK 293) (Sokołowska *et al.*, 2014). De plus, l'activation de PKC entraine une augmentation de calcium intracellulaire (Figure 17).

L'orexine A induit l'activation de l'AMPc, d'AC et de la PKA *via* la protéine Gαs des récepteurs OX1R et OX2R. Chez le rat, l'orexine A stimule la sécrétion de corticostérone par les cellules adénocorticales via l'activation de l'AC aboutissant à l'augmentation de la production en AMPc (démontré par l'utilisation d'un inhibiteur de la PKA) (Malendowicz *et al.*, 1999).

De plus, le récepteur OX2R est couplé à une protéine Gi. L'accumulation de l'AMPc est inhibé de façon dose dépendante par l'orexine alors qu'un pré-traitement à la TP annule cet effet. Cependant, l'OX1R semble ne pas être couplé à une protéine Gαi puisqu'il n'inhibe pas l'accumulation d'AMPc dans des cellules transfectées par OX1R. Une étude a également démontré que l'augmentation de la concentration en calcium intracellulaire induite par l'orexine dans les cellules exprimant OX1R et OX2R ne semble pas être modifiée par un pré-traitement à la TP.

### D. Les fonctions physiologiques

En corrélation avec la distribution ubiquitaire des récepteurs OX1R et OX2R, les orexines présentent des effets pléiotropiques (Figure 13). Les neurones produisant de l'orexine sont impliqués dans la détection de signaux environnementaux externes et internes à l'organisme ainsi que dans la régulation des états de sommeil et d'éveil. La déficience en orexine chez l'Homme et la souris est associée au développement de la narcolepsie (Thannickal *et al.*, 2000). De plus, les deux orexines semblent avoir des rôles dans la régulation des émotions, de l'homéostasie énergétique, de la récompense, de la toxicomanie et de l'excitation. D'autres études leur suggèrent un rôle modulateur avec des effets bénéfiques sur l'obésité, l'addiction, les douleurs et les troubles du sommeil (Tsujino and Sakurai, 2009).

L'effet connu de l'orexine sur la prise alimentaire a orienté les chercheurs sur ses activités potentielles au niveau de l'intestin. En effet, Kirchgessner *et al.* ont démontré par immunoréactivité la présence d'ARNm de la prépro-orexine et des récepteurs de l'orexine dans l'intestin grêle et d'ARNm de l'orexine dans le système nerveux entérique. L'orexine induit l'augmentation de la mobilité gastrique et un jeûne augmente la phosphorylation de CREB par les neurones produisant de l'orexine. Cette étude démontre donc le rôle de l'orexine dans la régulation de l'homéostasie énergétique (Kirchgessner and Liu, 1999). Dans le même sens, la privation de nourriture augmente la production en orexine dans le plasma. L'orexine ne semble pas avoir d'effet sur l'activité phagocytaire des macrophages péritonéaux (İzgüt-Uysal *et al.*, 2011).

Des études ont montré la capacité de l'orexine A à traverser la BHE par simple diffusion lorsque celle-ci est injectée par voie systémique. L'orexine B est, quant à elle, métabolisée dans la circulation sanguine, ne lui permettant pas d'atteindre le SNC (Kastin and Akerstrom, 1999; Ogawa *et al.*, 2016). Dans ce contexte, des études ont démontré que le système orexine possède des effets importants dans la neuroprotection ainsi que dans la modulation des réponses inflammatoires. Les aspects neuroprotecteurs et inflammatoires des orexines seront évoqués ci-dessous.

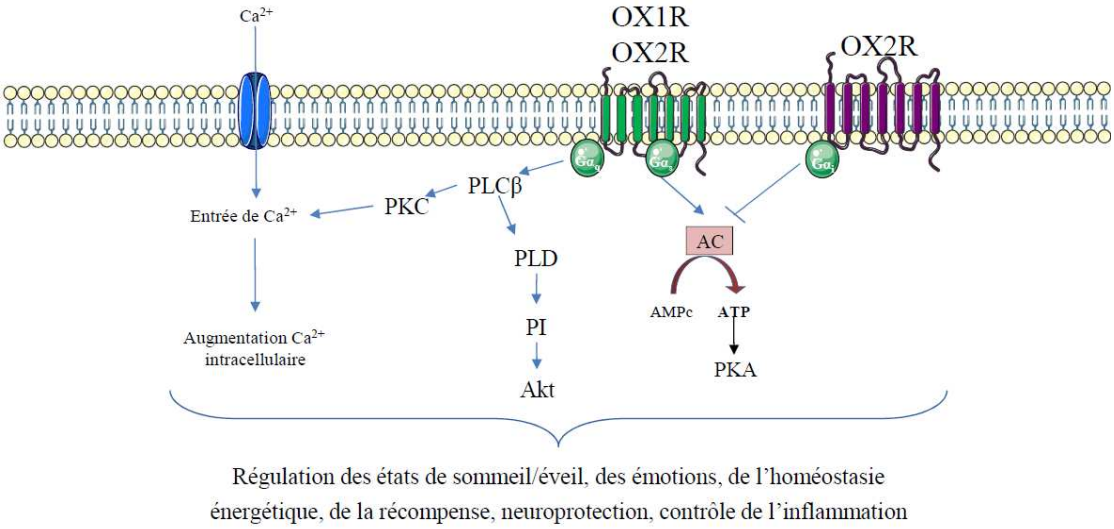



**Figure 13 : Les voies de signalisation des récepteurs OX1R et OX2R**

La fixation de l'orexine A ou B à leur récepteur induit l'activation de différentes voies de signalisation selon les protéines G impliquées telles que la voie de l'AC ou encore de la PLC. Cela aboutit à des effets pléiotropiques : régulation des états de sommeil et d'éveil, de l'homéostasie énergétique, neuroprotection ou encore contrôle de l'inflammation.

AC : adénylate cyclase ; AMPc : Adénosine monophosphate cyclique ; ATP : adénosine triphosphate ; Ca2+ : calcium 2+ ; OX1R : récepteur de l'orexine 1 ; OX2R : récepteur de l'orexine 2 ; PI : phosphatidylinositol ; PKA : protéine kinase A ; PKC : protéine kinase C ; PLC : phospholipase C

### 1) La neuroprotection

Une étude *in vitro* a démontré que les cellules microgliales BV2 produisent un fort taux de TNF-α à la suite d'une stimulation par le LPS. Dans les mêmes conditions expérimentales, l'orexine A permet de diminuer la production de cette cytokine pro-inflammatoire (Xiong *et al.*, 2013). L'orexine présente également un effet dans la survie neuronale. En culture cellulaire, l'hypoxie peut être induite par le chlorure de cobalt induisant la production d'espèces réactives de l'oxygène aboutissant à la mort cellulaire. Dans une culture de neurones corticaux de rat, l'orexine augmente la survie cellulaire de façon dose dépendante en diminuant le stress oxydatif par la phosphorylation d'Akt (Sokołowska *et al.*, 2014).

A la suite d'arrêt cardiaque, le risque de coma est augmenté. Dans un modèle murin d'arrêt cardiaque, les caractéristiques sont une diminution de l'excitation par ECG, une augmentation du score neurologique et, 4 heures après l'arrêt cardiaque, dans l'hippocampe, une augmentation des taux en ARNm de marqueurs neuroinflammatoires tels que l'IL-1β, le TNF-α, l'iNOS et le CD11b. Modi *et al*. ont démontré que l'administration intranasale de l'orexine A permet d'induire une excitation précoce par ECG ainsi qu'une diminution du score neurologique. De plus, ce traitement permet d'abaisser les taux en ARNm des marqueurs neuroinflammatoires (Modi *et al.*, 2017).

Par la suite, une étude a mis en avant chez l'Homme la diminution de la concentration en orexine A dans le sérum et le LCR d'un patient, 48 et 72 heures après un AVC. De plus, cette étude montre une corrélation inverse entre le volume de l'infarctus et la concentration de l'orexine A dans le LCR, suggérant de nouveau un rôle neuroprotecteur de l'orexine A (Kotan *et al.*, 2013).

### 2) L'inflammation

Lorsqu'une culture de cellules microgliales est soumise à de l'acide palmitique (mimant une nourriture riche), la mortalité cellulaire augmente par l'action du TNF-α. L'administration de l'orexine dans la culture cellulaire augmente la survie des cellules et diminue les taux en ARNm du TNF-α. De plus, l'orexine semble favoriser un phénotype anti-inflammatoire de type M2 (diminution d'iNOS et augmentation de l'arginase-1) (Duffy *et al.*, 2015). Les orexines A et B augmentent le taux en insuline dans le sang et l'orexine A augmente le taux de glucose *in vitro* dans une culture de cellules du pancréas et *in vivo* chez des rats Wistar (Nowak *et al.*, 2000). Récemment, dans un modèle de diabète de type 2

provoqué par l'administration de streptozotocine chez des rats Wistar, l'orexine A favorise la production de l'insuline après ingestion de glucose. De plus, l'orexine A permet de diminuer la mort par apoptose des cellules β pancréatiques dans les îlots pancréatiques et le taux plasmatique de TNF-α (Kaczmarek *et al.*, 2017).

### 3) Dans les modèles animaux

#### (a) L'ischémie cérébrale

L'implication de l'orexine dans la neuroprotection a été fortement étudiée grâce au modèle MCAO (décrit précédemment). En 2002, Irving *et al*. ont mis en évidence chez le rat, après une occlusion artérielle cérébrale, une augmentation significative de l'expression du récepteur OX1R, suggérant l'implication de l'orexine A dans les réponses physiologiques face à des conditions ischémiques (Irving *et al.*, 2002). Par la suite, l'augmentation de cette expression a été plus précisément détaillée. En effet, celle-ci est augmentée sur les neurones uniquement, de 4 à 24 heures après le MCAO. Après 48 heures, elle est observée sur les neurones, les astrocytes et les oligodendrocytes (Nakamachi *et al.*, 2005).

De plus, différentes études ont montré que l'administration de l'orexine A induit une diminution de l'infarctus avec une réduction du score neurologique dépendant du handicap induit par l'infarctus ainsi qu'une baisse du nombre de cellules apoptotiques par l'HIF-1α (Harada *et al.*, 2011; Kitamura *et al.*, 2010; Yuan *et al.*, 2011).

Par la suite, Xiong *et al.* ont souhaité explorer l'effet de l'orexine sur les réponses inflammatoires provoquées par un MCAO. Pour cela, ils ont induit un MCAO à des souris AT qui présentent une dégénéresence des neurones produisant de l'orexine au début de l'âge adulte. L'absence d'orexine A provoque une exacerbation de la zone de l'infarctus associée à l'augmentation de l'activation microgliale et des taux plus élevés en ARNm du TNF-α et de l'IL-6 (cytokines pro-inflammatoires). L'administration de l'orexine A par injection intracérébroventriculaire (icv.) avant le MCAO permet de réduire la taille de l'infarctus chez des souris sauvages et AT (Xiong *et al.*, 2013).

#### (b) L'ischémie gastrique

L'ischémie-reperfusion (IR) gastrique est souvent caractérisée par des lésions aigües des muqueuses gastriques et induite par des conditions de stress ou des maladies gastro-intestinales ischémiques. Les lésions gastriques induisent des formations excessives de métabolites réactifs de l'oxygène, l'activation des neutrophiles et des dysfonctionnements

microvasculaires. L'IR est induite par une occlusion artérielle à l'aide de clamps pouvant être effectuée à différents endroits de l'intestin pendant une durée déterminée (une heure en général) puis le retrait des clamps permet une reperfusion pour une durée précise (de 30 à 180 min). Ce modèle permet d'étudier les mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans la mise en place des lésions ainsi que dans la régénération tissulaire (Gubernatorova *et al.*, 2016).

L'effet de l'orexine A dans ce modèle chez le rat a été étudié par Bülbül *et al.* avec une ischémie de 30 minutes et une reperfusion d'une heure (Bülbül *et al.*, 2008). L'administration par perfusion de l'orexine A tout au long de l'expérimentation permet de diminuer les lésions gastriques induites par l'ischémie. De plus, le traitement permet de réduire l'activation des neutrophiles ainsi que la péroxydation des lipides. Cependant, il n'a pas d'effet sur la production du mucus ni de la prostaglandine E2, ayant habituellement un rôle protecteur en cas de dommages dans l'estomac. Les résultats démontrent donc un effet gastro-protecteur de l'orexine A au cours d'une IR.

#### (c) Le choc septique

Comme mentionné précédemment, un choc septique est une réponse immunitaire systémique à une infection bactérienne. D'après des études récentes réalisées *in vivo*, il a été mis en évidence que l'orexine A possède un rôle anti-inflammatoire dans le modèle murin de choc septique induit par le LPS. L'orexine A augmente le taux de survie, après un choc septique induit par le LPS. Cette hausse de la survie est induite par une diminution de la production en cytokines et en chimiokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1β, l'IL-6, le TNF-α et l'IFN-γ ou encore le MIP-1α, le MIP-1β et l'IP-10. De plus, l'orexine A restaure la température corporelle et la fréquence cardiaque qui sont modifiées à la suite de l'injection de LPS (Ogawa *et al.*, 2016).

#### (d) Dans l'EAE

Les orexines ont émergé comme étant de potentiels traitements contre la SEP par leurs capacités neuro-protectrices et anti-inflammatoires. Fatemi *et al.* ont réalisé deux études complémentaires démontrant que l'expression en ARNm des récepteurs OX1R et OX2R est augmentée dans la région hypothalamique du cerveau de souris, 21 jours après leur immunisation contre la MOG (Fatemi *et al.*, 2016a). De plus, au cours de l'EAE, ils ont étudié l'effet d'un traitement à long terme (deuxième jour après l'immunisation jusqu'au 21$^{ème}$ jour)

de l'orexine A en icv. Ce traitement par l'orexine A réduit la gravité de l'EAE avec une diminution des infiltrats cellulaires dans la moelle épinière associée à une augmentation des taux d'expression en ARNm du TGF-β et du MBP et une baisse d'iNOS, de MMP-9 et d'IL-12. L'implication de l'orexine A dans la modulation de l'EAE est confirmée par l'utilisation d'un antagoniste du récepteur OX1R (le SB.334867) qui induit une exacerbation de la gravité de la maladie (Fatemi *et al.*, 2016b).

## E. Les analogues

Comme mentionné précédemment, les récepteurs possèdent des ligands endogènes. L'OX1R peut lier spécifiquement l'orexine A alors que l'OX2R peut lier les deux ligands avec la même affinité. En plus des ligands endogènes, des agonistes et antagonistes peptidiques ou non pour ces récepteurs existent (Tableau 6).

Actuellement, le récepteur OX1R ne possède pas d'agonistes exogènes. L'OX2R possède un agoniste peptidique, le [Ala$^{11}$, D-Leu$^{15}$] orexine-B. De nombreux antagonistes existent, sélectifs ou non, pour l'un ou l'autre des deux récepteurs (Tableau 6). Parmi eux, le suvorexant est un antagoniste d'OX1R et d'OX2R qui est utilisé comme médicament contre l'insomnie (accepté par la FDA). Le SB.334867 est un antagoniste d'OX1R, qui est utilisé au cours de l'expérience de Fatemi *et al*.

| | OX1R | OX2R | |
|---|---|---|---|
| nom | affinité | | unité |
| Agonistes endogènes | | | |
| Orexine A | 6,5-10,2 | 6,5-10,0 | $pEC_{50}$ |
| Orexine B | 5,8-9,2 | 7,6 | $pEC_{50}$ |
| Agoniste exogènes | | | |
| [Ala$^{11}$, D-Leu$^{15}$] orexine B | 6,1-7,3 | 7,6-9,9 | $pEC_{50}$ |
| Antagonistes exogènes | | | |
| almorexant | 7,9 | 8,1 | $pIC^{50}$ |
| EMPA | | 9 | pKi |
| filorexant | 8,6 | 9,5 | pKi |
| lemborexant | 8,2 | 8,5 | pKi |
| SB-334867 | 7,4-7,5 | 5,2-6,3 | pKi |
| SB-408124 | 7,2-7,6 | 5,7-6 | pKi |
| SB-410220 | 7,7 | | pKi |
| SB-649868 | 9,1 | 8,9 | pKi |
| SB-674042 | 8,7-9,1 | 6,9 | pKi |
| suvorexant | 9,3 | 9,5 | pKi |

**Tableau 6 : Les analogues des récepteurs des orexines A et B**
Ce tableau résume les analogues (agonistes endogènes et exogènes et antagonistes exogènes) des récepteurs OX1R et OX2R selon leur nom, leur affinité ainsi que l'unité utilisée pour déterminer l'affinité.

# II. Objectif

## Objectifs

La SEP est une maladie autoimmune inflammatoire et neurodégénérative du SNC. A l'heure actuelle, les traitements contre la SEP peuvent ralentir la progression de la paralysie et diminuer la sévérité ainsi que l'incidence des symptômes en diminuant l'inflammation. En revanche, ils n'ont pas d'effets sur les formes progressives de la maladie au cours desquelles les processus neurodégénératifs s'amplifient et dominent les processus inflammatoires. Il est donc nécessaire de trouver de nouvelles thérapies qui pourront à la fois bloquer l'inflammation et promouvoir la remyélinisation et la neurorégénération.

L'objectif principal de ma thèse est d'établir la preuve de concept de l'efficacité thérapeutique de neuropeptides ou de leurs analogues dans des modèles expérimentaux de la SEP : i) l'EAE chronique pour étudier les processus inflammatoires et de démyélinisation mimant la forme progressive de la maladie et ii) le modèle toxique induit par la CPZ pour étudier les processus de démyélinisation et de remyélinisation sans l'intervention des lymphocytes T et correspondant à la phase tardive de la SEP.

Pour cela, nous allons :

- étudier les effets d'un agoniste du récepteur VPAC2, $BAY_{55\text{-}9837}$, sur les processus inflammatoires et de démyélinisation au cours de ces modèles ;
- étudier les effets de l'orexine A sur ces mêmes processus au cours de ces deux modèles.

# III. Méthodes

## Méthodes

Pour répondre à mon objectif de thèse, l'utilisation thérapeutique d'un agoniste du récepteur VPAC2, le $BAY_{55-9837}$, et de l'orexine A sera testée.

Leur efficacité sera évaluée au cours de l'EAE chronique. Après une immunisation contre la $MOG_{35-55}$, les souris femelles C57BL/6 ont été suivies quotidiennement selon un score clinique prédéfini (selon une échelle allant de 0 : pas de symptômes à 5 : état moribond/mort de l'animal et entre les deux différents degrés de paralysie). Lorsque les souris ont présenté un score clinique modéré (environ 1-1,5), elles ont été divisées en différents groupes selon le traitement administré en i.p. ou en rétro-orbital : groupe témoin recevant du PBS et groupe traité par le $BAY_{55-9837}$ (10 nmol/jour) ou par l'orexine A (100 ou 300 µg/jour) pendant 5 jours. Puis, les effets du traitement ont été étudiés :

- par le suivi du score clinique quotidiennement ;
- par cytométrie en flux avec l'étude des CPA, des cellules myéloïdes et des lymphocytes B, et l'étude des lymphocytes T $CD8^+$ et $CD4^+$ainsi que les Treg au niveau des ganglions drainants au pic et/ou durant la phase chronique de la maladie ;
- *ex-vivo* avec la capacité de prolifération après re-stimulation et de sécrétion de cytokines avec la $MOG_{35-55}$ ;
- par RT-MLPA avec les taux d'expression relative en ARNm de gènes impliqués dans l'inflammation spécifique de l'EAE dans la moelle épinière au pic et/ou durant la phase chronique de la maladie ;
- par histologie avec l'étude de l'infiltration des cellules immunitaires et par immunofluorescence avec l'étude des lymphocytes T $CD4^+$ dans la moelle épinière au cours de la phase chronique de la maladie ;
- par immunofluorescence avec l'étude de l'activation des cellules du SNC (astrocytes et macrophages/microglie) dans la moelle épinière durant la phase chronique de la maladie.

En parallèle, nous avons également étudié ces effets dans les processus de démyélinisation et de remyélinisation sans l'impact des lymphocytes T grâce au modèle toxique de la CPZ. Pour étudier l'effet de traitements sur les processus de démyélinisation, nous avons soumis des souris femelles C57BL/6 à un régime alimentaire supplémenté avec 0,2% de CPZ pendant cinq semaines. Six jours avant le sacrifice, les souris ont été divisées en

deux groupes : groupe témoin recevant du PBS et groupe traité par le $BAY_{55\text{-}9837}$ (10 nmol/jour) ou par l'orexine A (300 µg/jour) pendant six jours.

L'impact des traitements sur les processus de remyélinisation durant le modèle de la CPZ a également été étudié. Les souris ont été nourries avec 0,2% de CPZ durant cinq semaines puis la CPZ a été retirée de l'alimentation pendant une semaine et demie pour permettre la remyélinisation spontanée. Les souris ont été divisées en deux groupes : groupe témoin recevant du PBS et groupe traité par le $BAY_{55\text{-}9837}$ (10 nmol/jour) ou par l'orexine A (300 µg/jour) pendant 6 jours jusqu'au sacrifice.

Au cours des phases de démyélinisation et de remyélinisation du modèle de la CPZ, l'impact du traitement par l'agoniste de VPAC2 a été analysé au niveau des taux d'expression en ARNm intervenant au cours de ces processus : cytokines et chimiokines pro- et anti-inflammatoires ou encore d'autres médiateurs tels que TREM2 et MBP. De plus, la myéline, les astrocytes, les macrophages/microglie ainsi que les oligodendrocytes précurseurs (seulement dans le cadre de l'étude de l'agoniste de VPAC2) ont été étudiés par immunofluorescence au niveau du cerveau.

# IV. Résultats

## Chapitre 1. Les effets thérapeutiques d'un analogue du récepteur VPAC2

Dans cet article, nous avons évalué l'impact d'un agoniste de VPAC2, le $BAY_{55\text{-}9837}$, sur les composantes inflammatoire et neurodégénérative dans deux modèles murins : l'EAE, l'un des modèles animaux les plus utilisés pour la SEP, et le modèle toxique de la CPZ comme décrit dans la section « Objectifs ».

**$BAY_{55\text{-}9837}$, a VIP/PACAP receptor agonist, attenuates inflammation and demyelination in experimental model of multiple sclerosis**

Becquet L[1], Abad C[1], Jean L[1], Riou G[1], Waschek J[2], Boyer O[1,3], Tan YV[1]

[1]UNIROUEN, INSERM U1234, PANTHER, IRIB, Rouen-Normandie University, France.

[2]Department of Psychiatry, David Geffen School of Medicine, University of California at Los Angeles, California, United States of America

[3]Department of Immunology, Rouen University Hospital, Rouen Normandie University, INSERM, Rouen, France

***Corresponding Author:***

BECQUET Laurine

UNIROUEN, INSERM U1234 - PANTHER - IRIB

Université de Rouen Normandie - Faculté de Médecine et Pharmacie
Bâtiment Recherche - 3ème étage
22 Boulevard Gambetta, 76183 Rouen Cedex, France
E-mail: laurine.becquet76@gmail.com

Acknowledgements
This work was supported in part by Inserm Transfert, and co-supported by European Union and Région Normandie. Europe gets involved in Normandie with European Regional Development Fund (ERDF).

DRAFT VERSION

**Summary**

Multiple sclerosis (MS) is a chronic autoimmune and neurodegenerative disease of the central nervous system (CNS). Current immune-targeted drugs have benefits on the early phase of the disease but no effect on the neurodegenerative component of the progressive MS. It is then important to find new approaches, which will block inflammation but also promote neuroregeneration.

Fulfilling these criteria, two neuropeptides, Vasoactive Intestinal Peptide (VIP) and Polypeptide Adenylate Cyclase-Activated Polypeptide (PACAP), which have potent anti-inflammatory, and neuroprotective actions became relevant candidates. VPAC2 receptor is one of the three receptors of VIP and PACAP. After Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein (MOG) $_{35\text{-}55}$ immunization, VPAC2 knock-out (KO) mice exhibited exacerbated clinical score with drastic Thelper (Th)1/Th17 cell response and infiltration as well as demyelination in the CNS. Moreover, mutant mice presented regulatory T lymphocytes (Treg) deficiencies (*i.e.* proliferative rate and suppressive activity) in lymphoid tissues (*i.e.* lymph nodes and thymus) during Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE).

Thus, a VPAC2 agonist, $BAY_{55\text{-}9837}$, could alleviate EAE severity by inhibiting inflammation through Treg cells and potentially promotes regenerative processes. For this, two complementary models were used a chronic EAE model (mimicking the progressive MS) and the cuprizone (CPZ) model (featuring demyelination and remyelination during MS). The action of a curative and short-term treatment with $BAY_{55\text{-}9837}$ was analyzed through clinical and histopathological assessment, flow cytometry (T cell and APC profiles) and RT-MLPA (inflammatory gene expression) as well as *ex vivo* antigen recall (cytokine secretion) analyses.

We found that VPAC2 agonist decreases chronic EAE severity by limiting immune cell infiltration and demyelination in the CNS. This could be explain by a milder immunization phase: (1) reduction of the T cell activation and the antigen-presenting capacity of APC in draining lymph nodes, (2) modulation of the Treg population in draining lymph nodes and the thymus. These led during the chronic phase to diminished inflammatory responses. Moreover, in the CPZ model, the VPAC2 agonist decreases the impact of CPZ on demyelination and enhances the remyelination processes.

Overall, a VPAC2 agonist could be a potent therapeutic agent against MS and other inflammatory and neurodegenerative disorders.

DRAFT VERSION

**Keywords:** cuprizone, neuropeptide, neuro-immunomodulation, multiple sclerosis, EAE, neuroinflammation, VPAC2 agonist.

**Abbreviations**

**Arg-1:** arginase 1
**CFA:** complete Freund's adjuvant
**EAE:** experimental autoimmune encephalomyelitis
**GFAP:** glial fibrillary acidic protein
**Iba1:** ionized calcium-binding adapter molecule 1
**i.p.:** intraperitoneal
**KO:** knock-out
**LPS:** lipopolysaccharide
**MBP:** myelin basic protein
**MOG:** myelin oligodendrocyte glycoprotein
**MS:** multiple sclerosis
**OVA:** ovalbumin
**PACAP:** pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide
**Th:** T helper
**Treg:** regulatory T cells
**VIP:** vasoactive intestinal peptide

DRAFT VERSION

## Introduction

Multiple sclerosis (MS) is a chronic autoimmune disease of the central nervous system (CNS) frequently diagnosed in young adults and has an unknown etiology. In the world, more than 2.3 million persons have MS[1]. The disease appears between the ages 20 to 40 with a predominance for women. Eighty-five percent of MS patients have a relapsing/remitting form with a high implication of inflammatory system. Most of the time, the severity of the disease increases and leads to the secondary progressive MS where there is a major role of the neurodegenerative component. Current drugs have beneficial effects on the early phase of the disease (relapsing-remitting MS) due to their immunomodulatory activities but do not hamper its late phase (*i.e.* progressive MS). Therefore, it is necessary to find novel treatments with both immunomodulatory and neuroprotective actions in order to affect both phases.

In this context, two neuropeptides, Vasoactive Intestinal Peptide (VIP) and Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide (PACAP) due to their potent anti-inflammatory and neuroprotective activities demonstrated in different animal models such as collagen-induced rheumatoid arthritis[2,3], TNBS-induced colitis[4] and experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE)[5,6], the most used model of MS became good candidates.

VIP and PACAP are two pleiotropic neuropeptides involved in vasodilation, hormonal and exocrine secretions, muscle relaxation, embryonic development of the brain, regulating cell growth in the fetus, suppressing inflammation and neuroprotection. Their actions are mediated by three G protein-coupled receptors: PAC1, VPAC1 and VPAC2. PACAP is a ligand for the three receptors but VIP can bind only VPAC receptors. These receptors are mainly coupled with the protein $G_{\alpha s}$ that activate the adenylate cyclase and lead to the cAMP production and the protein kinase A activation. However, they can also activate protein kinase C, phospholipase C and D signaling pathways through $G_{\alpha i}$ and $G_{\alpha q}$ [7,8]. Different tissues in nervous and immune systems express VIP and PACAP receptors such as brain, spinal cord, spleen, lymph nodes and thymus. Moreover, nearly all immune cell types express one or more receptor subtypes. For instance, macrophages express constitutively VPAC1 and PAC1 receptors, and when exposed to an inflammatory stimulus, express VPAC2[8,9]. Resting $CD4^+$ T lymphocytes express constitutively VPAC1 and

DRAFT VERSION

upon anti-CD3/CD28 activation, the expression of VPAC1 is downregulated while VPAC2 expression is upregulated[9].

VIP and PACAP exert anti-inflammatory activities by acting on macrophages and T lymphocytes. For example, they inhibited the lipopolysaccharide (LPS)-induced production of TNF-α, IL-6 and several chemokines such as CXCL10 by macrophages [10–12]. They also present dual effect on immature and mature dendritic cells. In immature dendritic cells, they upregulate CD86 expression and allow the activation, proliferation of T lymphocytes in favor of T helper (Th)2. In contrast, in LPS-stimulated dendritic cells, they downregulate CD80/CD86 expression, and decrease T cell proliferation and reduce the secretion of Th1 and Th2 cytokines[13].

Recently, our team demonstrated that after Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein $(MOG)_{35\text{-}55}$ immunization, VPAC2 knock-out (KO) mice exhibited an exacerbated EAE with higher immune cell infiltration and demyelination in CNS compared to wild-type mice[14]. Moreover, in VPAC2 KO mice, we observed an increase of pro-inflammatory cytokine levels (*i.e.* IFN-γ for T helper cells (Th) 1 and IL-17 for Th17) and a decrease of anti-inflammatory cytokine levels (such as IL-4 for Th2). In parallel, the abundance and proliferative rate of regulatory T cells (Treg) were strongly reduced in lymph nodes and thymus from mutant mice. In addition, the *in vitro* suppressive activity of the Treg was impaired. In conclusion, VPAC2 presents a protective role against autoimmunity by regulating Th/Treg population homeostasis.

Following these results, we investigated the effect of a curative VPAC2 agonist, $BAY_{55\text{-}9837}$, administration during an ongoing chronic MOG-induced EAE and demyelination and remyelination phases during cuprizone (CPZ) model in C57BL/6 mice. We studied the impact on the clinical development and the effects of this treatment on inflammatory and demyelination processes that underlie the pathogenesis of EAE and CPZ models.

## Methods

### Mice

Animal experimentation guidelines dictated by the ethical committee for animal experimentation, CENOMEXA N°54 and by the French ministry (Ministère de l'Education Nationale, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche) were followed (agreement number B7645005). Eight to ten-week old female C57BL/6Rj mice were obtained from Janvier Labs.

DRAFT VERSION

Experimental design for the EAE model

EAE was induced by subcutaneous immunization in the flanks with 100 µg of $MOG_{35-55}$ (GL Biochem, Shangai, Chine) in complete Freund's adjuvant (CFA) containing 5 mg/mL of Mycobacterium tuberculosis H37Ra (Difco, FisherScientific, New Hamphire, USA). In addition, mice received intraperitoneally (i.p.) 300 ng of pertussis toxin (Servibio, List Laboratories, California, USA) on days 0 and 2 post-immunization. From day 0, mice were scored daily from 0 to 5 following the scale: 0- no symptoms; 1- tail limpness; 2- hind limb weakness; 3- hind limb paralysis; 4- complete hind limb paralysis with forelimb weakness or paralysis; 5- moribund state or death.

When mice reached a moderate score (1-1.5), they were divided in two group of 12 mice. The control group was injected i.p. with 200 µL of phosphate buffered saline (PBS, group CT) and the second group with 10 nmol of $BAY_{55-9837}$, solubilized in 200 µL (group V2, $BAY_{55-9837}$ sequence: HSDAVFTDNYTRLRKQVAAKKYLQSIKNKRY, peptide synthetized by GL Biochem, Shanghai, Chine) for five constitutive days. Mice were sacrificed on day 15 (peak of the disease) or on day 21 (chronic phase) post-immunization.

Experimental design for the cuprizone model

Demyelination was induced by feeding eight week old female C57BL/6Rj mice a diet containing 0.2% cuprizone (bis-cyclohexanone oxaldihydrazone; Sigma-Aldrich) in powdered standard rodent chow during seven weeks[15]. Stopping supplementation with cuprizone allowed complete spontaneous remyelination after three weeks.

To assess the effect of a VPAC2 agonist during the demyelination phase, mice were given the CPZ-containing diet for seven weeks. During the last six days, mice received everyday either PBS or 10 nmol of $BAY_{55-9837}$ and were divided in two groups: the PBS-treated CPZ intoxication group (PBS group) and the VPAC2 agonist-treated CPZ intoxication group (V2 group).

In parallel, to assess the effect of a VPAC2 agonist during the remyelination phase, mice were fed the CPZ-containing diet for 7 weeks followed by a diet without CPZ during one week and half. As before, six days before the sacrifice, mice were divided in two groups: the PBS-treated CPZ intoxication group (PBS group) and the VPAC2 agonist-treated CPZ intoxication group (V2 group). In addition, as the normal control group (Naive), mice were given the standard rodent diet for 7 weeks.

DRAFT VERSION

Histopathology

For EAE model, spinal cords were collected 21 days after immunization. They were fixed in 4% paraformaldehyde (PFA) and preserved in 20% sucrose before OCT embedding. Then they were stored at -80°C.

For histological studies, cryostat 7-µm sections were stained with hematoxylin-eosin and luxol fast blue and histopathological score was assessed. The level of immune cell infiltration and demyelination was scored from 0 to 4 following the scale: 0- normal appearance; 1- some infiltrated cells with low demyelination; 2- some cell infiltration areas with low/mild demyelination, 3- many infiltration areas with demyelination; 4- increasing severity of perivascular cuffing with extension into adjacent tissue, large areas of demyelination. Stained spinal cord sections were photographed under and x10 (Axio Vert microscope, Zeiss) and image acquisition was performed with Zen 2 lite software.

Immunofluorescence analysis

In EAE model, cryostat 7-µm sections of spinal cords were incubated with primary monoclonal rat anti- myelin basic protein (MBP) (clone 12, 1:1000, Millipore, Massachusetts, USA) antibody, or rat anti-CD4 (1:500, BD Biosciences, San Jose, USA), or rat anti-GFAP antibody (clone 2.2B10, 1:1000, Thermofisher scientific, Massachusetts, USA), or rabbit anti- ionized calcium-binding adapter molecule 1 (Iba-1) antibody (1:1000, Sobioda, Montbonnot-Saint-Martin, France) overnight at 4°C.

In CPZ model, brains were removed, cut in half along the midline, and fixed overnight in 4% of PFA and preserved in 20% sucrose before OCT embedding. Then, they were stored at -80°C. Cryostat 7-µm sections of spinal cords were incubated with primary monoclonal rat anti-MBP (clone 12, 1:1000, Millipore, Massachusetts, USA) antibody or anti-NG2 antibody (AB5320, 1:500, Millipore) overnight at 4°C.

Then, in both EAE and CPZ model, sections were incubated with Alexa Fluor 488 or Cy.3-conjugated secondary antibody (1:400, Jackson, West Grove, USA) for 45 min at room temperature. Slides were mounted using VECTASHIELD with DAPI (Clinisciences, Nanterre, France). Spinal cord sections were randomly selected and images were photographed under x20 magnification with Apotome microscope (Zeiss) and Zen pro2012 software. Images were analyzed using ImageJ.

In EAE model, cell number for CD4 immunostaining was performed. Quantification of MBP, GFAP and Iba-1 immunofluorescence pixel density was performed and the

DRAFT VERSION

percentage marker area means percentage of positive pixels for the marker relative to total spinal cord.

In CPZ model, we measured the percentage of MBP and NG2 staining area in two brain zones that were found to be highly demyelinated in this model, the white substance of the corpus callosum and the cerebellum. The mean of demyelination and $NG2^+$ area percentage between these two areas is shown.

Antigen recall assays

In EAE model, lymph nodes were collected 15 days after immunization. Cell suspensions were prepared by shredding organs through a 40 µm mesh. Cells were cultured at 1 x $10^6$ cells/mL in complete medium (RPMI 1640 containing 25mM HEPES, 2 mM L-glutamine, 1% penicillin/streptomycin and 2% FBS) with 10 µg/mL ovalbumin (OVA) or $MOG_{35-55}$ for 48h. Cytokines (IFN-γ, IL-17 and IL-10) were measured by ELISA kits (Invitrogen, eBioscience IFN gamma, IL-17 and IL-10 ELISA Ready-SET-Go kit, Thermofisher scientific, Massachusetts, USA) following the manufacturer's protocol.

Flow cytometry

In EAE model, 21 days post-immunization, thymus and draining axillary lymph nodes were harvested and cell suspensions were obtained by shredding the organs through a 40 µm mesh.

For T cell activation and Treg analysis, cells from thymus and lymph nodes were incubated for 20 min with APC-Cy7-anti-CD4 (RM4-5), BV605-anti-CD8 (53-6.7), BV421-anti-CD69 (H1.2F3, Sony, San Jose, USA), and PE-anti-CD25 (PC61, BD Biosciences, San Jose, USA). Then, cells were treated with fixation/permeabilization buffer (eBioscience, Thermofisher scientific, Massachusetts, USA) overnight, and incubated with APC-anti-FoxP3 (JFK-16s, eBioscience, Thermofisher scientific, Massachusetts, USA) and FITC-anti-Ki67 (B56, Sony, San Jose, USA) during 1 hour.

For myeloid cell analysis, cells from lymph nodes were incubated 30 min with Alexa700-anti-CD11b (M1/70, eBioscience, Thermofisher scientific, Massachusetts, USA), APC-anti-CD11c (N418), APC-Cy7-anti-CD3 (145-2C11), PE-Cy7-anti-CD86 and PE-anti-B220 (RA3-6B2, BD Biosciences, San Jose, USA). Then cells were treated with 1-step Fix/Lyse solution (eBioscience, Thermofisher scientific, Massachusetts, USA) during 30 min.

Samples were acquired with a LSRFortessa cytometer (BD Biosciences, San Jose, USA) and analyzed using FlowJo software.

DRAFT VERSION

RNA extraction and Retro-transcription (RT) reaction

RNA was extracted with Trizol (Sigma, Saint-Louis, USA) from spinal cords at day 15 and 21 post-immunization. Then 10µg of ARN was treated with Dnase I following manufacturer's protocol (Invitrogen, Carlsbad, USA).

RT-multiplex ligation-dependent probe amplification (RT-MLPA) Probes and oligonucleotides

RT-MLPA probes, short synthetic oligonucleotides (Eurofins Genomics, Ebersberg, Germany) used are listed in Tables 1 and 2. For one gene of interest (Supplementary Figure 1), two probes were designed to be contiguous and across exon-exon boundaries to avoid genomic DNA amplification. They were structured as follow: a gene-specific region complementary to cDNA of interest, a common tail to allow the final PCR amplification. All 5' probes had a common tail at their 5' end and all 3' probes had another common tail at their 3' end (the complementary of Illu2. Additional spacers (TAC repeats) were inserted between the tail and the specific region to distinguish every PCR products with their length. Moreover, 3' probes were produced with a phosphorylated 5' end to allow the ligation between two complementary probes. For the housekeeping gene (HPRT), a competitor oligonucleotide was designed to normalize the amplification signal (see table).

5'- and 3' probe mix (RT-MLPA probe mix) was prepared with a 2 fmol/µL final concentration for each probe in 1mL TE10.1.

RT-MLPA experiment

The RT-MLPA protocol was adapted from Mareschal et al.[16]. Modifications from the initial protocol were: i) use of iScript Reverse transcription supermix (Bio-rad, Hercules, USA) for the reverse transcription reaction and ii) use of Q5 High-Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs, Massachusetts, USA) for the final PCR amplification. Briefly, DNase-treated RNA was retro-transcribed into complementary DNA with iScript Reverse transcription supermix (Bio-rad, Hercules, USA) following manufacturer's protocol. Then, 250 ng of cDNA was mixed with RT-MLPA probe mix (depending on the experiment) and SALSA-MLPA Buffer (MRC Holland, Amsterdam, the Netherlands). The samples were heated at 95°C during 2 minutes and incubated at 60°C during 1 hour for probe hybridation on their cDNA targets. To allow ligation between complementary probes, a mix with Ligase buffers (A and B) and Ligase 65 (MRC Holland, Amsterdam, the Netherlands) was added into the samples and was incubated 15 minutes at 54°C. Then the samples were heated at 98°C during 5

DRAFT VERSION

minutes to inactivate the Ligase. Next, final PCR amplification was assessed with the Q5 High-Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs, Massachusetts, USA) following the manufacturer's protocol and the Illu1 and FAM-labeled Illu2 primers. The amplification program was: initial denaturation during 6 min at 94°C, 35 cycles of: 94°C for 30 sec followed by 58°C for 30 sec and 72°C for 30 sec and final elongation during 4 min at 72°C. To finish, a mix with formamide and GeneScan400HD ROX dye Size Standard (Thermofisher scientific, Massachusetts, USA) was added to each PCR product and was denatured at 95°C during 2 min. Then samples were loaded onto ABI3130 capillary electrophoresis analyzer in GeneScan mode to measure FAM fluorescence intensity. The migration settings were: Pre Run Voltage 15kV; Pre Run Time 18 seconds; Injection Voltage 1kV; Injection Time 4 seconds, Run Voltage 10kV; Run Time 900 seconds.

RT-MLPA Data analysis

Files were charged in the interfaced software: http://bioinfo.calym.org/RTMLPA/ and all expression values were obtained and were divided by the mean of all genes (to avoid RNA quantity bias) and by housekeeping gene (HPRT) to homogenize results.

Statistical analyses

Nonparametric test (with Mann-Whitney post-test) were used to assess significance using Prism GraphPad. Significance threshold was determined at $p<0.05$. Results were represented with the mean ± SEM.

## Results

### Five day-treated with VPAC2 agonist significantly decreases EAE severity and histopathological EAE score.

According to the literature and following the results obtained with the use of VPAC2 deficient mice in EAE experiment, our team hypothesized that a treatment with an agonist ($BAY_{55-9837}$) may exhibit potential therapeutic actions in EAE model. To test it, we induced EAE in 9-week-old female C57BL/6 mice. After immunization, the clinical score was assessed blinded daily following the scale described in the "Methods" section. When mice reached a moderate score (=1-1.5), they received i.p. either PBS (PBS group) or VPAC2 agonist (V2 group, 10 nmol/200 µL) during 5 days. We observed that the treatment with VPAC2 agonist significantly decreased the severity of the disease illustrated by lower mean and maximal scores (Figure 1A). 21 days post-immunization, we observed less infiltration of immune cells and less



DRAFT VERSION

Figure 1

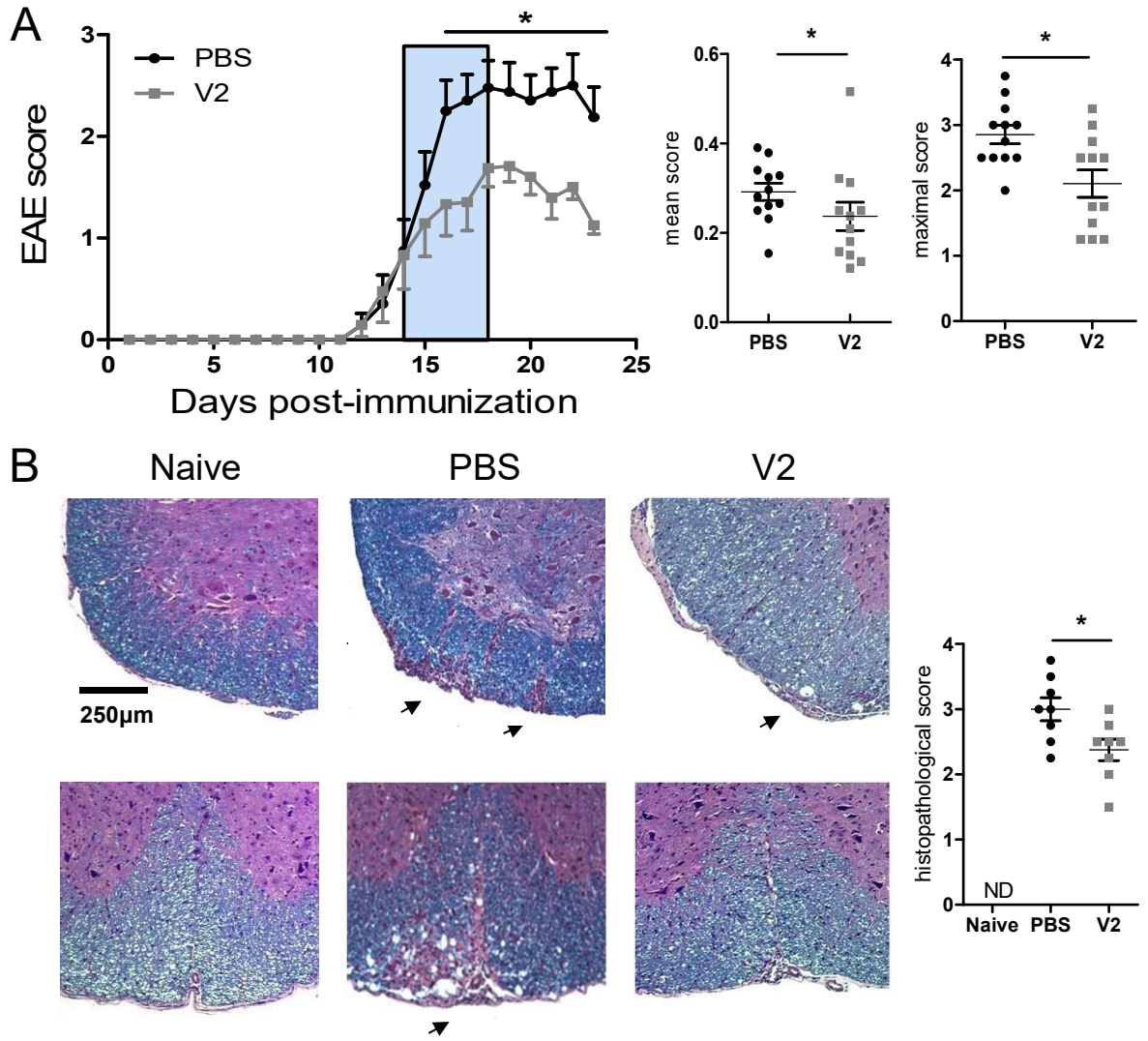



**Figure 1: VPAC2 agonist decreases EAE severity and immune cell infiltration in CNS after MOG immunization.** Female C57BL/6 9 week old mice (n=12/group) were immunized with a mix of 100 µg of $MOG_{35-55}$ and CFA containing 5 mg/mL of M. tuberculosis on day 0. 250 ng of pertussis toxin were injected on days 0 and 2. Then, 10 nmol/day/mouse of $BAY_{55-9837}$ (V2 group) or PBS (PBS group) were injected starting at a moderated EAE score (=1-1.5) during 5 days. EAE symptoms were scored daily on a scale of 0-5. Panel **(A)**: The clinical curve; the mean of cumulative score (divided by the number of days since mice were sick) and of the maximal score was shown as mean +/- SEM. On day 21 after MOG-immunization, spinal cords were harvested and included in paraffin. Then, spinal cords were cut and stained in hematoxylin/eosin (for infiltrated cells) and luxol fast blue (for myelin). Panel **(B)**: pictures (zoom x10) illustrate spinal cord sections of naive (left), PBS (middle), V2 (right)-treated mice. The scatter plot shows the mean of histological score. All plots represent the mean +/- SEM of 8 individual mice.*P<0.05 (*Mann-Whitney test*, *vs.* PBS group).

demyelination in spinal cord sections from V2-treated-mice compared to PBS-treated mice by hematoxylin/eosin (cell infiltration) and luxol fast blue (myelin) (Figure 1B). Thus, in correlation with the clinical EAE score, V2-treated mice show a significant decrease of the histopathological score (Figure 1B).

**VPAC2 agonist treatment modulates the proportion of activated lymphocytes in draining lymph nodes during EAE.**

To determine the effect of VPAC2 agonist on $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells during the EAE, we collected draining lymph nodes on day 15 (peak) and day 21 (chronic) post-immunization. Cells were prepared for flow cytometry analysis and stained with anti-CD4, anti-CD8, anti-CD69 (for very early activation marker) and anti-CD25 (early activation marker) antibodies. At the peak of the disease (day 15), the total cell number and the proportion of $CD8^+$ and $CD4^+$ are similar for PBS and V2-treated mice. Regarding the proportion of activated T cells in VPAC2-treated mice, both $CD8^+$ and $CD4^+$ populations have an higher percentage of $CD25^-CD69^+$ and $CD25^+CD69^+$ cells (Figure 2A). On day 21 post-immunization, the total cell number tends to increase in draining lymph nodes from V2-treated mice compared to control mice without any difference for the percentage of $CD8^+$ and $CD4^+$. A significant decrease of the percentage of $CD4^+CD25^-CD69^+$ and a trend of decrease $CD4^+CD25^+CD69^-$ percentage were observed in V2 group compared to PBS group (Figure 2B). These results showed that VPAC2 agonist influences $CD4^+$ and $CD8^+$ lymphocyte subpopulations by regulating activation markers such as CD69 and CD25 during the peak and the chronic phases of EAE.

**VPAC2 agonist treatment modulates the activity of antigen-presenting cells.**

In addition of lymphocyte activation, the activity of antigen-presenting cells is primordial during EAE. We harvested draining lymph nodes on day 21 post-immunization. Cells were prepared for flow cytometry analysis and stained with anti-B220 (for B cells), anti-CD11c (for dendritic cells), anti-CD11b (for monocytes) and anti-CD86 (as co-stimulatory molecule) antibodies. We observed a significant increase of dendritic cell ($CD11c^+$) population in V2-treated mice compared to PBS-treated mice (Figure 3A, D). Interestingly, VPAC2 agonist treatment decreased significantly the percentage of $CD86^+$ cells in $CD11c^+$ and $CD11b^+$ populations (Figure 3B-C, E). In conclusion, VPAC2 agonist seems to favor the generation of

DRAFT VERSION

Figure 2

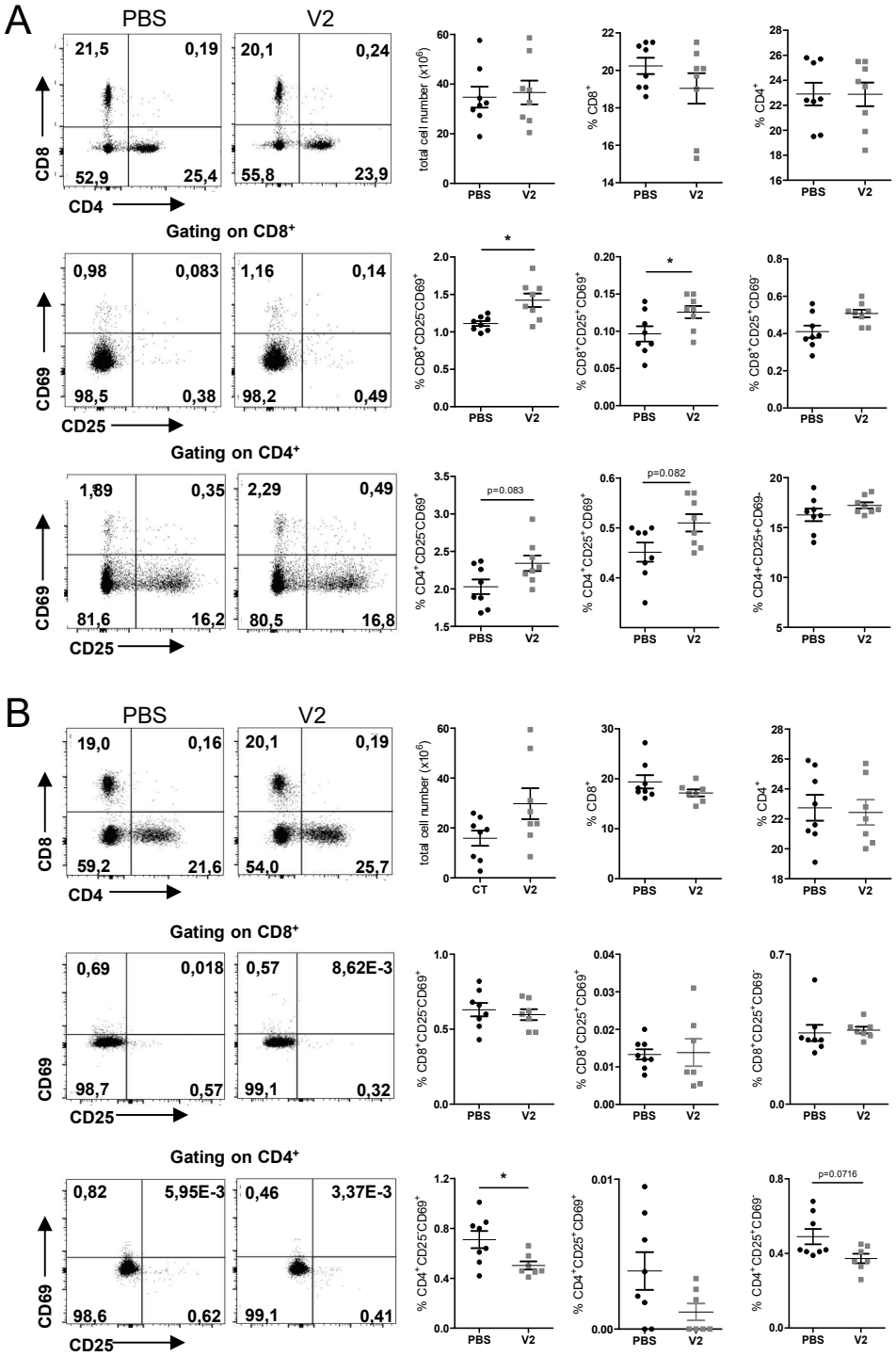



**Figure 2: VPAC2 agonist treatment modulates the proportion of activated lymphocytes in lymph nodes during the both phases of the disease.** When EAE symptoms were moderate, mice received PBS or VPAC2 agonist treatment during 5 days. Draining lymph nodes were isolated at the peak (day 15 **(A)**) and the chronic phase (day 21 **(B)**) of the disease. Cells were analyzed by flow cytometry for CD8, CD4, CD25 and CD69 markers. Representative plot are shown on the left panel. The numbers refer to the percentage of cells in each quadrant. The total cell number was assessed and mean frequencies of $CD4^+$, $CD8^+$, $CD25^-CD69^+$, $CD25^+CD69^+$ and $CD25^+CD69^-$ cells gated from single positive cells are shown in the right panels. The scatter plots represent mean ± SEM of 8-9 individual mice. *P<0.05, (*Mann-Whitney test*, *vs.* PBS group).

Figure 3

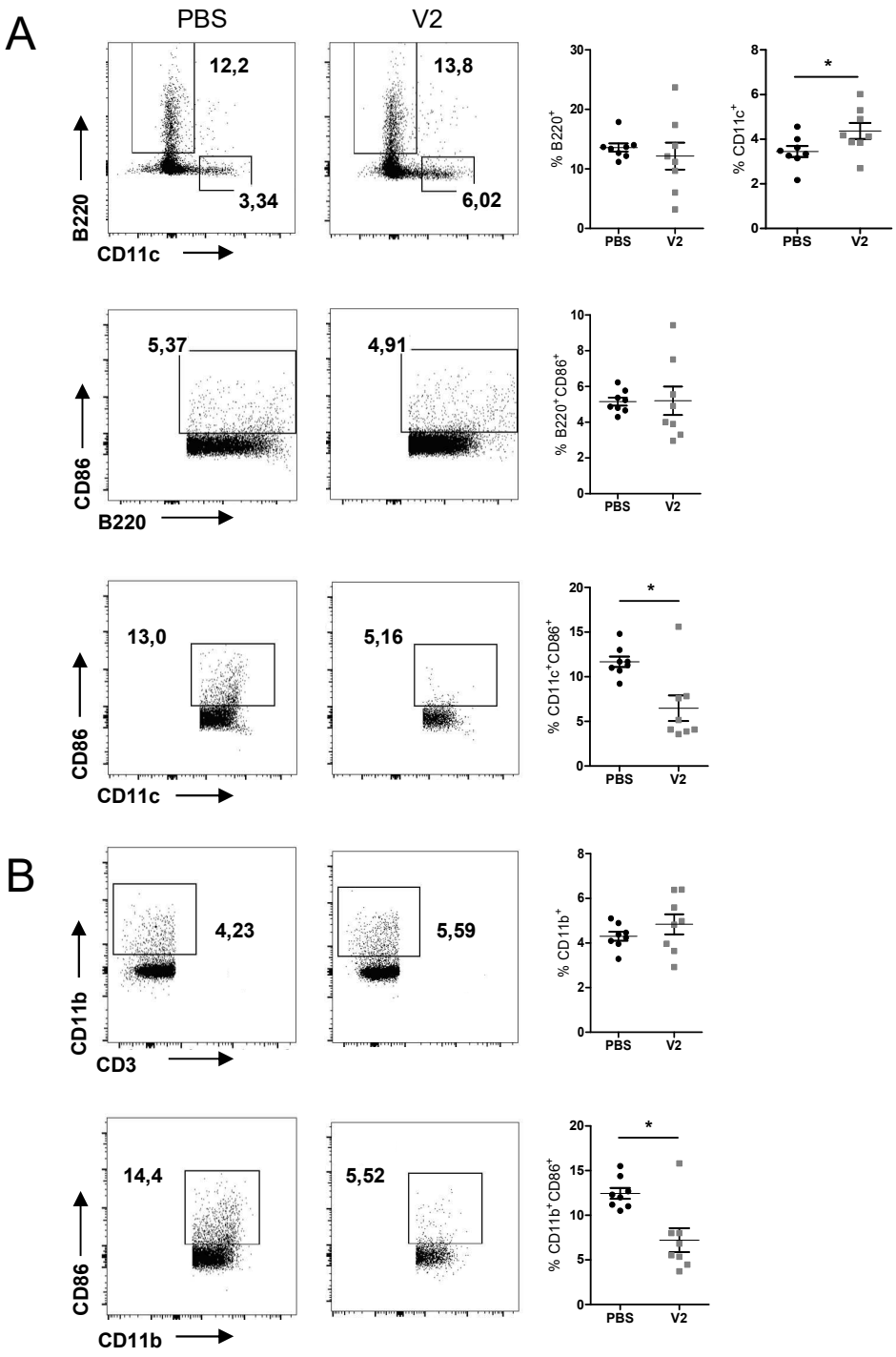



**Figure 3: VPAC2 agonist treatment modulates the activity of antigen-presenting cells.** On day 21 after MOG-immunization, draining lymph nodes were harvested. Immune cell profiles were analyzed by Flow cytometry. On the left panels, representative FACS plots are shown and on the right panels, their graphical representation (Y axis represents the percentage of the appropriate cell subsets). Cells were stained with anti-CD3, anti-CD11c, anti-B220, anti-CD11b and anti-CD86 antibodies to determine $CD3^-CD11c^+B220^-$ (dendritic cells **(A)**) and $CD3^-B220^+CD11c^-$ (B cells **(A)**) and $CD3^-CD11b^+$ (neutrophils **(B)**) cell subsets and their activation with CD86 marker **(A-B)**. The scatter plots represent the mean +/- SEM of 8-9 individual mice. *P<0.05, (*Mann-Whitney test*, *vs.* PBS group).

dendritic cells and monocytes with reduced antigen-presenting cell activities in draining lymph nodes during the chronic phase of the disease.

**BAY$_{55\text{-}9738}$ modulates the Treg proportion in draining lymph nodes and thymus during the peak and the chronic phases of EAE.**

During EAE, Treg are able to efficiently regulate the homeostasis and activity of effector lymphocytes. Moreover, the absence of VPAC2 induces a defect in Treg population during EAE[14]. To determine the effect of VPAC2 agonist on Treg population, axillary lymph nodes (Figure 4A) and thymus (Figure 4B) were harvested on day 15 (upper panels) and on day 21 (bottom panels) post-immunization and cells were prepared for flow cytometry analysis. Treg were characterized as $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ and $CD4^+FoxP3^+$ in lymph nodes and thymus, respectively. VPAC2 agonist had no impact on total cell number in lymph nodes and thymus in all conditions. We observed that in draining lymph nodes, VPAC2 agonist increased significantly the percentage of Treg on day 15 but had no effect on day 21 (Figure 4A). No difference of Treg proportion was observed between PBS and V2 group in the thymus on day 15. In contrast, VPAC2 agonist treatment induced a significant decrease of Treg population in thymus on day 21 post-immunization (Figure 4B).

**VPAC2 agonist treatment does not influence the cytokine secretion in *ex-vivo* antigen recall in lymph node cell culture.**

Despite the modulation of immune activation, we wanted to determine the effect of VPAC2 agonist during the immunization phase of the disease, so we harvested draining lymph nodes on day 13. Cells were prepared for *ex-vivo* antigen recall (Figure 2A). $1x10^6$ cells were cultured with Ova (unspecific antigen) or MOG (10 ng/mL) during 48 hours and IFN-γ, IL-17 and IL-10 concentrations were assessed in the supernatant by ELISA. No difference was observed for all cytokine secretion after restimulation with MOG between PBS- and V2-groups (Figure 5).

**VPAC2 agonist treatment tends to decrease inflammatory response in spinal cords.**

We decided to analyze the inflammation in the CNS by RT-MLPA in spinal cord on day 21 post-immunization (Figure 6). We observed a significant decrease of RORγT (Th17 specific transcription factor) and iNOS (pro-inflammatory

DRAFT VERSION

Figure 4

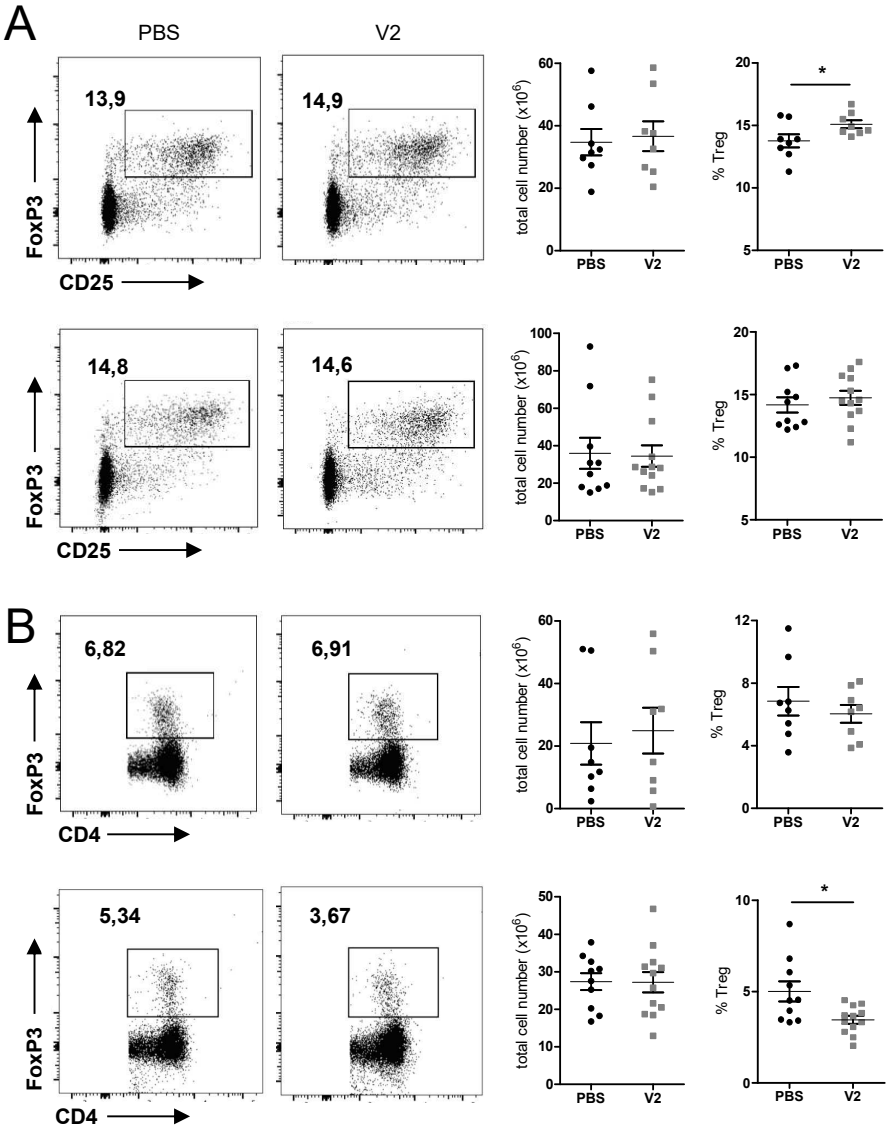



**Figure 4: $BAY_{55\text{-}9738}$ significantly modulates the Treg proportion in lymph nodes and thymus during the peak and the chronic phases.** Draining lymph nodes **(A)** and thymus **(B)** were harvested on day 15 (the upper panel) and 21 (the bottom panel) after MOG-immunization. On the left panels, representative FACS plots are shown and on the right panels, their graphs shown the percentage of the appropriate cell subsets. Cells were stained with anti-CD4, anti-CD25 and anti-FoxP3 antibodies to determine Treg proportions as $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ and $CD4^+FoxP3^+$ in lymph nodes and thymus, respectively. The scatter plots represent the mean +/- SEM of 8-9 individual mice. *P<0.05, (*Mann-Whitney test*, *vs.* PBS group).

Figure 5

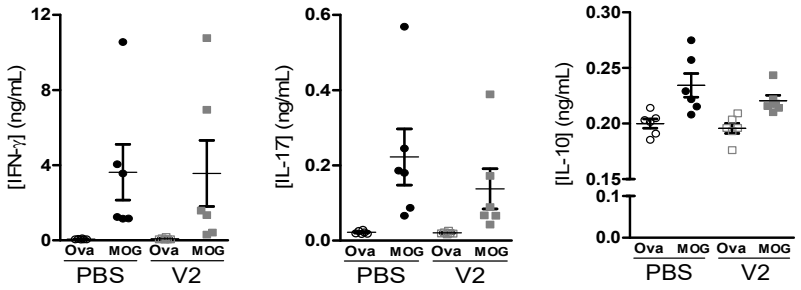



**Figure 5: VPAC2 agonist treatment do not impact the cytokine secretion in ex-vivo antigen recall in lymph node cell culture.** Draining lymph nodes were isolated at the peak (day 15) from PBS and VPAC2 agonist-treated mice. $1x10^6$ cells were cultured for 48h in the presence of OVA or MOG (10µg/mL). The levels of IFN-γ, IL-17 and IL-10 were measured in supernatants by ELISA. The scatter plots represent the mean +/- SEM with n=6 mice.

# Figure 6

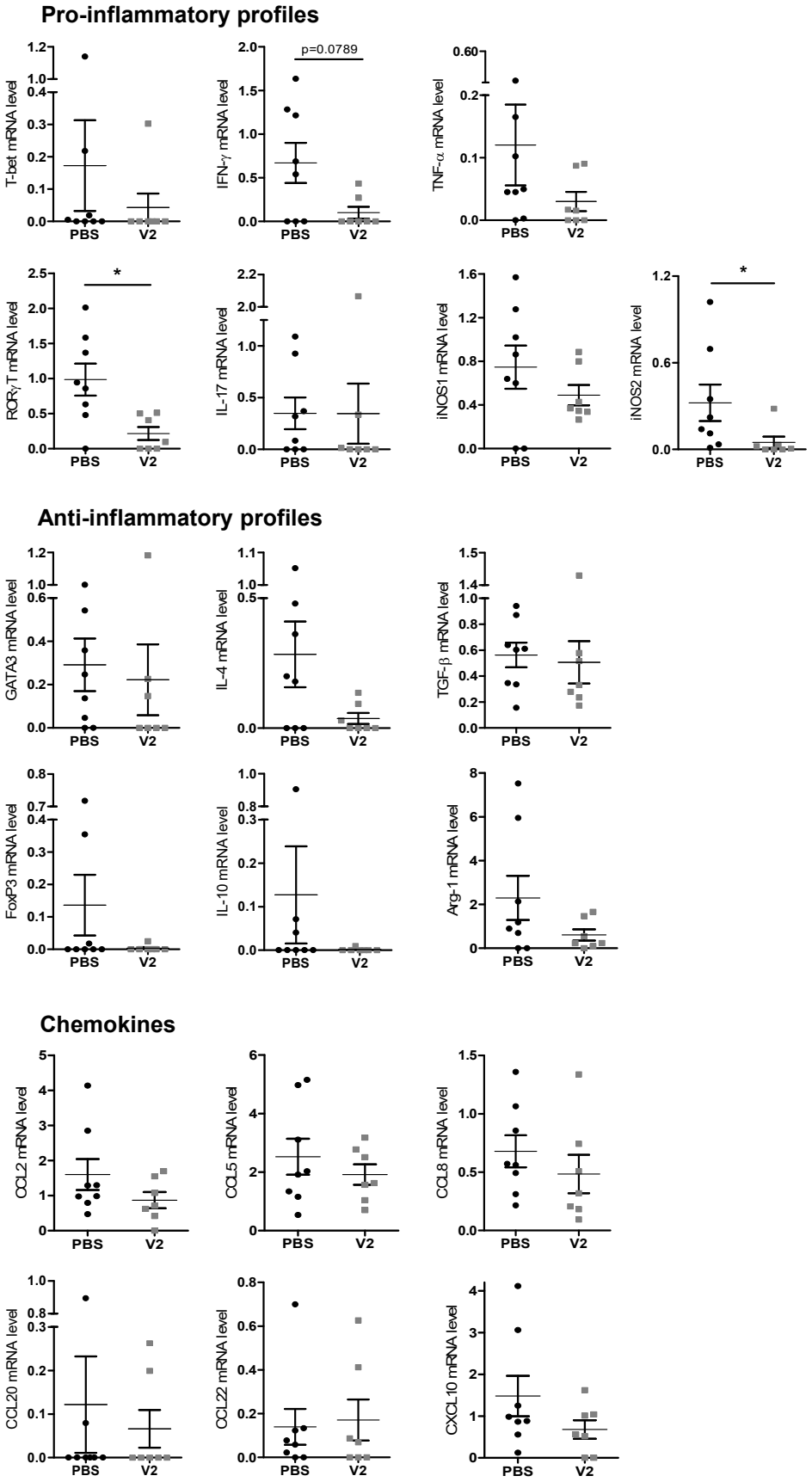



**Figure 6: VPAC2 agonist treatment tends to decrease inflammatory response in spinal cords.** On day 21 post-immunization, spinal cord tissues from PBS and V2 groups were isolated and mRNA levels were assessed by RT-MPLA analysis. Graphs show the mRNA expression of cytokines (*i.e.* TNF-α, IFN-γ (Th1-specific), IL-17 (Th17-specific), IL-4 (Th2-specific), and IL-10 and TGF-β (Treg-specific)), transcription factors (*i.e.* T-bet, RORγT, GATA3 and FoxP3 (Th1-, Th17-, Th2- and Treg-specific, respectively), chemokines (*i.e.* CCL2, CCL5, CCL8, CCL20, CCL22 and CXCL10) and others genes (*i.e.* iNOS and Arg-1). *$P$<0.05 (*Mann-Whitney test*, *vs.* PBS group).

macrophage/microglia marker) in V2-treated spinal cord. We noted a trend of decrease of pro- and anti-inflammatory transcription factors (T-bet, GATA3 and FoxP3, specific of Th1, Th17 and Treg, respectively), cytokines (IFN-γ and TNF-α (Th1-specifc), IL-17 (Th17-specific), IL-4 (Th2-specific), and IL-10 (Treg-specific)), chemokines (CCL2 and CXCL10) and arginase 1 (Arg-1, anti-inflammatory macrophage/microglia marker). These results suggest that VPAC2 agonist treatment decreases the inflammation in the spinal cord during the chronic phase of EAE.

**$BAY_{55\text{-}9837}$ treatment leads to less demyelination by decreasing astrogliosis and by increasing macrophage activation during the chronic phase.**

In order to observe demyelination, immune and glial cell infiltrates, spinal cords were harvested 24 days post-immunization and incubated in 4% PFA and embedded in OCT for immunofluorescence analyses. We stained 7 µm-sections with anti-MBP (for myelin), anti-CD4 (for $CD4^+$ T cells), anti-GFAP (for astrocytes) and anti-Iba-1 (for macrophage/microglia) antibodies (Figure 7). We observed an increase of the percentage of $MBP^+$ area (Figure 7A) and a significant increase of Iba-$1^+$ proportion (Figure 7D) in V2-treated group compared to PBS-treated group. We also observed a trend of a decrease in $GFAP^+$ percentage in VPAC2 agonist group *vs.* control group (Figure 7B). The $CD4^+$ cell number seemed to be not affected by the treatment (Figure 7C). This data suggest that VPAC2 agonist protects the CNS by decreasing astrogliosis and by increasing macrophage activation during the chronic phase.

**VPAC2 agonist treatment diminishes demyelination processes with favoring remyelination in CPZ model.**

In late phase of the disease, the neurodegenerative component plays a major role in comparing with the inflammatory one. In order to study the role of VPAC2 agonist only on the nervous system component (demyelination and remyelination) we used the CPZ model, which is a toxic-demyelination model without inflammatory implication. In fact, the CPZ induce the loss of mature oligodendrocyte in the brain. Firstly, we determined the effect of the treatment during demyelination phase of the CPZ model. Nine week-old female C57BL/6 mice (n=8/group) were fed with 0.2% of cuprizone during five weeks and six days before the sacrifice, mice were divided in two groups: PBS and VPAC2 agonist (10 nmol/day/mouse) treated groups (Figure

DRAFT VERSION

Figure 7

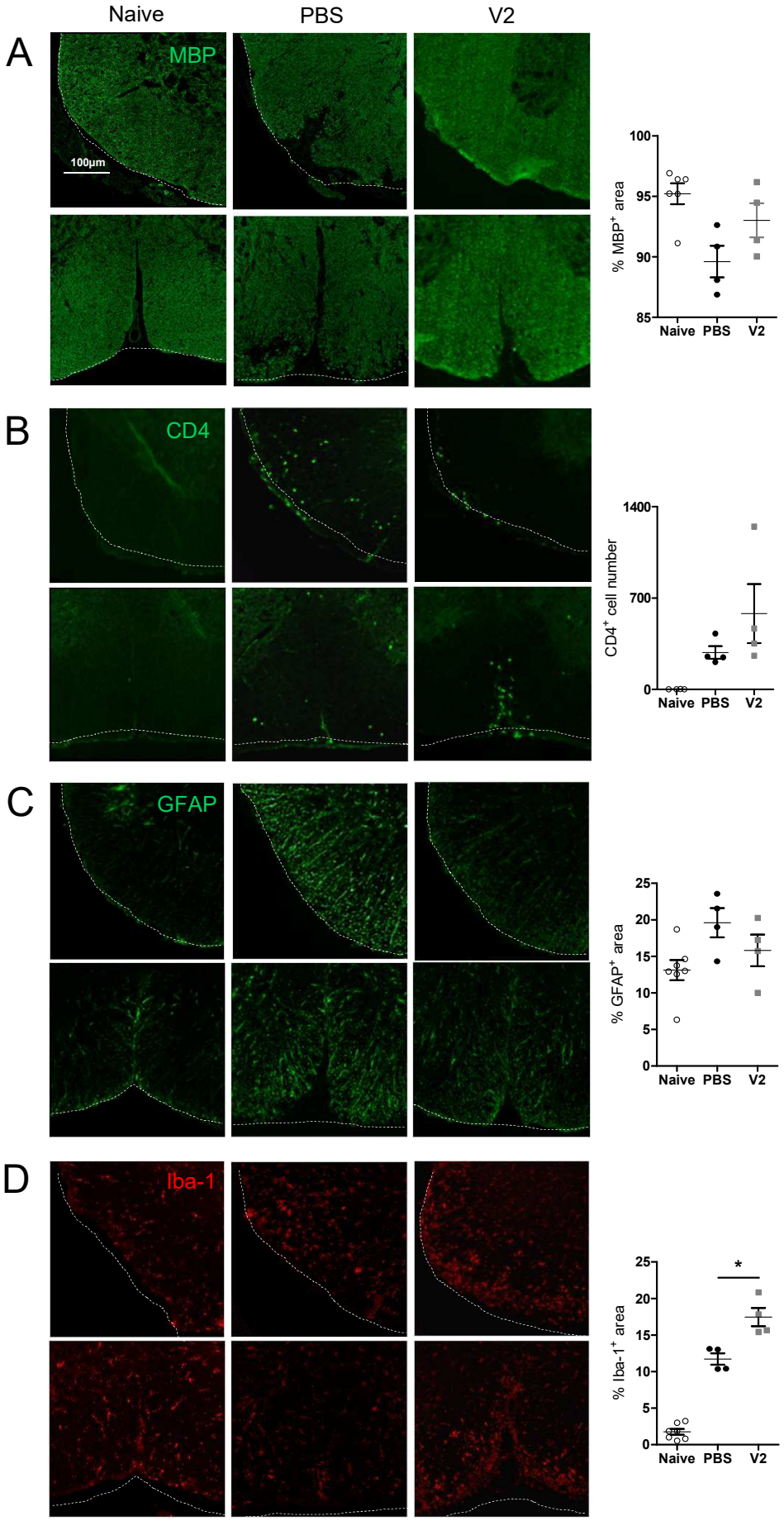



**Figure 7: $BAY_{55\text{-}9837}$ treatment leads to less demyelination by decreasing astrogliosis and by increasing macrophage activation during the chronic phase.** On day 21 post-immunization, spinal cords from naïve, PBS and V2 groups were isolated and were embedded in OCT. Sections were labelled with anti-MBP (A), anti-CD4 (B), anti-GFAP (C) and anti-Iba-1 (D) antibodies for immunofluorescence. In the left panel, all images were taken at X10 magnification and two representative areas of spinal cord are shown per group. In the right panel, the scatter plots represent the mean of the percentage of $MBP^+$, $GFAP^+$ and Iba-$1^+$ area and $CD4^+$ cell numbers for each group (n=4-7 mice). *$P<0.05$ (*Mann-Whitney test*, *vs.* PBS group)

8A). After the sacrifice, brains were harvested, divided in two parts between the two hemispheres. One part was embedded in OCT for immunofluorescence analyses (Figure 8B) and the other part was prepared for RT-MLPA analysis (Figure 8C). 7 µm-sections of brains were stained with anti-MBP and the $MBP^+$ area percentage was assessed in the corpus callosum (CC) and the cerebellum (CB), two myelinated areas in the brain which are sensitive to cuprizone. As expected, we observed a significant decrease of the myelinated area in the cerebellum and the corpus callosum between naive (diet with regular food) and PBS group (Figure 8B). This demyelination was significantly reversed in the cerebellum (but not in the corpus callosum) with the VPAC2 agonist treatment. In addition to the histopathological study, we analyzed mRNA level of different genes normalized by the mean of all gene intensity and by the intensity of the housekeeping gene (HPRT) by RT-MLPA. We observed a higher mRNA level of IL-10 and a significant increase of Arg-1 (Figure 8C).

Secondly, we determined the effect of the treatment during remyelination phase of the CPZ model. Nine week-old C57BL/6 female mice (n=8/group) were fed with 0.2% of cuprizone during five weeks. To allow the spontaneous remyelination, normal diet was given during one week and half. 6 days before the sacrifice, mice were divided in 2 groups: PBS and VPAC2 agonist (10 nmol/day/mouse) treated groups (Figure 9A). As previously, after the sacrifice, brains were harvested, divided in two between the hemispheres for immunofluorescence analyses (Figure 9B-C) and for RT-MLPA analysis (Figure 9D). We observed that the percentage of $MBP^+$ area was significantly increased in the CB and in the CC from VPAC2 agonist-treated mice vs. control group (Figure 9B). After stopping the cuprizone, the oligodendrocyte precursors differentiated into oligodendrocytes to allow the remyelination. We decided to analyze the precursors of oligodendrocyte population with the NG2 marker. We observed a significantly increase of $NG2^+$ area percentage in the corpus callosum (NG2 marker was not observed in the cerebellum) between the naive group and the PBS-treated group (Figure 9C). The $NG2^+$ area was decreased in the corpus callosum after VPAC2 agonist treatment compared to PBS-treated mice. The mRNA level analysis shows that $BAY_{55\text{-}9837}$ decreased significantly the iNOS and MBP mRNA levels in the brain during the remyelination phase (Figure 9D).

So, during demyelination phase in CPZ model, VPAC2 agonist protects against demyelination (in the cerebellum essentially) through an increase of the anti-



DRAFT VERSION

Figure 8

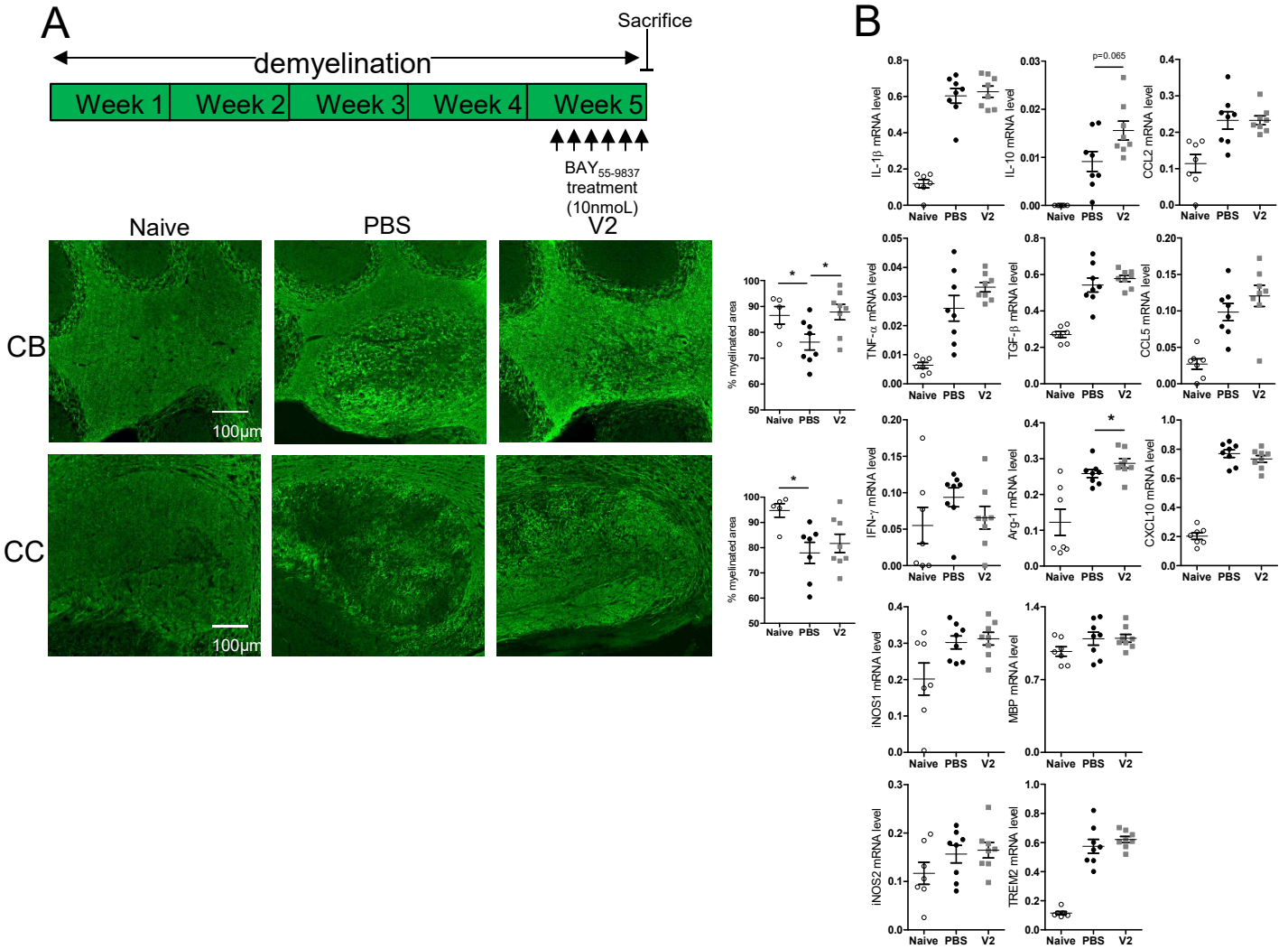



**Figure 8 : VPAC2 agonist treatment diminishes demyelination processes in CPZ model.** 9 week-old C57BL/6 female mice were fed with 0.2% cuprizone during 5 weeks to induce toxic demyelination. 6 days before the sacrifice, mice were divided in two groups and treated with PBS or VPAC2 agonist (10 nmol/200uL) every day. Panel **(A)** represents a schema of the experimental timeline. After the sacrifice, brains were harvested and divided in two parts. One half part was embedded into OCT for immunofluorescence assay with anti-MBP antibody. Pictures show representative images (x20 magnification) of corpus callosum (CC) and cerebellum (CB) and the scatter plots represent the mean of the $MBP^+$ area percentage with n=5-8 per group. The other half of brain was isolated and mRNA levels were assessed by the RT-MPLA analysis. Panel **(B)** shows the scatter plots of the mRNA expression of cytokines (*i.e.* IL-1β, TNF-α, IFN-γ, IL-10 and TGF-β), chemokines (*i.e.* CCL2, CCL5 and CXCL10) and others genes such as iNOS, Arg-1, MBP and TREM2. *$P$<0.05 (*Mann-Whitney test*, *vs.* PBS group)

Figure 9

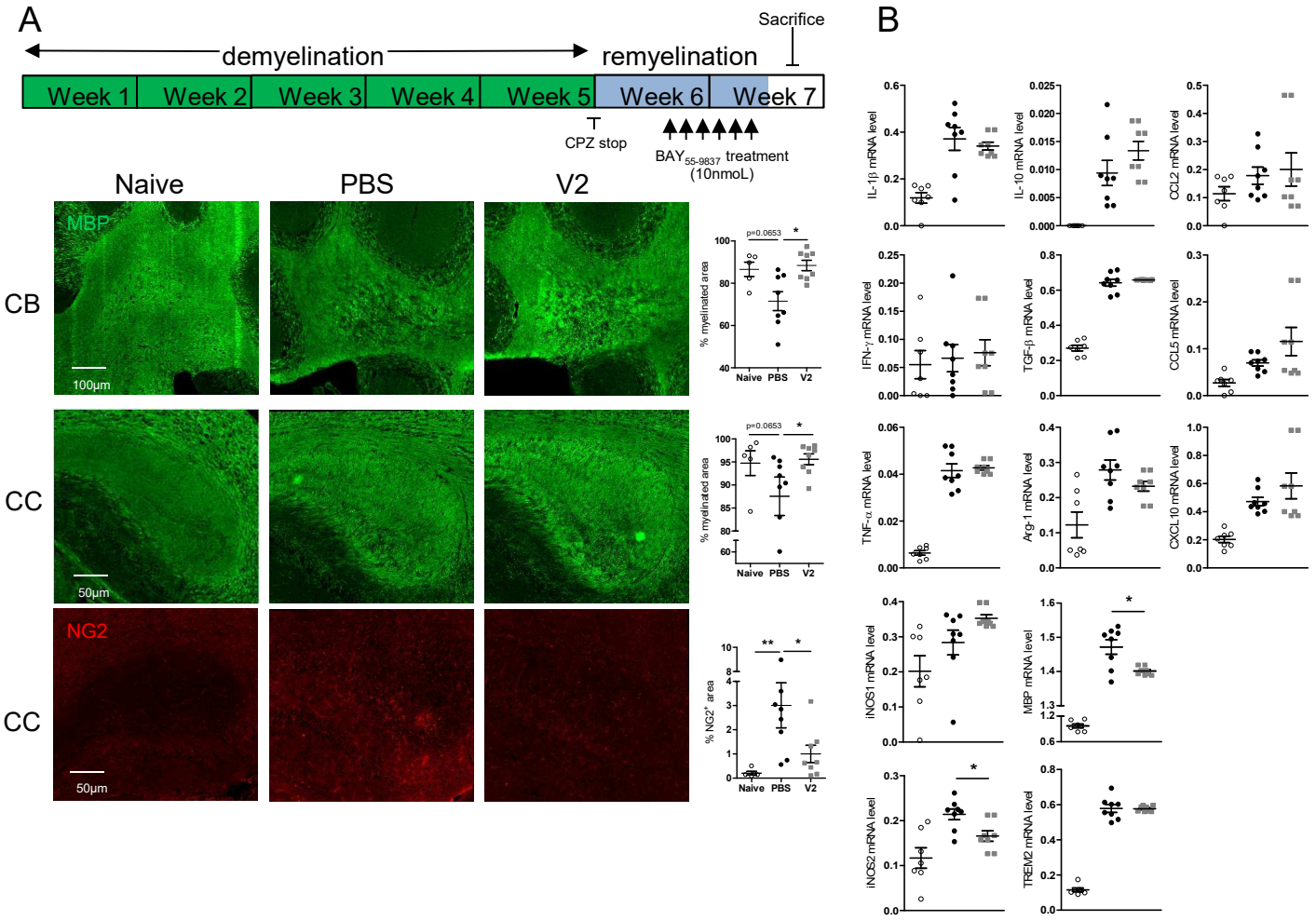



**Figure 9 : VPAC2 agonist treatment favors remyelination in CPZ model.** 9 week-old C57BL/6 female mice were fed with 0.2% cuprizone during 5 weeks to induce toxic demyelination and the remyelination was allowed by one week and half with normal food without cuprizone. 6 days before the sacrifice, mice were divided in two groups (n=8 per group) and treated with PBS or VPAC2 agonist (10 nmol/200uL) daily until the sacrifice. Panel **(A)** represents a schema of the experimental timeline. After the sacrifice, brains were harvested and divided in two parts. One left part was embedded into OCT for immunofluorescence assay with anti-MBP and anti-NG2 antibodies. Panel **(A)** show also photographs (x20 tiles) of corpus callosum and cerebellum and the scatter plots represent the mean of the MBP$^+$ and NG2$^+$ area percentage with n=5-8 per group. The other half of brain was isolated and mRNA levels were assessed by the RT-MPLA technic. Panel **(B)** show graphs of the mRNA expression of cytokines (*i.e.* IL-1β, TNF-α, IFN-γ, IL-10 and TGF-β), chemokines (*i.e.* CCL2, CCL5 and CXCL10) and others genes such as iNOS, Arg-1, MBP and TREM2. *$P$<0.05 (*Mann-Whitney test*, *vs.* PBS group)

inflammatory component. The VPAC2 treatment enhances the remyelination processes through a decrease of the pro-inflammatory mediators during the remyelination phase in CPZ model.

**Discussion**

Among their pleiotropic actions mediated by three GPRCs (PAC1, VPAC1 and VPAC2), VIP and PACAP have potent anti-inflammatory and neuroprotective effects. Those have been demonstrated in experimental models of chronic and inflammatory diseases such as EAE model, the most used model of multiple sclerosis. Particularly, our team showed that after $MOG_{35-55}$ immunization, VPAC2 KO mice developed an exacerbated EAE severity with higher clinical and histopathological EAE features and higher immune response in the spinal cord compared to wild-type mice but a defect in Treg population[14]. We hypothesized that an agonist of VPAC2 could have beneficial therapeutic actions against EAE. To test this hypothesis, we induced EAE in nine week old C57BL/6 female mice with $MOG_{35-55}$ immunization. When mice reached a moderate EAE score (=1-1.5), mice were divided in two groups: PBS and VPAC2 agonist ($BAY_{55-9837}$). We observed that the VPAC2 agonist treatment alleviates significantly the severity of EAE with a lower immune cell infiltration in the CNS.

Defective Treg population is a signature of chronic and autoimmune diseases such as MS. Tan et al.'s work encourage us to explore the impact of $BAY_{55-9837}$ in Treg population in lymph nodes and thymus at the peak and the chronic phase of EAE. We observed a significant increase of $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ Treg percentage in draining lymph nodes on day 15 post-immunization. This was in correlation with a significant increase of $CD4^+CD69^+$ population in draining lymph nodes. These results are in adequation with the Radulovic's study. They have demonstrated that transfer of $CD69^{-/-}$ $CD4^+$ T cells into $Rag1^{-/-}$ mice induced severe colitis due to a reduced $FoxP3^+$ regulatory T cell induction[17]. We also observed a significant decrease of $CD4^+CD69^+$ population in lymph nodes and of Treg in thymus at a later stage (chronic phase), probably the consequence of the restoration of inflammation induced by VPAC2 agonist treatment.

In order to prime the immune response, lymphocytes interact with APCs. To be fully activated, lymphocytes need MHC-TCR interaction and different molecules of co-stimulatory such as CD86. VIP and PACAP have opposite effects on CD86

DRAFT VERSION

expression in immature and LPS-stimulated dendritic cells[13]. They enhance CD86 expression on immature dendritic cells but inhibit it on LPS-stimulated dendritic cells and they strongly reduce their capacity to stimulate Th proliferation and secretion of Th1 and Th2 cytokines. Indeed, Delgado et al. have shown that VIP induces tolerogenic CD11c$^+$ dendritic cells, which are capable to promote Treg during inflammatory conditions. The administration of those tolerogenic dendritic cells induced Treg generation and an strongly reduction of the EAE severity[18].

We observed no difference of CD86 expression on APC during the peak of the disease (data not shown). This result can explain the fact that, after *ex-vivo* restimulation at day 15 post-immunization, a similar cytokine secretion (IFN-γ, IL-17 and IL-10) by lymph node cells was observed between PBS- and VPAC2 agonist treated-mice. During the late phase, we found a significant increase of CD11c$^+$ population and a reduced CD86 expression on CD11c$^+$ and CD11b$^+$ cells suggesting a lower APC activity. Although we need to better define the phenotype of VPAC2-treated dendritic cells, our data may suggest a tolerogenic phenotype. Altogether, the immunization phase of EAE induction seems less effective in VPAC2 agonist-treated mice.

To determine the VPAC2 agonist mechanism during EAE, we also determined its impact in the target tissue, the spinal cord, on day 21 post-immunization. By RT-MLPA analysis, we observed a trend of decrease for all observed genes with a significant decrease of RORγT and iNOS mRNA levels in VPAC2 treated-animals compared to controls. These results reinforce the observation that VPAC2 agonist induce a less effective immunization phase. Moreover, an increase trend of the MBP$^+$ area percentage was observed in spinal cords from VPAC2-treated mice compared to PBS-treated mice, suggesting milder demyelination processes. We also observed a significant increase of Iba-1$^+$ area proportion in VPAC2-treated mice *vs.* PBS-treated mice. Iba-1 is a microglia/macrophage marker in CNS. These cells can be schematically divided according to two main phenotypes: pro-inflammatory macrophage/microglia that can be defined by the iNOS expression and anti-inflammatory macrophage/microglia that can be defined by Arg-1 expression. The significant decrease of iNOS mRNA level and the significant increase of Iba-1$^+$ area percentage in spinal cords could suggest that VPAC2 agonist treatment favors anti-inflammatory M2 phenotype.

DRAFT VERSION

During progressive MS, neurodegenerative processes predominate inflammatory component of the disease. The diminished neurodegenerative features observed in EAE model could be secondary to the reduction of inflammation. To determine the effect of VPAC2 agonist only on demyelination processes, we used the cuprizone model, which is a toxic demyelination model without lymphocyte involvement. Mice were fed with 0.2% cuprizone during five weeks to induce demyelination. Six days before the sacrifice, mice were divided in two groups: PBS and VPAC2 agonist-treated mice. The treatment protects against demyelination, which was shown by a significant increase of $MBP^+$ area percentage in the cerebellum compared to control group. This protection is due to an increase of anti-inflammatory gene expression (IL-10 and Arg-1).

Neuroregenerative processes occur in parallel of demyelination during chronic phase of MS but there are not sufficient to induce complete remyelination. To determine the activity of VPAC2 agonist on remyelination, mice were fed with 0.2% cuprizone during 5 weeks then remyelination was allowed with normal food during one week and half. $BAY_{55\text{-}9837}$ enhances the remyelination shown with a significant increase of $MBP^+$ area percentage in the corpus callosum and in the cerebellum. Furthermore, the RT-MLPA analysis showed that mRNA level of MBP was significantly decreased in VPAC2-treated mice *vs.* control group suggesting an enhancement of remyelination by VPAC2 agonist treatment. We also noted that MBP mRNA level in brain from VPAC2-treated mice was similar to the one from naive mice suggesting a return to a physiological state. Remyelination was also due to a significant lower mRNA expression of iNOS, reflection of a weaker inflammatory response. We also observed a lower rate of $NG2^+$ area in the corpus callosum in VPAC2-treated mice compared to PBS-treated mice. This percentage is similar of naive $NG2^+$ area percentage. This result may indicate given the fact that oligodendrocyte precursor cells are characterized by the NG2 marker, VPAC2 agonist promote their differentiation into oligodendrocyte and consequently remyelination.

**Conclusion**

This work analyzed in detail the therapeutic effects of the agonist $BAY_{55\text{-}9837}$ in the mouse models of EAE and of CPZ and established the proof of concept of its potential use in multiple sclerosis and other autoimmune and neurodegenerative pathologies.

DRAFT VERSION

Table 1: Probe sequence of EAE panel

| EAE panel | left (L) or right (R) | probe sequence |
|---|---|---|
| Foxp3 | L | GTGCCAGCAAGATCCAATCTAGACCGGCCTGGCCTGCCACCTG |
| | R | GGATCAATGTGGCCAGTCTGGAATGGTCCAACCCTTAGGGAACCC |
| Gata3 | L | GTGCCAGCAAGATCCAATCTAGATACTTATCAAGCCCAAGCGAAGGCTG |
| | R | TCGGCAGCAAGGAGAGCAGGGACATTCCAACCCTTAGGGAACCC |
| Ifng | L | GTGCCAGCAAGATCCAATCTAGAGATGCATTCATGAGTATTGCCAAGTTTGAG |
| | R | GTCAACAACCCACAGGTCCAGCGTCCAACCCTTAGGGAACCC |
| Roryt | L | GTGCCAGCAAGATCCAATCTAGATAGCTCTGGGCATGTCCCGAGATG |
| | R | CTGTCAAGTTTGGCCGAATGTCCATCCAACCCTTAGGGAACCC |
| Arg-1 | L | GTGCCAGCAAGATCCAATCTAGATACTATGGTGCTGGGTGGAGACCACAG |
| | R | TCTGGCAGTTGGAAGCATCTCTGGTACTCCAACCCTTAGGGAACCC |
| Il-4 | L | GTGCCAGCAAGATCCAATCTAGATAGCTTTTCGATGCCTGGATTCATCG |
| | R | ATAAGCTGCACCATGAATGAGTCCAAGTCCTCCAACCCTTAGGGAACCC |
| T-bet | L | GTGCCAGCAAGATCCAATCTAGATACTAAAGGCAGAAGGCAGCATGCCAG |
| | R | GGAACCGCTTATATGTCCACCCAGACTCCCTATCCAACCCTTAGGGAACCC |
| Hprt | L | GTGCCAGCAAGATCCAATCTAGAAGTGTTTATTCCTCATGGACTGATTATGGACAG |
| | R | GACTGAAAGACTTGCTCGAGATGTCATGATCCAACCCTTAGGGAACCC |
| Il-17a | L | GTGCCAGCAAGATCCAATCTAGATACTACTATCCACGTCACCCTGGACTCTCCA |
| | R | CCGCAATGAAGACCCTGATAGATATCCCTTACTATCCAACCCTTAGGGAACCC |
| inos | L | GTGCCAGCAAGATCCAATCTAGATACTACTACTACCACTCTTCACCACAAGGCCACATCG |
| | R | GATTTCACTTGCAAGTCCAAGTCTTGCTTGTACTATCCAACCCTTAGGGAACCC |
| Ccl2 | L | GTGCCAGCAAGATCCAATCTAGATACTACTACTACATCCACGTGTTGGCTCAGCCAG |
| | R | ATGCAGTTAACGCCCCACTCACCTTACTACTACTATCCAACCCTTAGGGAACCC |
| Cxcl10 | L | GTGCCAGCAAGATCCAATCTAGATACTACTACTACATCCTGCTGGGTCTGAGTGGGACTCAAG |
| | R | GGATCCCTCTCGCAAGGACGGTCCTACTACTACTTCCAACCCTTAGGGAACCC |
| Ccl20 | L | GTGCCAGCAAGATCCAATCTAGATACTACTACTGCCGATGAAGCTTGTGACATTAATGCTATCAT |
| | R | CTTTCACACGAAGAAAAGAAAATCTGTGTGCGTACTCCAACCCTTAGGGAACCC |
| Il-10 | L | GTGCCAGCAAGATCCAATCTAGATACTACTACTACTAGGATGCGGCTGAGGCGCTGT |
| | R | CATCGATTTCTCCCCTGTGAAAATAAGAGCTACTACTACTACTACTCCAACCCTTAGGGAACCC |
| Ccl22 | L | GTGCCAGCAAGATCCAATCTAGATACTACTACTACTACTACTTGTGGCAATTCAGACCTCTGATGCAG |
| | R | GTCCCTATGGTGCCAATGTGGAAGACTACTACTACTACTCCAACCCTTAGGGAACCC |
| Ccl5 | L | GTGCCAGCAAGATCCAATCTAGATACTACTACTACTACTACTACTACAGCAAGTGCTCCAATCTTGCAGTCGT |
| | R | GTTTGTCACTCGAAGGAACCGCCATACTACTACTACTATCCAACCCTTAGGGAACCC |
| Tnf-a | L | GTGCCAGCAAGATCCAATCTAGATACTACTACTACTACTACTCTATGGCCCAGACCCTCACACTCA |
| | R | GATCATCTTCTCAAAATTCGAGTGACAAGCTACTACTACTACTACTTCCAACCCTTAGGGAACCC |
| Ccl8 | L | GTGCCAGCAAGATCCAATCTAGATACTACTACTACTACCCAGAGAAGCTGACTGGGCCAG |
| | R | ATAAGGCTCCAGTCACCTGCTGCTTTCTACTACTACTACTACTATCCAACCCTTAGGGAACCC |
| Tgf-b | L | GTGCCAGCAAGATCCAATCTAGATACTACTACTACTACTACTACTATACGGCAGTGGCTGAACCAAGGAG |
| | R | ACGGAATACAGGGCTTTCGATTCAGCTACTACTACTACTACTACTACTCCAACCCTTAGGGAACCC |

DRAFT VERSION

Table 2: Probe sequence of CPZ panel

| CPZ panel | left (L) or right (R) | probe sequence |
|---|---|---|
| IL-1b | L | GTGCCAGCAAGATCCAATCTAGAGAAGTTGACGGACCCCAAAAGATGAAG |
| | R | GGCTGCTTCCAAACCTTTGACCTGTCCAACCCTTAGGGAACCC |
| Ifng | L | GTGCCAGCAAGATCCAATCTAGAGATGCATTCATGAGTATTGCCAAGTTTGAG |
| | R | GTCAACAACCCACAGGTCCAGCGTCCAACCCTTAGGGAACCC |
| Arg-1 | L | GTGCCAGCAAGATCCAATCTAGATACTATGGTGCTGGGTGGAGACCACAG |
| | R | TCTGGCAGTTGGAAGCATCTCTGGTACTCCAACCCTTAGGGAACCC |
| Cxcl9 | L | GTGCCAGCAAGATCCAATCTAGACCCCAATTGCAACAAAACTGAAATCAT |
| | R | TGCTACACTGAAGAACGGAGATCAAACCTTCCAACCCTTAGGGAACCC |
| Mbp | L | GTGCCAGCAAGATCCAATCTAGATACAACCCAGTAGTCCATTTCTTCAAGAACATT |
| | R | GTGACACCTCGAACACCACCTCCATTCCAACCCTTAGGGAACCC |
| Hprt | L | GTGCCAGCAAGATCCAATCTAGAAGTGTTTATTCCTCATGGACTGATTATGGACAG |
| | R | GACTGAAAGACTTGCTCGAGATGTCATGATCCAACCCTTAGGGAACCC |
| Ccl2 | L | GTGCCAGCAAGATCCAATCTAGATACTACTACTACATCCACGTGTTGGCTCAGCCAG |
| | R | ATGCAGTTAACGCCCCACTCACCTTACTACTACTATCCAACCCTTAGGGAACCC |
| inos | L | GTGCCAGCAAGATCCAATCTAGATACTACTACTACCACTCTTCACCACAAGGCCACATCG |
| | R | GATTTCACTTGCAAGTCCAAGTCTTGCTTGTACTATCCAACCCTTAGGGAACCC |
| Cxcl10 | L | GTGCCAGCAAGATCCAATCTAGATACTACTACTACATCCTGCTGGGTCTGAGTGGGACTCAAG |
| | R | GGATCCCTCTCGCAAGGACGGTCCTACTACTACTTCCAACCCTTAGGGAACCC |
| Il-10 | L | GTGCCAGCAAGATCCAATCTAGATACTACTACTACTAGGATGCGGCTGAGGCGCTGT |
| | R | CATCGATTTCTCCCCTGTGAAAATAAGAGCTACTACTACTACTACTCCAACCCTTAGGGAACCC |
| Tnfa | L | GTGCCAGCAAGATCCAATCTAGATACTACTACTACTACTACTCTATGGCCCAGACCCTCACACTCA |
| | R | GATCATCTTCTCAAAATTCGAGTGACAAGCTACTACTACTACTACTTCCAACCCTTAGGGAACCC |
| Ccl8 | L | GTGCCAGCAAGATCCAATCTAGATACTACTACTACTACCCAGAGAAGCTGACTGGGCCAG |
| | R | ATAAGGCTCCAGTCACCTGCTGCTTTCTACTACTACTACTACTATCCAACCCTTAGGGAACCC |
| Tgfb | L | GTGCCAGCAAGATCCAATCTAGATACTACTACTACTACTACTACTATACGGCAGTGGCTGAACCAAGGAG |
| | R | ACGGAATACAGGGCTTTCGATTCAGCTACTACTACTACTACTACTACTCCAACCCTTAGGGAACCC |
| Trem2 | L | GTGCCAGCAAGATCCAATCTAGATACTACTACTACTACTACCCAAGTGGAACACAGCACCTCCAG |
| | R | GCAGGTTTCATCCTGTGGGTCACCTACTACTACTACTACTTCCAACCCTTAGGGAACCC |

**Table 1 and Table2: Probe sequence of EAE and CPZ model.** Blue, pink, red and green sequences represent primer sequence; specific gene sequence on the left probe; specific gene sequence on the right probe and spacer sequence, respectively.

DRAFT VERSION

## References


1. Compston, A. & Coles, A. Multiple sclerosis. *The Lancet* **372**, 1502–1517 (2008).
2. Abad, C., Martinez, C., Leceta, J., Gomariz, R. P. & Delgado, M. Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide Inhibits Collagen-Induced Arthritis: An Experimental Immunomodulatory Therapy. *J. Immunol.* **167**, 3182–3189 (2001).
3. Delgado, M., Abad, C., Martinez, C., Leceta, J. & Gomariz, R. P. Vasoactive intestinal peptide prevents experimental arthritis by downregulating both autoimmune and inflammatory components of the disease. *Nat. Med.* **7**, 563–568 (2001).
4. Abad, C. *et al.* Therapeutic effects of vasoactive intestinal peptide in the trinitrobenzene sulfonic acid mice model of Crohn's disease. *Gastroenterology* **124**, 961–971 (2003).
5. Kato, H. *et al.* Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis by suppressing the functions of antigen presenting cells. *Mult. Scler. Houndmills Basingstoke Engl.* **10**, 651–659 (2004).
6. Gonzalez-Rey, E. *et al.* Therapeutic effect of vasoactive intestinal peptide on experimental autoimmune encephalomyelitis: down-regulation of inflammatory and autoimmune responses. *Am. J. Pathol.* **168**, 1179–1188 (2006).
7. Vaudry, D. *et al.* Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its receptors: from structure to functions. *Pharmacol. Rev.* **52**, 269–324 (2000).
8. Delgado, M., Pozo, D. & Ganea, D. The significance of vasoactive intestinal peptide in immunomodulation. *Pharmacol. Rev.* **56**, 249–290 (2004).
9. Lara-Marquez, M., O'Dorisio, M., O'Dorisio, T., Shah, M. & Karacay, B. Selective gene expression and activation-dependent regulation of vasoactive intestinal


DRAFT VERSION

peptide receptor type 1 and type 2 in human T cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **166**, 2522–2530 (2001).

10. Delgado, M. & Ganea, D. Inhibition of endotoxin-induced macrophage chemokine production by vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in vitro and in vivo. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **167**, 966–975 (2001).

11. Delgado, M., Munoz-Elias, E. J., Gomariz, R. P. & Ganea, D. VIP and PACAP inhibit IL-12 production in LPS-stimulated macrophages. Subsequent effect on IFNgamma synthesis by T cells. *J. Neuroimmunol.* **96**, 167–181 (1999).

12. Leceta, J. *et al.* Receptors and transcriptional factors involved in the anti-inflammatory activity of VIP and PACAP. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **921**, 92–102 (2000).

13. Delgado, M., Reduta, A., Sharma, V. & Ganea, D. VIP/PACAP oppositely affects immature and mature dendritic cell expression of CD80/CD86 and the stimulatory activity for CD4(+) T cells. *J. Leukoc. Biol.* **75**, 1122–1130 (2004).

14. Tan, Y.-V., Abad, C., Wang, Y., Lopez, R. & Waschek, J. VPAC2 (vasoactive intestinal peptide receptor type 2) receptor deficient mice develop exacerbated experimental autoimmune encephalomyelitis with increased Th1/Th17 and reduced Th2/Treg responses. *Brain. Behav. Immun.* **44**, 167–175 (2015).

15. Gudi, V., Gingele, S., Skripuletz, T. & Stangel, M. Glial response during cuprizone-induced de- and remyelination in the CNS: lessons learned. *Front. Cell. Neurosci.* **8**, 73 (2014).

16. Mareschal, S. *et al.* Accurate Classification of Germinal Center B-Cell–Like/Activated B-Cell–Like Diffuse Large B-Cell Lymphoma Using a Simple and

DRAFT VERSION

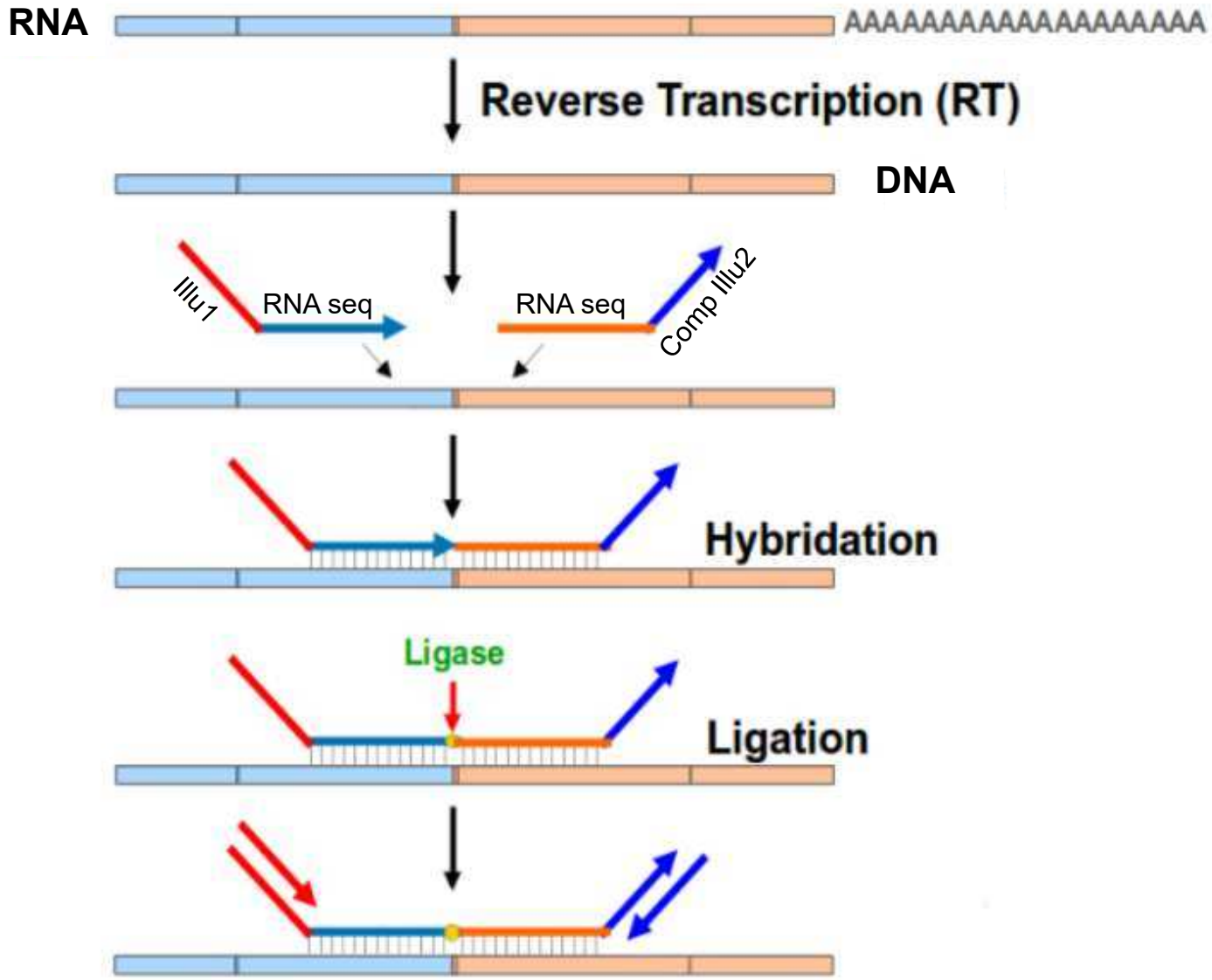
Rapid Reverse Transcriptase–Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification Assay. *J. Mol. Diagn.* **17**, 273–283 (2015).

17. Radulovic, K. *et al.* CD69 regulates type I IFN-induced tolerogenic signals to mucosal CD4 T cells that attenuate their colitogenic potential. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **188**, 2001–2013 (2012).

18. Delgado, M., Gonzalez-Rey, E. & Ganea, D. The neuropeptide vasoactive intestinal peptide generates tolerogenic dendritic cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **175**, 7311–7324 (2005).

DRAFT VERSION

Supplementary Figure 1




**Supplementary Figure 1: representative schema of RT-MLPA steps**

Au cours de cette étude, nous avons observé que l'administration de $BAY_{55-9837}$ :

- diminue significativement la gravité de l'EAE chronique, l'infiltration de cellules immunitaires ainsi que les processus de démyélinisation dans le SNC ;
- module l'activité des lymphocytes et des CPA dans les ganglions lymphatiques durant le pic et la phase chronique de la maladie ;
- n'a aucun effet sur la production cytokinique des cellules issues des ganglions lymphatiques drainants, à la suite d'une stimulation par le peptide $MOG_{35-55}$ *ex vivo* ;
- abaisse l'inflammation dans le SNC et augmente l'activation des macrophages/microglie au cours de la phase chronique de l'EAE ;
- protège contre la démyélinisation et facilite la remyélinisation au cours du modèle de la CPZ.

Ces résultats démontrent l'intérêt thérapeutique d'un agoniste du récepteur de VPAC2 au cours de la SEP et d'autres pathologies inflammatoires et/ou neurodégénératives.

## Chapitre 2. L'implication du neuropeptide de l'orexine A dans l'EAE

Ces travaux ont pour objectif de démontrer la preuve de concept de l'utilisation de l'orexine A comme nouvel agent thérapeutique et d'évaluer son impact sur les composantes inflammatoire et neurodégénératrice dans deux modèles murins : l'EAE, l'un des modèles animaux les plus utilisés pour la SEP, et le modèle toxique de la CPZ comme décrit dans la section « Objectifs ».

**Therapeutic efficacy of systemic administration of orexin A in established experimental autoimmune encephalomyelitis**

**Running title:** orexin A reverts established EAE

Laurine Becquet[1], Catalina Abad[1], Mathilde Leclercq[1], Camille Miel[1], Laetitia Jean[1], Gaëtan Riou[1], Alain Couvineau[2], Olivier Boyer[1,3], Yossan-Var Tan[1*]

[1] UNIROUEN, INSERM U1234, PANTHER, IRIB, Rouen-Normandie University, France.

[2] Paris-Diderot University, INSERM U1149, Inflammation Research Center (CRI), DHU UNITY, Paris, France.

[3] Department of Immunology, Rouen University Hospital, Rouen Normandie University, INSERM, Rouen, France

***Corresponding Author:***

Yossan-Var Tan

INSERM U1234 - PANTHER - IRIB

Université de Rouen Normandie - Faculté de Médecine et Pharmacie

Bâtiment Recherche - 3ème étage

22 Boulevard Gambetta, 76183 Rouen Cedex, France

E-mail: yossan-var.tan@univ-rouen.fr

Phone: +33 2 35 14 82 33

**Acknowledgements**

This work was supported in part by Inserm Transfert, and co-supported by European Union and Région Normandie. Europe gets involved in Normandie with European Regional Development Fund (ERDF).

SUBMITTED

## Abstract

**Background and Purpose.** Orexins (hypocretins, *Hcrt*) A and B are GPCR-binding hypothalamic neuropeptides known to regulate sleep/wake states and feeding behavior. A few studies have shown that orexin A exhibits anti-inflammatory and neuroprotective properties, suggesting that it might provide therapeutic effects in inflammatory and neurodegenerative diseases like multiple sclerosis (MS). MS is a highly prevalent autoimmune disease where encephalitogenic Th1 and Th17 cells trigger an inflammatory response in the CNS destroying the myelin sheath. Here, we investigated the effects of peripheral orexin A administration to mice with experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), a model of MS.

**Experimental Approach.** EAE was induced by active immunization of C57BL/6 mice with myelin oligodendrocyte glycoprotein $(MOG)_{35-55}$ peptide. Orexin A was peripherally administered during ongoing EAE and the efficacy was assessed clinically, as well as by histopathology and cytokine and chemokine mRNA expression analysis in the CNS. Peripheral responses to $MOG_{35-55}$ were studied by *ex vivo* antigen-recall assays.

**Key Results.** Orexin A strongly ameliorated ongoing EAE, limiting the infiltration of pathogenic $CD4^+$ T lymphocytes and diminishing chemokine (MCP-1/CCL2 and IP-10/CXCL10) and cytokine (IFN-γ (Th1), IL-17 (Th17), TNF-α, IL-10 and TGF-β) expressions in the CNS. Moreover, orexin A treatment was neuroprotective, decreasing demyelination, astrogliosis and microglial activation. Despite its strong therapeutic effects, orexin A did not impair draining lymph node cell proliferation and Th1/Th17 cytokine production in response to $MOG_{35-55}$ *in vitro*.

**Conclusion and Implications.** These results suggest that orexins may represent new therapeutic candidates that should be further investigated for MS treatment.


**Keywords:** orexin A, neuropeptide, neuro-immunomodulation, multiple sclerosis, EAE, neuroinflammation.

SUBMITTED

1191

**Abbreviations**

**Arg-1:** arginase 1

**BBB:** blood–brain barrier

**BOxA:** before onset orexin A

**CFA:** complete Freund's adjuvant

**DLN:** draining lymph node

**EAE:** experimental autoimmune encephalomyelitis

**GFAP:** glial fibrillary acidic protein

**Iba1:** ionized calcium-binding adapter molecule 1

**ICV:** intracerebroventricular

**IP:** intraperitoneal

**IP-10:** IFN-γ-inducible protein 10

**LPS:** lipopolysaccharide

**MBP:** myelin basic protein

**MCP-1:** monocyte chemoattractant protein 1

**MOG:** myelin oligodendrocyte glycoprotein

**MS:** multiple sclerosis

**Ova:** ovalbumin

**OxA:** orexin A

**PACAP:** pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide

**RO:** retro-orbital

**Th:** T helper

**TLR:** toll-like receptor

**Tregs:** regulatory T cells

**VIP:** vasoactive intestinal peptide

SUBMITTED

## Introduction

Multiple sclerosis (MS) is a central nervous system (CNS) disease characterized by inflammation, demyelinating processes and neurodegeneration (Grigoriadis *et al*., 2015). Evidence supports a Th1/Th17 autoimmune component driving chronic inflammatory processes in the spinal cord and brain. Thus, most MS therapies are immunomodulatory. However, they are only partially effective at early phases of the pathology with important side effects. In addition to inflammation, axonal and neuronal pathologies are major players during MS. Therefore, there is an urgent need to identify new therapeutic targets, capable not only of blocking inflammation, but also of promoting axon integrity/regeneration, neuron survival and remyelination.

Orexins A and B (or hypocretins 1 and 2), are two neuropeptides of 33 and 28 aminoacids, respectively, which derive from a common precursor (prepro-orexin) (Tsujino and Sakurai, 2009). They were initially identified by reverse pharmacology as the endogenous ligands for the orphan GPCRs, OX1R and OX2R (Sakurai *et al*., 1998). Whereas orexin A binds to both receptors with high affinity, orexin B only binds to OX2R with a similar high affinity (Kodadek and Cai, 2010). Signaling pathways associated to orexin receptors are phospholipase A2, C and D, diacylglycerol lipase, $Ca^{2+}$, and adenylyl cyclase cascades (Kukkonen, 2017). Originally isolated from the hypothalamus (de Lecea *et al*., 1998), orexins are mainly known to regulate sleep and arousal states, appetite, feeding and energy homeostasis (Sakurai *et al*., 1998). Multiple studies have highlighted the therapeutic potential of the orexin system mainly in narcolepsy and other sleep disorders, but also in cancer, due to their pro-apoptotic activity on several tumor cell lines (Boss and Roch, 2017, Graybill and Weissig, 2017, Hoyer and Jacobson, 2013).

It is now known that multiple neuropeptides exert immunomodulatory actions, becoming attractive therapeutic candidates for immune-based diseases (Abad and Waschek, 2011). In this sense, a few studies have suggested that orexin A exhibits anti-inflammatory properties. *In vivo*, the infusion of orexin A ameliorated rat ischemia-reperfusion-induced gastric lesions by decreasing reactive oxygen species production (Bulbul *et al*., 2008). Later on, it was found that the endogenous orexin system attenuated brain damage in a murine focal cerebral ischemia model, an effect associated with reduced IL-6 and TNF-α (Kitamura *et al*., 2010). Recently, peripheral

SUBMITTED

administration of orexin A by a subcutaneous osmotic pump improved the survival of mice to lipopolysaccharide (LPS)-induced endotoxin shock, decreasing the levels of multiple proinflammatory cytokines and chemokines (Ogawa *et al*., 2016). *In vitro* studies using the microglial cell line BV2, suggest that orexin A may directly inhibit innate immune responses. In this sense, orexin A pre-treatment of BV2 cells decreased the production of proinflammatory IL-6, TNF-α, and iNOS upon toll-like receptor (TLR)-4 stimulation, while inducing an anti-inflammatory (M2-like) phenotype characterized by increased arginase-1 expression (Xiong et al., 2013, Duffy et al., 2015) .

Several reports demonstrated that orexin A also exerts neuroprotection, reinforcing its therapeutic potential in neurodegenerative diseases with an inflammatory component such as MS. Indeed, orexin A reduced brain damage in models of rodent cerebral ischemia (Xiong *et al*., 2013, Harada *et al*., 2011, Yuan *et al*., 2011). *In vitro*, orexins A and B were protective against cobalt-induced oxidative stress in primary rat neuronal cultures (Sokolowska *et al*., 2014). Other investigators have studied the effects of orexins on the SH-SY5Y human neuroblastoma cell line, which has been used as an *in vitro* model of dopaminergic neurons in Parkinson's disease. Orexin A protected SH-SY5Y cells against MPP(+) and 6-OHDA neurotoxicity through anti-apoptotic and antioxidant effects (Feng *et al*., 2014, Pasban-Aliabadi *et al*., 2017, Esmaeili-Mahani *et al*., 2013). A microarray analysis of neuronally-differentiated SH-SY5Y cells treated with orexin A alone, revealed the upregulation of genes involved in neuroprotection, such as somatostatin receptors and vasoactive intestinal peptide (VIP) (Davies *et al*., 2015).

Using chronic myelin oligodendrocyte glycoprotein ($MOG_{35-55}$)-induced experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), a widely used model of MS, we investigated here the curative potential of peripheral orexin A administration in the clinical development of ongoing disease. Moreover, we studied the impact of this treatment on inflammatory and neurodegeneration processes that underlie the pathogenesis of EAE.

SUBMITTED

## Methods

### Mice

Animal experimentation guidelines dictated by the ethical committee for animal experimentation, CENOMEXA N°54 and by the French ministry (*Ministère de l'Education Nationale, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche*) were followed (agreement number B7645005). All animals used in the experiments were 9-12 week-old female C57BL/6Rj mice (Janvier Laboratories, Le Genest Saint Isle, France) and housed as five mice per cage in an SPF-free vivarium with food and water provided *ad libitum*. In the EAE model, sets of n=10 mice per group were used for clinical assessment from day 0 to day 30 post-immunisation. In addition, separate sets of mice were EAE-induced for early (day 15, n=6 mice per group) and late (day 21, n=7 mice per group) sacrifices with the purpose of cellular and molecular analysis. In the cuprizone model of demyelination and remyelination, groups of n=8 mice were used. The number of mice required was calculated based on previous studies from the author's and reduced accordingly to employ the minimum number of animals to get statistically significant data. All studies involving animals are reported in accordance with the ARRIVE and *BJP guidelines*.

### EAE induction and orexin A treatment

EAE was induced by subcutaneous immunization in the flanks with 100 µg of $MOG_{35-55}$ (GL Biochem, Shanghai, China) emulsified with complete Freund's adjuvant (CFA) supplemented with 5 mg/mL of *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra (Difco, Detroit, USA). In addition, mice received intraperitoneally (IP) 300 ng of pertussis toxin (List Laboratories, Campbell, USA) on days 0 and 2 post-immunization. Mice were monitored at least daily and were scored from 0 to 5 by two researchers blinded to the treatments as described (Giles *et al*., 2017, Stoolman *et al*., 2014) with: 0- no symptoms; 1- loss of tail tonicity; 2- wobbly gait; 3- partial paralysis of the two hind legs or complete paralysis of one hind leg; 4- complete paralysis of the two hind legs; 5- moribund state or death. The weight was assessed every other day during the course of the disease. The humane end points were established as follows: paralysis of all four legs for more than 24h, weight decrement by more than 20% (compared to the weight at the time of immunization), abnormal behavior, not mentally alert, piloerection, back arched, self-mutilation, severe dehydration or dermatitis/posthitis (penile inflammation) with ulceration from excessive urinary moisture. All appropriate efforts

SUBMITTED

were made to minimize animal suffering or discomfort (assistance with voiding by lightly palpating the abdomen at least two times per day, food access by supplying pelleted rodent chow on the floor of the cage and rehydration by saline subcutaneous injections), and to use the minimal number of animals necessary to produce reliable results. Mice were treated for five consecutive days with either PBS (control group), 100 µg or 300 µg of orexin A (GL Biochem) in 200 µL volume by IP or retro-orbital (RO) administrations. Treatment was initiated either in preventive (*i.e*. before the onset of the disease = day three post-immunization) or curative (at a moderate EAE score = 1.5) settings. Mice were randomized to the treatments. Mice were sacrificed by overdose of isoflurane at the peak and chronic phases of the disease (= day 15 and day 21 post-immunization, respectively).

**Histopathology and immunofluorescence**

Spinal cords were collected 21 days after immunization and fixed in 4% paraformaldehyde overnight. For haematoxylin-eosin and luxol fast blue staining, tissues were dehydrated, paraffin embedded, and 7 µm sections prepared with a microtome. Stained spinal cord sections were photographed at x10 (Zeiss Axio Vert microscope) magnification, and image acquisition was performed with Zen 2 lite software. The degree of immune cell infiltration and demyelination was scored from 0 to 4 as follows: 0- no infiltration and no demyelination; 1- sparse immune cells in the meninges area; 2- few localized immune cell infiltrating areas reaching the parenchyma with mild demyelination; 3- multiple infiltration areas with moderate demyelination; 4- severe immune cell infiltration with severe demyelination.

For immunofluorescence studies, spinal cords were cryoprotected in 20% sucrose and embedded in OCT. Cryostat 7 µm sections were incubated with primary rat anti-CD4 (1:500, BD Biosciences, San Jose, USA), rat anti-MBP (1:1000, Millipore, Burlington, USA), rat anti-GFAP (1:1000, Thermofisher scientific, Waltham, USA), rabbit anti-Iba1 (1:1000, Wako, Osaka, Japan) or goat anti-Arg1 (1:200, Abcam, Cambridge, UK) antibodies overnight at 4°C. Then, sections were incubated with Alexa Fluor 488 or Cy.3-conjugated secondary antibodies (1:400, Jackson ImmunoResearch Antibodies, West Grove, USA) for 45 min at room temperature. Slides were mounted using Fluoromount-G with DAPI (Southern Biotech, Birmingham, USA). Spinal cord sections were photographed at x20 magnification on a Zeiss epifluorescence microscope (AxioImager J1) equipped with an apotome and Zen pro2012 software

SUBMITTED

(two or three images per animal per antibody). Images were analyzed by an operator blinded to the treatment groups using ImageJ (NIH). Percentage of immunoreactive area or cell numbers per $mm^2$ were quantified.

**Flow cytometry**

15 or 21 days post-immunization, lymph nodes were harvested and cell suspensions were obtained by shredding the organs through a 40 µm mesh. For myeloid cell analysis, cells were incubated with APC-Cy7-anti-CD3 (145-2C11, Sony, San Jose, USA), Alexa700-anti-CD11b (M1/70, eBioscience, San Diego, USA), APC-anti-CD11c (N418, Sony), PerCP-Cy5.5-anti-Ly6C (HK1.4, Sony), BV605-anti-Ly6G (1A8, Sony), BV421-anti-PD-L1 (10F.9G2, Sony), FITC-anti-MHCII (2G9, Sony) and PE-Cy7-anti-CD86 (GL-1, Sony), for 30 min at 4°C. Then cells were treated with 1-step Fix/Lyse solution (eBioscience) during 30 min. For T cell proliferation, activation and regulatory T cell (Treg) analysis, cells were incubated with APC-Cy7-anti-CD4 (RM4-5, Sony), BV605-anti-CD8 (53-6.7, Sony), PE-anti-CD25 (PC61, BD Biosciences), PE-Cy7-anti-CD44 (IM7, eBioscience), PercP-Cy5.5-anti-CD62L (MEL-14, Sony) and BV421-anti-CD69 (H1.2F3, Sony) for 20 min at 4°C. Then, cells were treated with fixation/permeabilization buffer (eBioscience) overnight, and incubated with APC-anti-Foxp3 (JFK-16s, eBioscience) and FITC-anti-Ki67 (B56, Sony) during 1 hour. Samples were analyzed by flow cytometry using a LSRFortessa cytometer (BD Biosciences) and FlowJo software.

**RNA extraction and real time RT-PCR**

RNA was extracted from spinal cords or axillary lymph nodes at day 15 and 21 post-immunization with Trizol (Sigma, Saint Louis, USA), treated with DNase I (Roche, Bâle, Switzerland) and RNA retrotranscribed with iScript Reverse transcription supermix (Bio-rad, Hercules, USA). Real time quantitative PCRs were performed from 50 ng of complementary DNA using SYBR Green I Master (Roche) in combination with the specific primers (see **Supplementary Table 1**). Amplification was performed with LightCycler 480 System SW 1.5.1 (Roche) as follows: initial denaturation during 10 min at 95°C, 40 cycles of 96°C for 20 s followed by 64°C for 10 s and 72°C for 15 s for IFN-γ, IL-17 and FoxP3; 96°C for 20 s, 60°C for 20 s and 75°C for 15 s for IL-4; 96°C for 20 s, 60°C for 30 s and 72°C for 20 s for IL-10; 96°C for 30 s, 62°C for 30 s and 72°C for 30 s for IP-10; 96°C for 25 s, 60°C for 35 s and 72°C for 35 s for MCP-1; 96°C for 20 s followed by 60°C for 10 s and 72°C for 15 s for TGF-β and 96°C for 20 s, 62°C

SUBMITTED

for 30 s and 72°C for 20 s for TNF-α. Melting curve analysis confirmed primer specificity. The calculation was normalized to the housekeeping gene HPRT according to the following formula $(E_{target})\Delta Ct_{target}/(E_{normalizer})\Delta Ct_{normalizer}$ calculation (referring to the Real-time PCR handbook from Life Technologies). PCRs were performed in duplicate to ensure the reliability of each single value, but for data analysis and representation, mean of only single values are shown.

**Orexin receptor mRNA expression**

For orexin receptor expression, spinal cord, brain, cervical and axillary lymph nodes, thymus, and spleen from naive mice were collected. In addition, $CD4^+$, $CD8^+$ and $CD11b^+$ cells were isolated from the spleen of naive mice by using a FACSAria-IIIu cell sorter (BD Bioscience). Purity of isolated populations was above 95% (not shown). RNA was extracted with Trizol (Sigma), treated with DNase I (Invitrogen, Carlsbad, CA) and retro-transcribed by iScript reagent (Bio-Rad). PCRs were performed with Thermoprime Taq DNA polymerase (Thermofisher scientific) in combination with specific primers (see **Supplementary Table 1**) in a thermocycler (Eppendorf, Hambourg, Germany) following the program: initial denaturation during 10 min at 95°C, 40 cycles of 96°C for 25 s followed by 58°C for 40 s and 72°C for 35 s followed by elongation for 10 min at 72°C.

**Antigen recall assays**

At the peak of EAE, on day 15 after immunization, axillary lymph nodes were collected and cell suspensions were prepared as above. Cells were cultured at 1 x $10^6$ cells/mL in complete medium (RPMI 1640 containing 25 mM HEPES, 2 mM L-glutamine, 1% penicillin/streptomycin and 10% FBS, Thermofisher scientific) with 20 µg/mL of ovalbumin (Ova, Sigma) or $MOG_{35-55}$ (GL Biochem) for 48h. For some experiments, cells from PBS-treated mice were stimulated with Ova or $MOG_{35-55}$ (20 µg/mL) in the presence or absence of orexin A (1 x $10^{-6}$ M). Cytokine levels (IFN-γ and IL-17) were measured by ELISA kits (Affymetrix, Santa Clara, USA) following the manufacturer's protocol. For proliferation assay, after 48 hours of culture, 1 µCi/well of [$^3$H]-thymidine was added for 18 hours. Incorporated radioactivity was measured on a Wallac 1450 Trilux β-scintillation counter. Cultures were performed in quadruplicate to ensure the reliability of each single value, but for data analysis and representation, mean of only single values are shown.

SUBMITTED

### Cuprizone model of demyelination/remyelination

In order to induce demyelination, C57BL/6Rj mice were given 0.2% of cuprizone (Sigma) mixed with normal powder food for five weeks. For remyelination studies, after five weeks of cuprizone, mice were switched to normal powder food (without cuprizone) for 11 days. In each model, mice were given daily IP injections of 300 µg of orexin A in 200 µL of PBS on the last six days of each protocol, and then sacrificed. Brains were removed, cut in half along the midline, and fixed overnight in 4% of paraformaldehyde for immunofluorescence staining of MBP. We measured the MBP staining area in two brain zones that were found to be highly demyelinated in this model, the white substance of the corpus callosum and the cerebellum. The mean demyelination percentage of each area is shown.

### Statistical analyses

Statistical analysis was performed using Graphpad Prism 6.05 for Windows (La Jolla, USA). A diagnostic test was used to assess the normality of the data (Shapiro-Wilk). According to the results, we proceeded to use parametric or non-parametric statistical tests. Statistics were carried out on raw data. For statistical test of EAE score curves, Two-way ANOVA was used. For the rest of analysis, a non-parametric test (*Mann-Whitney*) was used to assess significance. Significance threshold was determined at $P<0.05$. Results were represented with the mean ± SEM. The data and statistical analysis comply with the recommendations on experimental design and analysis in pharmacology (Curtis *et al*., 2015).

## Results

**Systemic orexin A administration strikingly ameliorates the clinical features of ongoing chronic EAE.** We investigated the therapeutic potential of systemic administration (*i.e.* intraperitoneal (IP) or retro-orbital (RO)) of orexin A during EAE. First, we evaluated the effects of five IP injections of 100 µg/mouse/day of orexin A vs. PBS (control) on consecutive days in either preventive (before EAE onset, starting on day 3 post-EAE induction, $BOxA_{100}$ IP) or curative (starting when mice have reached a moderate EAE score of 1.5, day 11-12, $OxA_{100}$ IP) settings (**Figure 1A**). Both treatments efficiently reduced the clinical symptoms of chronic EAE in comparison with

SUBMITTED

# Figure 1

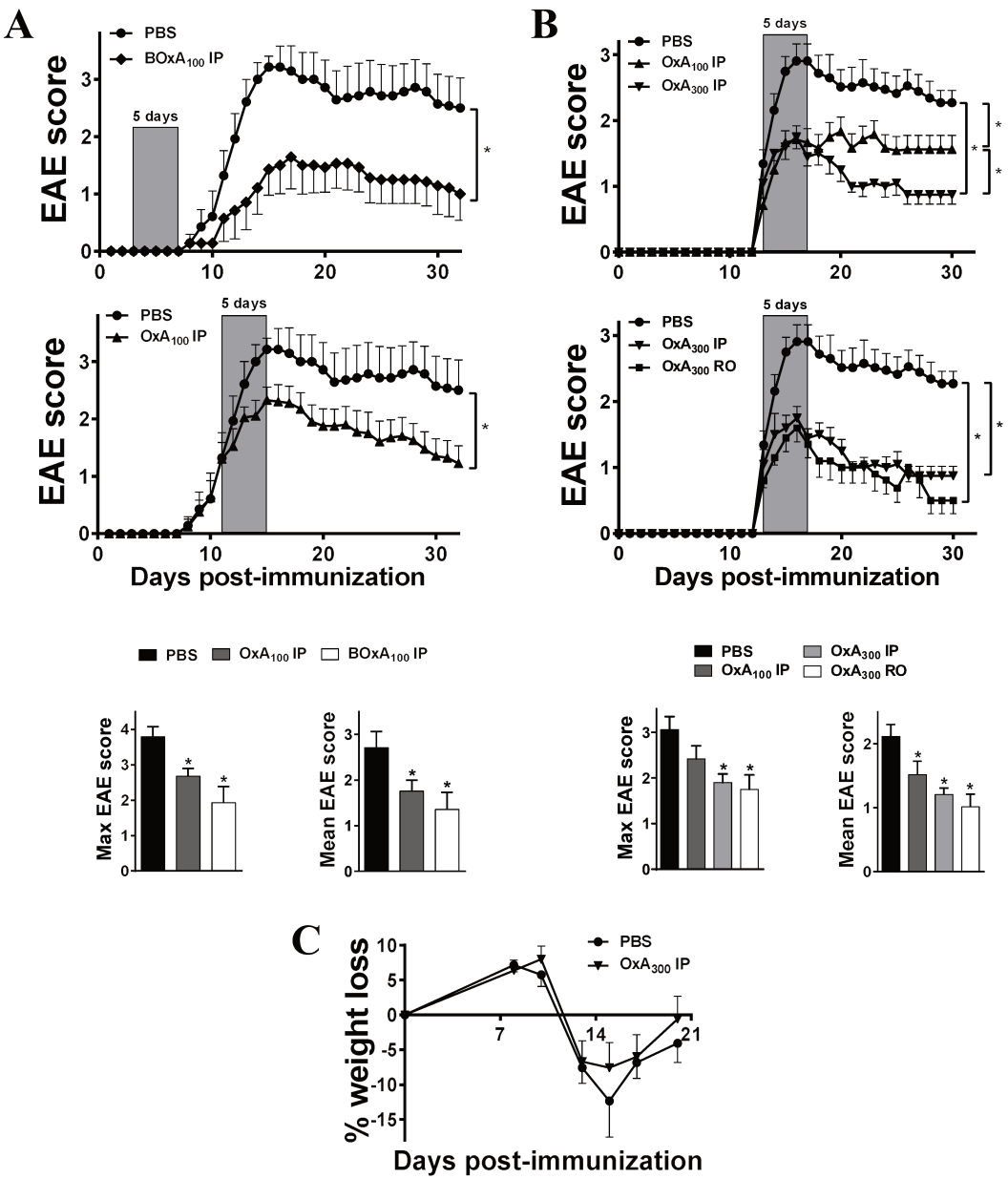



**Figure 1. Preventive and curative orexin A treatments dramatically alleviate EAE symptoms.** Chronic EAE was induced with 100 µg of $MOG_{35-55}$ to 9-week old female C57BL/6 mice (n=10/group). Panels show clinical signs of EAE scored daily for over 30 days on a scale of 0-5 as described in the "Methods" section. **Panel A** shows intraperitoneally (IP) administered PBS (PBS group), 100 µg/mouse of orexin A for five days starting on day 3 (= before the onset, $BOxA_{100}$ IP group) or starting when mice exhibit a moderate EAE score (= 1.5 for $OxA_{100}$ IP group). **Panel B** shows IP given PBS (PBS group), 100 µg/mouse of orexin A ($OxA_{100}$ IP group) or 300 µg/mouse of orexin A ($OxA_{300}$ IP group), as well as retro-orbital (RO) injection with 300 µg/mouse of orexin A ($OxA_{300}$ RO group) for a five day administration starting at moderate EAE (= 1.5). Clinical curves represent mean clinical scores ± SEM. *$P$<0.05 (Two-way ANOVA compared to PBS group). For all clinical studies, maximal EAE score and mean EAE score were assessed. *$P$<0.05 (*Mann-Whitney* test, compared to PBS group). **Panel C** shows the percentage of weight loss (in comparison with the initial weight before EAE induction) during the disease development. Shown results are representative of 3 independent experiments with n=10 animals/group each.

PBS-treated animals (**Figure 1A**). In fact, both treatments diminished the severity of EAE, as reflected by the reduction of the average maximal and mean scores (**Figure 1A**). Because of the higher therapeutic interest of a curative vs. a preventive treatment from a clinical standpoint, the former was selected for further studies. The action of orexin A was dose-dependent, with an optimal effect observed with 300 µg/mouse/day ($OxA_{300}$ IP) (**Figure 1B**). A similar efficacy when orexin A was administered through retro-orbital route was found (**Figure 1B**). Orexins regulate food intake and energy balance, however, body weight was not different between orexin A- vs. PBS-treated EAE mice along the study (**Figure 1C**).

These results provide the proof-of-concept that orexin A exhibits potent therapeutic actions during EAE when given peripherally. Based on these data, we determined the optimal conditions (*i.e.* $OxA_{300}$ IP), as well as two time points of sacrifice (*i.e*. day 15 as the peak and day 21 as the established phase of the disease) for further analyses.

**Orexin A treatment reduces CNS inflammation in EAE.** The clinical beneficial effect of orexin A was associated to a significant reduction of the histopathological score on day 21 post-immunization (**Figure 2**). Indeed, spinal cord sections from orexin A (vs. PBS) treated mice, exhibited significantly reduced immune cell infiltration and myelin loss as determined by hematoxylin/eosin and luxol fast blue stainings, respectively (**Figure 2A**). Immunofluorescence staining of CD4 allowed us to study this cell population more precisely. Numerous $CD4^+$ cells infiltrated the meninges and CNS parenchyma in PBS-treated EAE mice, and this number was strikingly reduced in orexin A-treated mice (**Figure 2B**). These results suggest that orexin A impairs the recruitment of T cells to the CNS, critical for the development of neuroinflammation during EAE. Corroborating the lower degree of inflammation in the CNS of orexin A-treated mice, there was a significant generalized reduction of the expression of chemokines (MCP-1/CCL2, IP-10/CXCL10) and both proinflammatory (TNF-α, IFN-γ, IL-17) and anti-inflammatory cytokines (IL-10 and TGF-β), in the spinal cords of orexin A compared to PBS-treated mice on day 21 post-EAE as measured by Real time PCR (**Figure 3**). The expression of immune mediators was also determined at the peak of EAE (day 15). No significant differences were found at this time point, except for the expression of Foxp3, a transcription factor that characterizes regulatory T cells (Tregs), which was significantly increased in orexin A-treated mice.

SUBMITTED

# Figure 2

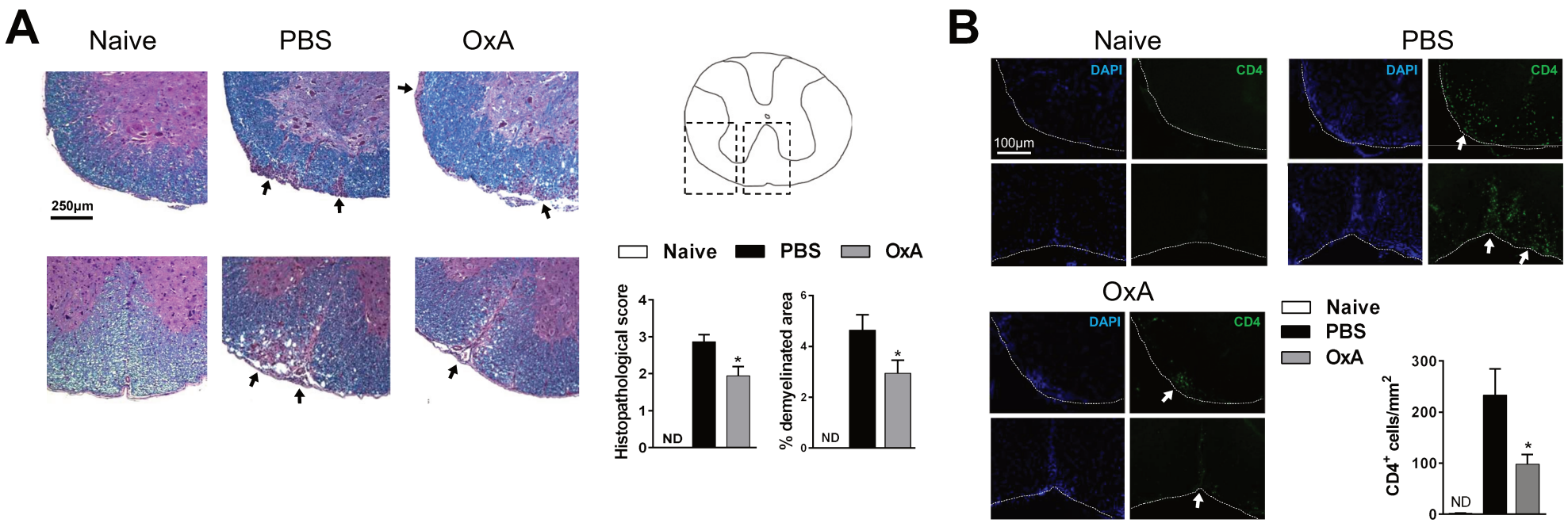



**Figure 2. Orexin A significantly decreases the histopathological score of EAE mice and CD4⁺ T cell recruitment in the CNS.** On day 21 post-immunization, spinal cord sections from naive, PBS and $OxA_{300}$ IP mice were prepared. **Panel A**: Spinal cord tissues were stained with haematoxylin/eosin (to distinguish cell infiltration) and luxol fast blue (to detect myelin). **Panel B**: Spinal cord sections were labelled with DAPI and Alexa 488 anti-CD4. All images were taken at x20 magnification. Two or three representative areas of spinal cord are shown per experimental group. Arrows show inflammatory and demyelinating areas. Graphs show the mean histological scores, percentage of demyelinated area and the quantification of infiltrated $CD4^+$ cells per $mm^2$ of each group (n=7/group). *$P<0.05$ (*Mann-Whitney* test, compared to PBS group). ND = non detectable.

# Figure 3

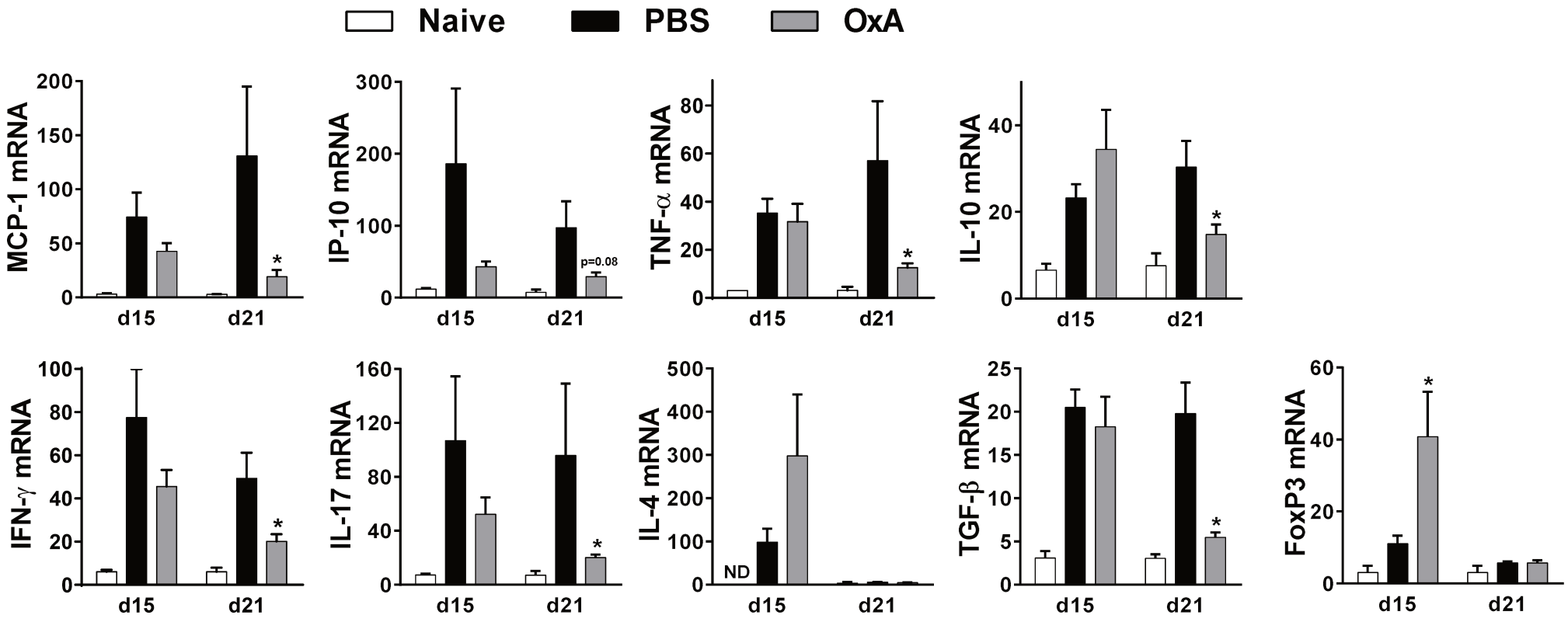



**Figure 3. Orexin A significantly reduces inflammatory responses in the CNS.** The panel shows the mRNA expression of chemokines (*i.e.* MCP-1 or CCL2 and IP-10 or CXCL10), cytokines (*i.e.* TNF-α, IL-10, IFN-γ (Th1), IL-17 (Th17), IL-4 (Th2), and TGF-β) and the transcription factor, Foxp3 (Treg-specific) determined by real time RT-PCR in naive animals and EAE mice (*i.e.* 15 and 21 days after EAE induction in PBS- and OxA-treated mice, n=6/group and n=7/group respectively). *$P<0.05$ (*Mann-Whitney* test, compared to PBS group).

**Orexin A treatment decreases demyelination and astrocyte and microglial activation in the CNS during EAE.** Demyelination is a hallmark of MS and EAE, and is strongly linked to the symptoms of the disease. In order to quantify demyelination in PBS-EAE compared to orexin A-EAE mice, we performed an immunofluorescence staining for myelin basic protein (MBP) on day 21 post-EAE induction. The percentage of MBP stained area in the white matter was significantly reduced in EAE vs. naive mice (**Figure 4A**). Treatment of mice undergoing EAE with orexin A significantly reduced myelin loss (**Figure 4A**).

In addition to immune cells, the pathogenesis of EAE is characterized by the activation of CNS glial cells, which contribute to neurodegenerative processes. We first studied whether or not orexin A affected astrocyte activation by GFAP staining (**Figure 4A**). Astrocyte activation in the spinal cord occurred in response to EAE as reflected by the increase of percentage of stained $GFAP^+$ area (**Figure 4A**). A significant reduction in the percentage of $GFAP^+$ area was found in orexin A- compared to PBS-treated mice, suggesting diminished astrogliosis.

Previous studies have shown an action of orexin A on microglial cell lines *in vitro*. We used the marker Iba1 in order to study myeloid responses in EAE. In naive mice, $Iba1^+$ cells were broadly and evenly distributed in the spinal cord parenchyma (**Figure 4B**). These cells were small and ramified, a morphology typical of resting microglia. In the spinal cords of EAE mice, there was a robust increase in the area of $Iba1^+$ staining close to immune cell infiltration and demyelination sites (**Figure 4B**). Furthermore, suggesting an activated microglia and/or infiltrating monocyte phenotype, $Iba1^+$ cells exhibited a round morphology with shorter processes than resting microglia in naive animals (see inserts). Orexin A diminished the area of $Iba1^+$ staining and thus reduced microglial activation and/or monocyte/macrophage infiltration (**Figure 4B**). Because orexin A was found to increase in cultured microglia the expression of arginase-1 (Arg-1), an enzyme that has been ascribed to the M2 anti-inflammatory phenotype, we performed Iba1 and Arg-1 double staining. All $Arg\text{-}1^+$ cells were $Iba1^+$ and were abundant in EAE mice. However, their numbers were strongly reduced in orexin A-treated EAE mice (**Figure 4B**). This further proves that orexin A blocks microglia activation and macrophage infiltration in EAE mice.

SUBMITTED

Figure 4

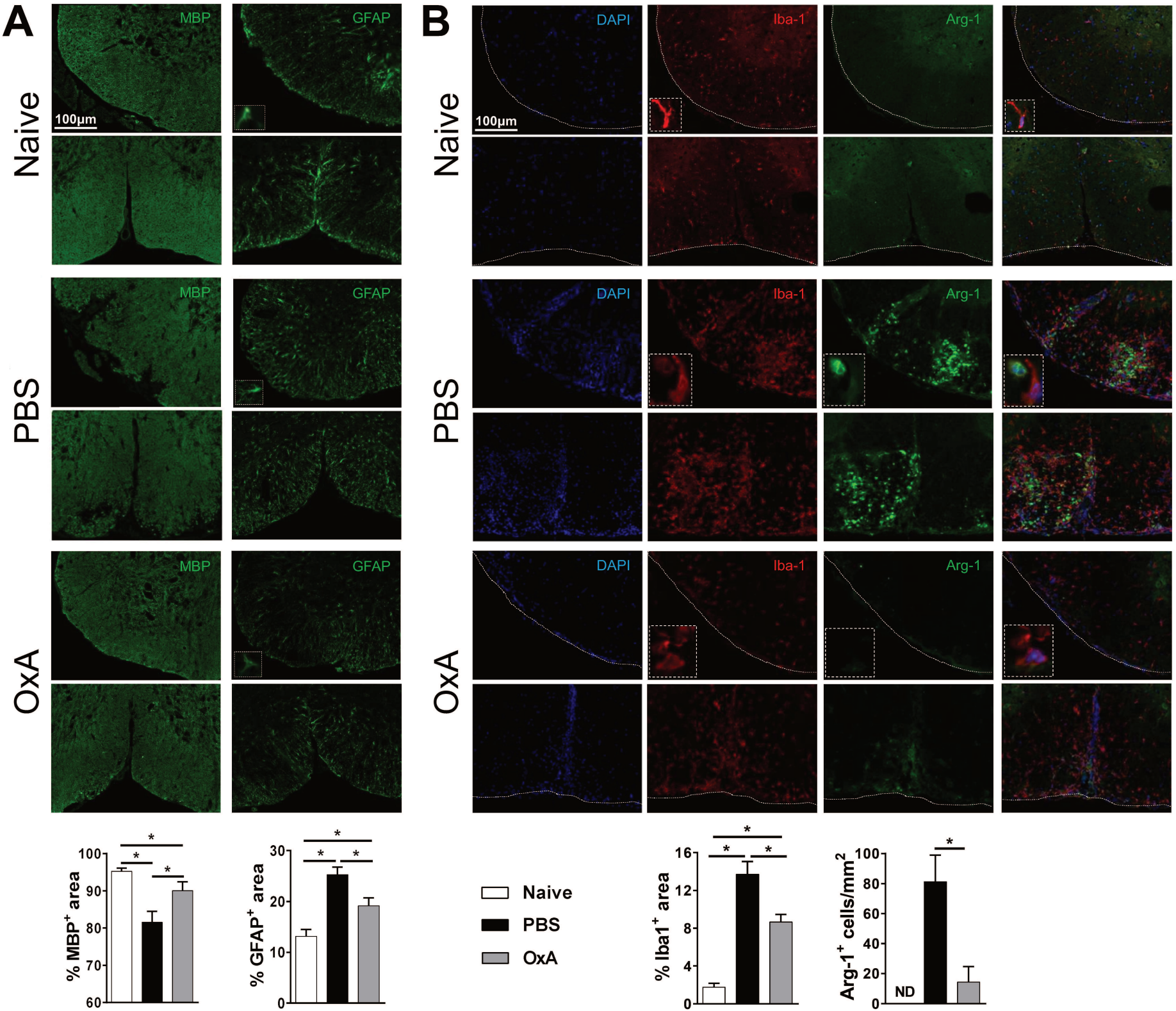

A
B
Naive
PBS
OxA
MBP
GFAP
DAPI
Iba-1
Arg-1
100µm
% MBP+ area
% GFAP+ area
% Iba1+ area
Arg-1+ cells/mm2
ND
Naive
PBS
OxA

**Figure 4. Orexin A strikingly diminishes demyelinating processes, astrogliosis and microglial/macrophage responses in the CNS.** On day 21 post-immunization, spinal cord sections from naive, PBS and OxA groups were prepared and labelled with: **Panel A**, Alexa 488 anti-MBP or Alexa 488 anti-GFAP, and **Panel B**, individual and merged images of DAPI, Cy3 anti-Iba-1 and Alexa 488 anti-Arg-1 stainings. All images were taken at x20 magnification. Two representative areas of spinal cord are shown per experimental group. Graphs show the percentage of MBP, GFAP and Iba1 immunoreactive areas as well as the Arg-1-positive cell number per $mm^2$ of each group (n=7/group). *$P<0.05$ (*Mann-Whitney* test). ND = not detectable.

These results show that orexin A treatment protects from demyelination and may provide neuroprotection by reducing astrocyte and microglial cell activation, two events that are key in neurodegenerative processes.

**Orexin A receptors are expressed in the immune system.** Our results suggest that orexin A has immunoregulatory properties, but to our knowledge the expression of orexin receptors in the immune system has not been described to date. Therefore, we determined the mRNA expression of OX1R and OX2R in primary (thymus) and secondary (cervical, axillary lymph nodes and spleen) immune organs of naive mice by PCR. We found that both receptors are expressed in all immune tissues investigated (**Figure 5A**). In addition, as previously described, orexin receptors exhibited a strong expression in the normal spinal cord and brain (**Figure 5A**). We also studied the expression of OX1R and OX2R in FACS-sorted T lymphocytes ($CD4^+$ and $CD8^+$) and myeloid cells ($CD11b^+$) from naive animals (**Figure 5B**). This revealed that all these immune cell types express both receptors, suggesting that they may directly respond to orexins.

**Orexin A treatment leads to an increase in myeloid and T cell numbers in the draining lymph nodes (DLNs) during EAE pathogenesis.** The discovery of orexin receptors in immune cells in the periphery led us to study the impact of orexin A treatment in myeloid and T cell populations in the DLNs of EAE mice on day 21 post-immunization by flow cytometry. Regarding myeloid cells, the proportion of $CD11b^+$ cells (either $CD11c^-$ or $CD11c^+$) was not altered upon orexin A treatment of EAE-mice but $CD11c^+$ dendritic cells were elevated (**Figure 6A**). Within the CD11b cell subset, we were interested in subpopulations expressing Ly6G and Ly6C (the two components of Gr1), which have been recently implicated in the pathogenesis of autoimmune inflammatory diseases. In general terms, Ly6G is used as a marker of neutrophils and Ly6C labels monocytes. Although their roles in inflammation remains controversial, the $Ly6G^+Ly6C^{low}$ and $Ly6G^-Ly6C^{high}$ phenotypes have been associated in some circumstances with immunosuppression, receiving the names of granulocytic and monocytic myeloid derived suppressor cells (G-MDSCs and M-MDSCs), respectively (Gabrilovich, 2017). Orexin A treatment of EAE mice significantly enhanced the proportion of $Ly6G^+Ly6C^{low}$ cells but reduced the $Ly6G^-Ly6C^{high}$ population (**Figure 6B**). We further characterized the phenotype of these cells, by studying the expressions of MHC class II and CD86, involved in antigen presentation, and PD-L1,



SUBMITTED

# Figure 5

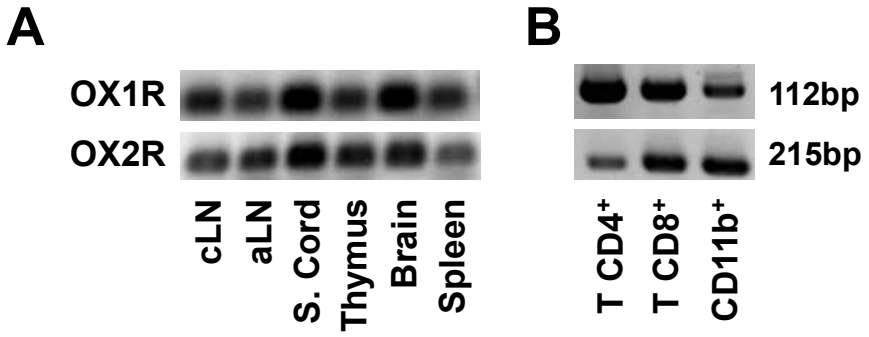



**Figure 5. Orexin A receptors are widely expressed in the immune and nervous systems.** The expression profile of the receptors OX1R and OX2R was determined in naive animals by PCR. RNA was prepared and reversed transcribed from: **Panel A**, immune (cervical/axillary lymph nodes (cLN and aLN, respectively), thymus, spleen) and CNS tissues (brain and spinal cord) and **Panel B**, different immune cell populations such as T $CD4^+$, T $CD8^+$, and $CD11b^+$ splenocytes that were sorted by flow cytometry using the FACS Aria-IIIu (BD Bioscience). The results were assayed by electrophoresis.

# Figure 6

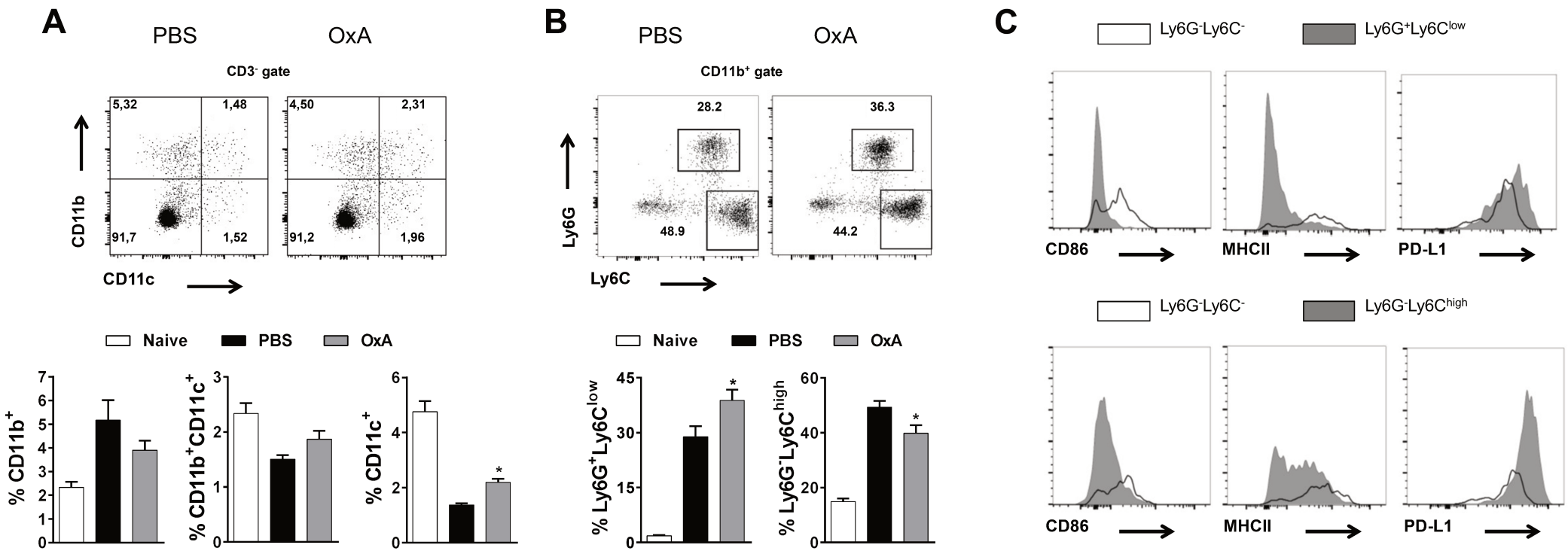



**Figure 6. Orexin A treatment alters myeloid profiles in lymph nodes during the course of EAE.** On day 21 post-EAE induction, draining lymph node cells from naive, PBS and OxA groups were analyzed by flow cytometry. **Panel A**: cells were stained with anti-CD3, anti-CD11b and anti-CD11c antibodies. Representative FACS plots show the percentage of $CD3^{-}CD11b^{+}$, $CD3^{-}CD11c^{+}$ and $CD3^{-}CD11b^{+}CD11c^{+}$ subsets. **Panel B**: cells were stained with anti-CD11b, anti-Ly6C and anti-Ly6G antibodies. Representative FACS plots show the percentage of $CD11b^{+}Ly6G^{+}Ly6C^{low}$ and $CD11b^{+}Ly6G^{-}Ly6C^{high}$ subsets. **Panel C**: histograms show the overlap of CD86, MHCII and PD-L1 between $CD11b^{+}Ly6G^{+}Ly6C^{low}$ (filled area, **top panels**) or $CD11b^{+}Ly6G^{-}Ly6C^{high}$ (filled area, **below panels**) and $CD11b^{+}Ly6G^{-}Ly6C^{-}$ (line) subsets. Graphs show the mean percentage of each subpopulation from naive, PBS and OxA mice (n=7/group). *$P<0.05$ (*Mann-Whitney* test, compared to PBS group).

an important negative costimulatory molecule for T cells. In both PBS- (**Figure 6C**) and orexin A- (not shown) treated mice, $Ly6G^{+}Ly6C^{low}$ and $Ly6G^{-}Ly6C^{high}$ cells expressed lower levels of MHC class II and CD86, but higher PD-L1 than $CD11b^{+}Ly6G^{-}Ly6C^{-}$ cells. This may suggest that these cells have either poor activating capacities or increased suppressive actions. This set of data indicates that orexin A treatment modulates peripheral myeloid cells, with a potential impact on EAE pathogenesis.

The striking reduction in $CD4^{+}$ numbers in the CNS of orexin-treated mice could be subsequent to a modulation of T cell activities at local or peripheral sites. We found no differences on the percentages of DLN $CD4^{+}$ and $CD8^{+}$ cells between orexin A- and PBS-treated mice (**Figure 7A**). To define their activation status, we included markers such as Ki67 (for proliferation), CD69, CD44 and CD62L. No differences were found in the proportions of proliferating ($Ki67^{+}$), early activated ($CD69^{+}$), naive (Tn, $CD44^{-}CD62L^{+}$), effector memory (Tem, $CD44^{+}CD62L^{-}$) or central memory (Tcm, $CD44^{+}CD62L^{+}$) T $CD4^{+}$ and T $CD8^{+}$ cells (**Figure 7B** and **Supplementary Figure 1**). It has been shown that certain GPCR-binding neuropeptides such as VIP, pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP), adrenomedullin and cortistatin, reduce inflammation in EAE by increasing the numbers of Tregs (Fernandez-Martin *et al*., 2006, Tan *et al*., 2009, Pedreno *et al*., 2014, Souza-Moreira *et al*., 2013). Tregs, identified as $CD4^{+}CD25^{+}Foxp3^{+}$ cells, have suppressive activity on lymphocytes, and have been shown to be critical for EAE recovery (O'Connor and Anderton, 2008). Orexin A treatment did not alter the percentages of Tregs or their proliferative status on day 21 (**Figure 7C**). Because we had observed an increased expression of Foxp3 mRNA in the spinal cord on day 15 (**Figure 3**), which may reflect an early increase in Tregs, we also determined the proportion of these cells in the DLNs at this time point. We observed a trend to an increase of Treg proportions in orexin A- compared to PBS-treated mice, but no difference in their proliferation status (**Figure 7D**).

Although the results above show that the proportions of most myeloid and lymphoid cell subsets did not change upon orexin A treatment, we found that the total numbers of myeloid and lymphoid cells in the DLNs were strikingly higher in orexin A- than in PBS-treated mice (**Table 1**). This increase was significant for most of the cell subsets analyzed. The accumulation of immune cells in the lymph nodes of orexin A treated EAE-mice might be linked to a diminished trafficking and infiltration to the CNS, in agreement with our histology findings.

SUBMITTED

# Figure 7

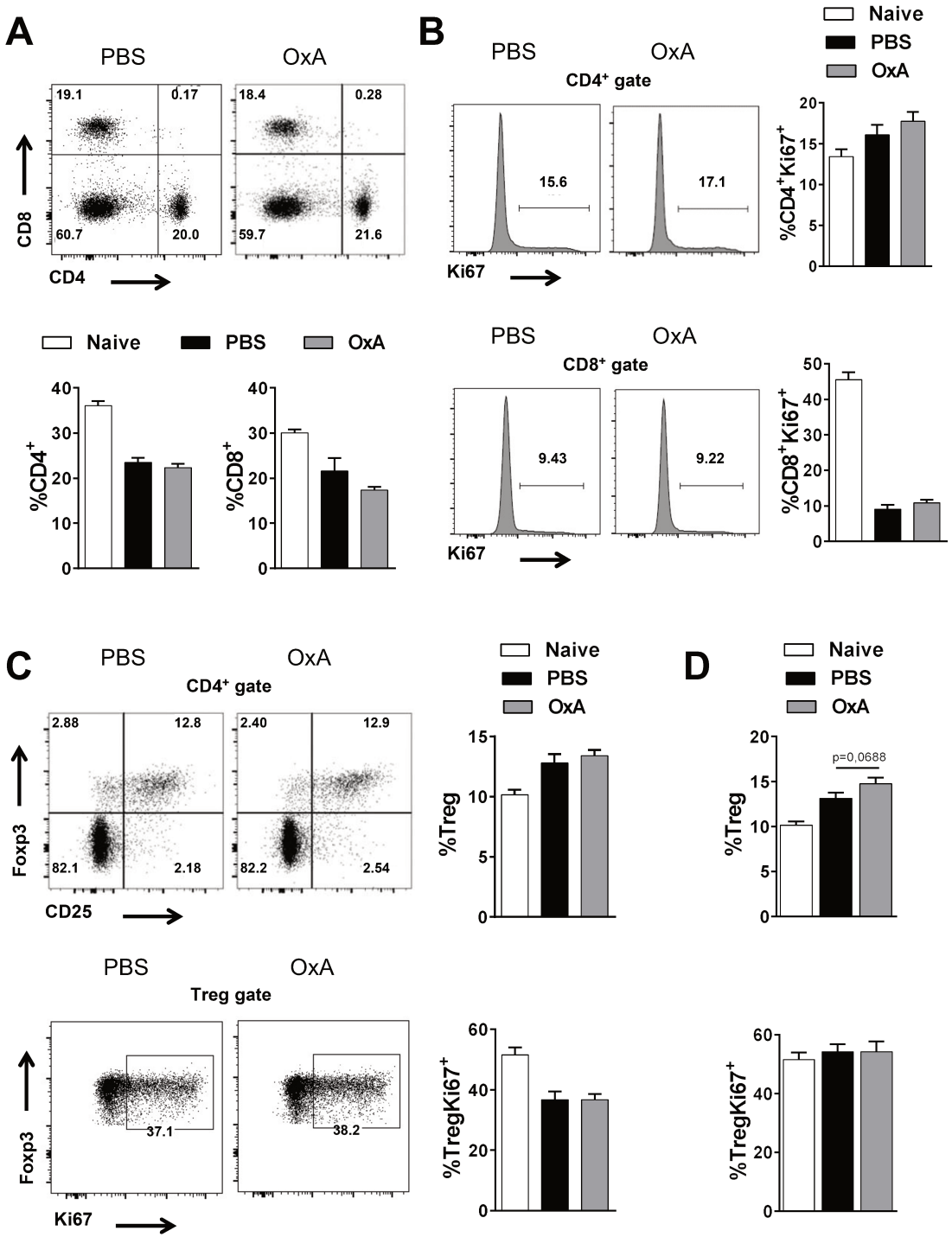



**Figure 7. Orexin A treatment does not impact T cell homeostasis in lymph nodes during EAE.** On day 21 post-EAE induction, draining lymph node cells from naive, PBS and OxA groups were analyzed by flow cytometry. **Panel A**: cells were stained with anti-CD4 and anti-CD8 antibodies. Representative FACS plots show the percentage of $CD4^+$ and $CD8^+$ subsets. **Panel B**: cells were stained with anti-CD4, anti-CD8, and anti-Ki67 (proliferative marker) antibodies. Representative histograms of Ki67 for $CD4^+$ and $CD8^+$ subsets are shown. **Panel C**: Treg assessment was performed by flow cytometry using a mouse regulatory T cell staining kit. Cells were then stained with anti-CD4, anti-CD25, anti-FoxP3, and anti-Ki67 antibodies. Tregs were defined as $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ cells and proliferative Tregs as $CD4^+CD25^+FoxP3^+Ki67^+$ cells. Representative FACS plots show the percentage of Tregs and proliferative Tregs. **Panel D**: shows Treg profile in draining lymph nodes on day 15 post-immunization. Graphs show the mean percentage of each subpopulation from naive, PBS and OxA mice (n=7/group). $^*P<0.05$ (*Mann-Whitney* test, compared to PBS group).

**Cell proliferation and Th1/Th17 responses upon antigenic challenge *in vitro* are not altered in EAE mice treated with orexin A.** Priming of T cells against $MOG_{35-55}$ is critical for EAE development and occurs in the DLNs. Whereas the data above show that orexin A treatment did not alter the proportions of different T cell populations, it does not reveal whether or not it modulates their responsiveness to $MOG_{35-55}$. To address this question, we performed antigen-recall studies in which DLN cells from PBS- or orexin A-treated EAE mice were collected at the peak of the disease (day 15), and stimulated with $MOG_{35-55}$ or the irrelevant antigen ovalbumin *in vitro*. Their proliferation rate was measured by [$^3$H]-thymidine incorporation, and the levels of IFN-γ and IL-17 as Th1 and Th17 cytokines, respectively, were determined by ELISA. Cells from both PBS- and orexin A-treated mice exhibited robust and equivalent proliferation and cytokine productions in response to $MOG_{35-55}$ (**Figures 8A and 8B**). Moreover, these responses were not altered when orexin A was added to the cultures from PBS-treated mice. Confirming the lack of orexin effect on peripheral Th responses, the mRNA levels of IFN-γ, IL-17 and IL-4 (Th2), as well as the chemokine receptors CCR6 and CXCR3 were not different in non-stimulated DLNs cells isolated from PBS or orexin A treated mice (**Supplementary Figure 2**). These results suggest that the therapeutic actions of orexin A do not rely on an impairment of peripheral encephalitogenic Th responses.

**Peripherally-administered orexin A has no effect on demyelination and remyelination in the cuprizone model.** We observed a reduction in demyelination in the EAE model induced by orexin A treatment. However, this could be secondary to the inhibition of the immune response. To study whether or not orexin A exerts direct effects on demyelination and/or remyelination, we used the cuprizone model. Cuprizone is a copper-chelator known to induce the selective death of mature oligodendrocytes leading to T-cell independent demyelination. Once it is removed from the food, spontaneous remyelination occurs. Orexin A given IP during the last six days had no effect on demyelination and remyelination in this model (**Supplementary Figure 3**). This may suggest that orexin A actions on EAE demyelination are dependent on its immune-driven effects.

SUBMITTED

# Figure 8

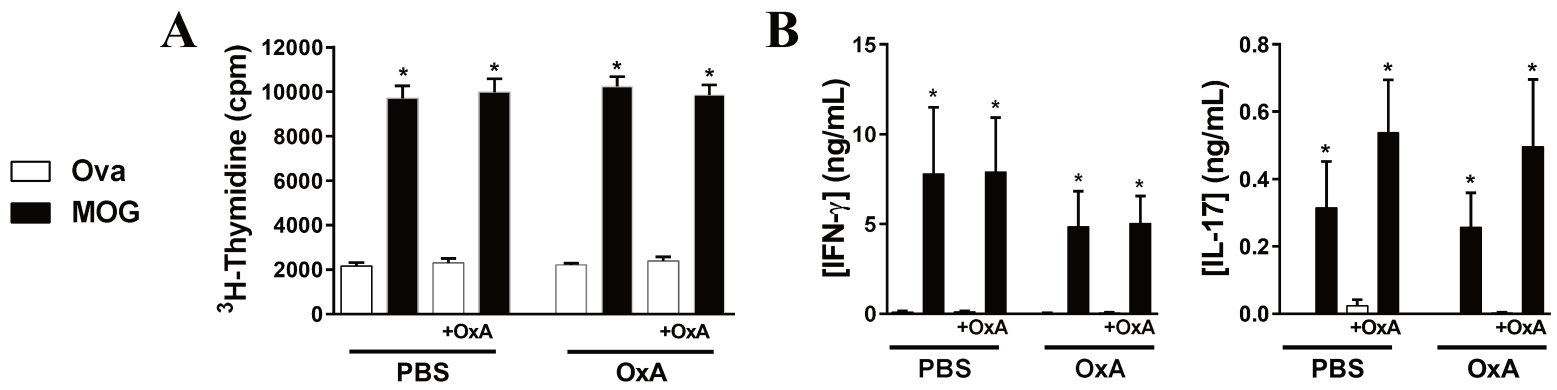



**Figure 8. Orexin A does not interfere MOG-induced proliferation and cytokine release in lymph node cultures from PBS- and OxA-treated EAE mice.** At the peak of the disease, on day 15 post-MOG immunization, draining lymph node cells from PBS- and OxA-treated mice were stimulated *ex vivo* with 20 µg/mL of $MOG_{35-55}$ peptide or ovalbumin (Ova) in the presence or absence of OxA (1 x $10^{-6}$M). **Panel A** shows cell proliferation that was measured by [$^3$H]-thymidine incorporation. **Panel B** shows proinflammatory cytokine (*i.e.* IFN-γ and IL-17) secretion into the culture supernatant measured by ELISA. In both groups, all parameters measured were significantly induced by $MOG_{35-55}$ in comparison with the non-specific antigen, Ova (n=6/group) $P^*<0.05$ (*Mann-Whitney* test, compared to Ova stimulation). No statistical differences were found between PBS and Orexin A treatments.

## Discussion

This is the first demonstration that a systemic delivery of orexin A ameliorates EAE in preventive and curative settings. Interestingly, orexin A had a long-term beneficial effect in clinical disease (*i.e*. maintained until day 30), despite being administered for only five days, reinforcing its interest from a therapeutic standpoint. The amelioration of EAE clinical scores by orexin A was associated to a significant blockade of neuroinflammatory processes in the spinal cord. The efficacy of orexin A delivered peripherally in this study suggests that it may be considered as a novel therapeutic target in MS.

Systemically delivered orexin A effects may modulate local (CNS) and/or peripheral immune responses. We found orexin receptor expression in both CNS and immune tissues of naive mice. A previous report described an upregulation of hypothalamic orexin receptor mRNA expression upon EAE induction in the CNS (Fatemi *et al*., 2016b). The same team, recently reported that a long-term local CNS delivery of orexin A by intracerebroventricular (ICV) administration, attenuated the disease (Fatemi *et al.*, 2016a). Compared to our study (preventive and curative), this treatment started before EAE onset (day 2 post-immunization) and lasted until day 21 post-immunization. ICV delivery of drugs to human patients is often unfeasible, diminishing its interest from a therapeutical standpoint. Whereas IP-delivered orexin A might easily reach immune organs, a direct action at the level of the CNS would require that this neuropeptide crosses the BBB. In this sense, one study demonstrated that intravenously delivered orexin A but not orexin B was capable of crossing the BBB from the blood by simple diffusion (Kastin and Akerstrom, 1999). Others claimed that orexin A cannot cross an intact BBB (Fujiki et al., 2003). Whereas these studies were performed in basal conditions, in the context of inflammation which may alter the permeability of this barrier, peripherally (IP) administered orexin A was capable of crossing the BBB and reach the CNS upon systemic LPS administration (Ogawa *et al*., 2016). Therefore, in the EAE model of CNS inflammation where the BBB is disrupted (Pan et al., 1996) (as in MS patients (Minagar and Alexander, 2003)) both actions at CNS and peripheral levels might be, in principle, possible.

In EAE, encephalitogenic T cells against a myelin antigen are generated in the DLNs close to the immunization site, acquiring proinflammatory Th1 and Th17 profiles

SUBMITTED

(Rangachari and Kuchroo, 2013). Upon their migration to the CNS they are reactivated and trigger a local and deleterious inflammatory response, characterized by the recruitment of immune cells, the production of proinflammatory cytokines and chemokines, the activation of resident glial cells, the loss of the myelin sheath, and ultimately, axonal damage and neurodegeneration (Constantinescu et al., 2011a, Legroux and Arbour, 2015). We found that orexin A treatment strongly reduced the numbers of T $CD4^+$ cells infiltrating the spinal cord at the chronic phase of the disease, and that total numbers of T cells were increased in the lymph nodes of these mice. The peripheral accumulation of these cells might be a consequence of the lack of immune cell trafficking to the CNS rather than increased proliferation. The latter was not altered by orexin treatment as assessed by flow cytometry analysis of Ki67 staining and *ex vivo* antigen-recall assays. Interestingly, $CD4^+$ cell numbers were not altered by orexin A at an earlier time point (15 days post-immunization, data not shown). This may suggest that orexin A treatment may not initially interfere with T cell entry in the CNS, but rather impair mechanisms implicated in the effector phase of the disease. Supporting this hypothesis, the expression of proinflammatory cytokines and chemokines was reduced by orexin A administration on day 21 post-immunization, indicating a blockade of the inflammatory response. Fatemi *et al*. (2016a) reported that orexin A delivered ICV increased CNS TGF-β expression levels. This cytokine has been associated to anti-inflammatory responses in certain contexts. In our study, TGF-β levels were reduced as for the rest of cytokines analyzed, in agreement with a global inhibition of the immune response in the CNS. This discrepancy may be explained by the different administration methods (*i.e*. local vs. systemic) and the duration of the treatment (*i.e*. 20 vs. five days), that may lead to different mechanisms of action.

In addition to downregulating inflammation, orexin A diminished neurodegenerative processes including demyelination and astrocyte and microglial activation. Multiple studies have shown a critical pathological role for astrocytes in neuroinflammation and particularly in EAE. Astrocytes have been recently shown to be activated in response to Th1 and Th17 cytokines *(*Prajeeth *et al*., 2017). Astrocyte activation by Th1 cells seems to be critical for EAE development, since silencing IFN-γ binding/signalling in these cells was shown to ameliorate EAE by downregulating the inflammatory cascade (Ding *et al*., 2015). Moreover, mice with a functional inactivation of the NF-κB pathway in these cells (GFAP-IκBα-dn mice) exhibited reduced EAE with

SUBMITTED

decreased T cell infiltration. Interestingly, astrocytes are a major source of two IFN-γ-inducible chemokines, IP-10 and MCP-1, which promote lymphocyte and monocyte recruitment, respectively (Moreno *et al*., 2014, Mills Ko *et al*., 2014). Selective genetic invalidation of IP-10 or MCP-1 in astrocytes led to reduced EAE supporting their relevance for the amplification of the inflammatory response in the CNS (Moreno *et al*., 2014, Mills Ko *et al*., 2014). In agreement with the decrease of GFAP staining found upon orexin A treatment, the reduction in the expressions of IP-10 and MCP-1 suggests a decrease in astrocyte activation which may contribute to the amelioration of EAE.

Along with astrocytes, myeloid cells in the CNS such as resident microglial cells and infiltrating macrophages, play an important role in the development of the disease. As a source of proinflammatory cytokines and chemokines, they can further amplify the recruitment of immune cells. However, it is well-known that these myeloid cells can also produce anti-inflammatory factors which contribute to the resolution of such immune response. Pro- and anti-inflammatory myeloid phenotypes are often referred to as M1 and M2 and can be induced *in vitro* upon exposure to specific cytokines (Jiang *et al*., 2014). Initial work demonstrated that orexin A induced *in vitro* microglial M2 polarization with increased arginase 1 (Duffy *et al*., 2015). In agreement with other studies, we found increased Iba1-positive cells expressing Arg-1 in EAE mice (Ahn *et al*., 2012, Xu *et al*., 2003). Nevertheless, orexin A strongly reduced the presence of these cells, suggesting that this may not be a mechanism implicated in EAE amelioration. A recent study using LysM-EGFP reporter mice has reported that arginase 1 is only expressed by infiltrating myeloid cells in EAE (Greenhalgh *et al*., 2016). Thus, the reduction in Arg-1-positive cells in our study may correlate with the reduced immune cell infiltration in orexin A-treated animals.

In addition to the CNS, we also studied the effects of orexin A on peripheral myeloid cells. Interestingly, orexin treatment increased the proportion of a subpopulation of cells with a G-MDSC (*i.e*. $CD11b^{+}Ly6G^{+}Ly6C^{low}$) phenotype. Although MDSCs are well-known as suppressive cells of T cell responses in cancer, their role in the pathogenesis of EAE remains controversial. Nevertheless, several studies point to a beneficial effect. For example, MDSCs cells limited spinal cord inflammation during EAE by promoting T lymphocyte apoptosis (Moliné-Velázquez *et al*., 2011). An increase in MDSCs was found in the periphery of MS patients, which

SUBMITTED

suppressed the activation and proliferation of autologous $CD4^+$ T cells *ex vivo* (Ioannou *et al*., 2012). In addition, splenic G-MDSCs from EAE-mice suppressed antigen-specific Th1 and Th17 immune responses and had a therapeutic effect on the disease, which was dependent on PD-L1 expression by these cells (Ioannou *et al*., 2012). We found higher PD-L1 but lower CD86 and MHCII expressions in MDSCs compared to non MDSCs (*i.e*. $CD11b^+Ly6G^-Ly6C^-$) in EAE mice. Whereas the first may be indicative of a putative inhibitory mechanism, the latter may imply a reduction in the co-stimulatory ability of these cells towards T cells.

Our analysis of Th profiles in *ex vivo* experiments suggest that orexin A does not impair the generation of encephalitogenic Th cells in the periphery, but rather disrupt local proinflammatory responses in the CNS. In addition to the reduction in Th1 and Th17 cytokines, we found increase of the mRNA expression of Foxp3, a transcription marker typically expressed by Tregs was found in the CNS only on day 15. Tregs are capable of suppressing T effector functions, and their expansion has been associated to the recovery from EAE (Jadidi-Niaragh and Mirshafiey, 2011, Chen *et al*., 2009). Therefore, this finding could be associated to orexin beneficial actions in EAE.

Our results using the model of cuprizone-induced demyelination/remyelination show no effect of orexin A peripheral administration. This could suggest that orexin effects on EAE on demyelination might be secondary to the inhibition of immune T-cell driven processes. Nevertheless, we cannot exclude that the bioavailability of orexin A in the brain in this model might be lower than that in the EAE model, because of differences in the BBB permeability.

Orexins have raised as novel therapeutic candidates for sleeping disorders. To obtain optimal effects, the development of specific and potent orexin receptor analogs is critical. A great effort has been put in the discovery of orexin antagonists for the treatment of insomnia (Winrow and Renger, 2014). On the contrary, a deficiency of orexin due to degeneration of hypothalamic orexin-producing neurons is associated with narcolepsy, suggesting that an agonist may potentially exert beneficial actions in this pathology (Nishino et al., 2000). Nevertheless, the effects of an orexin agonist on narcolepsy in humans have not been tested yet. At the moment, there are no specific agonists for OX1R, and there is only one full non-peptidic agonist for OX2R, YNT-185

SUBMITTED

(Nagahara et al., 2015). In addition to narcolepsy, our study suggests that the development of orexin receptor agonists is of great interest for the treatment of inflammatory autoimmune diseases like MS.

Finally, our study demonstrates a beneficial action of exogenously administered orexin A in the model of EAE. Whether or not the endogenous source of orexin is protective from MS remains to be elucidated. Both normal (Knudsen et al., 2008, Papuc et al., 2010) or reduced orexin levels in the cerebrospinal fluid of MS patients have been reported (Kato et al., 2003, Oka et al., 2004, Constantinescu et al., 2011b). The latter, which might be secondary to MS CNS lesions, were associated with the presence of hypersomnia. Sleep disorders are common in MS patients, and a connection between narcolepsy and MS has been proposed. Multiple lines of evidence have suggested that MS and narcolepsy/cataplexy may share common genetic traits. Both disorders have been associated with the HLA-DQB1*0602 allele (Fernandes et al., 2018, Svejgaard, 2008) and both are considered to be autoimmune (Barateau et al., 2017). The presence of low levels of orexin in narcolepsy patients might potentially be a trigger for MS. Further studies will be necessary to demonstrate a role for endogenous orexin in MS.

**Conclusions**

Overall, we have demonstrated that systemic administration of orexin A to mice with established EAE led to a reduction of the clinical symptoms and histopathological features of the disease, globally reducing the inflammatory response in the CNS, without altering T cell encephalitogenic peripheral responses. In addition, orexin A treatment was able to reduce demyelination and glial activation in EAE mice. Given our data, we provided the proof-of-concept that peripheral administration with orexin A may be beneficial in MS.

**Authors contributions**

C.A., A.C. and Y. V. T. conceived and designed the study. L.B., C.A., M.L., C.M., L.J., G.R. and Y.V.T. conducted the experiments. L.B., M.L., C.M. and Y.V.T. analyzed the data. C.A., O.B. and Y.V.T. drafted the paper.

SUBMITTED

**Conflict of interests**

None of the authors have a conflicting financial interest in reporting this work.

**References**

ABAD, C. & WASCHEK, J. A. 2011. Immunomodulatory roles of VIP and PACAP in models of multiple sclerosis. *Curr Pharm Des,* 17**,** 1025-35.

AHN, M., YANG, W., KIM, H., JIN, J. K., MOON, C. & SHIN, T. 2012. Immunohistochemical study of arginase-1 in the spinal cords of Lewis rats with experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain Res,* 1453**,** 77-86.

BARATEAU, L., LIBLAU, R., PEYRON, C. & DAUVILLIERS, Y. 2017. Narcolepsy Type 1 as an Autoimmune Disorder: Evidence, and Implications for Pharmacological Treatment. *CNS Drugs,* 31**,** 821-834.

BOSS, C. & ROCH, C. 2017. Orexin research: patent news from 2016. *Expert Opin Ther Pat,* 27**,** 1123-1133.

BULBUL, M., TAN, R., GEMICI, B., ONGUT, G. & IZGUT-UYSAL, V. N. 2008. Effect of orexin-a on ischemia-reperfusion-induced gastric damage in rats. *J Gastroenterol,* 43**,** 202-7.

CHEN, X., FANG, L., SONG, S., GUO, T. B., LIU, A. & ZHANG, J. Z. 2009. Thymic regulation of autoimmune disease by accelerated differentiation of Foxp3+ regulatory T cells through IL-7 signaling pathway. *J Immunol,* 183**,** 6135-44.

CONSTANTINESCU, C. S., FAROOQI, N., O'BRIEN, K. & GRAN, B. 2011a. Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) as a model for multiple sclerosis (MS). *Br J Pharmacol,* 164**,** 1079-106.

CONSTANTINESCU, C. S., NIEPEL, G., PATTERSON, M., JUDD, A., BRAITCH, M., FAHEY, A. J., HARIKRISHNAN, S., EDWARDS, L. J., TENCH, C. R., BENNETT, G. W. & GHATEI, M. 2011b. Orexin A (hypocretin-1) levels are not reduced while cocaine/amphetamine regulated transcript levels are increased in the cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis: no correlation with fatigue and sleepiness. *J Neurol Sci,* 307**,** 127-31.

CURTIS, M. J., BOND, R. A., SPINA, D., AHLUWALIA, A., ALEXANDER, S. P., GIEMBYCZ, M. A., GILCHRIST, A., HOYER, D., INSEL, P. A., IZZO, A. A.,

SUBMITTED

LAWRENCE, A. J., MACEWAN, D. J., MOON, L. D., WONNACOTT, S., WESTON, A. H. & MCGRATH, J. C. 2015. Experimental design and analysis and their reporting: new guidance for publication in BJP. *Br J Pharmacol,* 172**,** 3461-71.

DAVIES, J., CHEN, J., PINK, R., CARTER, D., SAUNDERS, N., SOTIRIADIS, G., BAI, B., PAN, Y., HOWLETT, D., PAYNE, A., RANDEVA, H. & KARTERIS, E. 2015. Orexin receptors exert a neuroprotective effect in Alzheimer's disease (AD) via heterodimerization with GPR103. *Sci Rep,* 5**,** 12584.

DE LECEA, L., KILDUFF, T. S., PEYRON, C., GAO, X., FOYE, P. E., DANIELSON, P. E., FUKUHARA, C., BATTENBERG, E. L., GAUTVIK, V. T., BARTLETT, F. S., FRANKEL, W. N., VAN DEN POL, A. N., BLOOM, F. E., GAUTVIK, K. M. & SUTCLIFFE, J. G. 1998. The hypocretins: hypothalamus-specific peptides with neuroexcitatory activity. *Proc Natl Acad Sci U S A,* 95**,** 322-7.

DING, X., YAN, Y., LI, X., LI, K., CIRIC, B., YANG, J., ZHANG, Y., WU, S., XU, H., CHEN, W., LOVETT-RACKE, A. E., ZHANG, G. X. & ROSTAMI, A. 2015. Silencing IFN-γ binding/signaling in astrocytes versus microglia leads to opposite effects on central nervous system autoimmunity. *J Immunol,* 194**,** 4251-64.

DUFFY, C. M., YUAN, C., WISDORF, L. E., BILLINGTON, C. J., KOTZ, C. M., NIXON, J. P. & BUTTERICK, T. A. 2015. Role of orexin A signaling in dietary palmitic acid-activated microglial cells. *Neurosci Lett,* 606**,** 140-4.

ESMAEILI-MAHANI, S., VAZIFEKHAH, S., PASBAN-ALIABADI, H., ABBASNEJAD, M. & SHEIBANI, V. 2013. Protective effect of orexin-A on 6-hydroxydopamine-induced neurotoxicity in SH-SY5Y human dopaminergic neuroblastoma cells. *Neurochem Int,* 63**,** 719-25.

FATEMI, I., SHAMSIZADEH, A., AYOOBI, F., TAGHIPOUR, Z., SANATI, M. H., ROOHBAKHSH, A. & MOTEVALIAN, M. 2016a. Role of orexin-A in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol,* 291**,** 101-9.

FATEMI, I., SHAMSIZADEH, A., ROOHBAKHSH, A., AYOOBI, F., SANATI, M. H. & MOTEVALIAN, M. 2016b. Increase in mRNA Level of Orexin1 and 2 Receptors Following Induction of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis in Mice. *Iran J Allergy Asthma Immunol,* 15**,** 20-6.

SUBMITTED

FENG, Y., LIU, T., LI, X. Q., LIU, Y., ZHU, X. Y., JANKOVIC, J., PAN, T. H. & WU, Y. C. 2014. Neuroprotection by Orexin-A via HIF-1alpha induction in a cellular model of Parkinson's disease. *Neurosci Lett,* 579**,** 35-40.

FERNANDES, G. B., CREMASCHI, R. C., MANGUEIRA, C. L. P., TUFIK, S. & COELHO, F. M. 2018. Cataplexy plus presence of HLA-DQB1*0602 allele can predict Hypocretin-1 deficiency. *Sleep Med,* 45**,** 146-147.

FERNANDEZ-MARTIN, A., GONZALEZ-REY, E., CHORNY, A., GANEA, D. & DELGADO, M. 2006. Vasoactive intestinal peptide induces regulatory T cells during experimental autoimmune encephalomyelitis. *Eur J Immunol,* 36**,** 318-26.

FUJIKI, N., YOSHIDA, Y., RIPLEY, B., MIGNOT, E. & NISHINO, S. 2003. Effects of IV and ICV hypocretin-1 (orexin A) in hypocretin receptor-2 gene mutated narcoleptic dogs and IV hypocretin-1 replacement therapy in a hypocretin-ligand-deficient narcoleptic dog. *Sleep,* 26**,** 953-9.

GABRILOVICH, D. I. 2017. Myeloid-Derived Suppressor Cells. *Cancer Immunol Res,* 5**,** 3-8.

GILES, D. A., WASHNOCK-SCHMID, J. M., DUNCKER, P. C., DAHLAWI, S., PONATH, G., PITT, D. & SEGAL, B. M. 2017. Myeloid cell plasticity in the evolution of central nervous system autoimmunity. *Ann Neurol*.

GRAYBILL, N. L. & WEISSIG, V. 2017. A review of orexin's unprecedented potential as a novel, highly-specific treatment for various localized and metastatic cancers. *SAGE Open Med,* 5**,** 2050312117735774.

GREENHALGH, A. D., PASSOS DOS SANTOS, R., ZARRUK, J. G., SALMON, C. K., KRONER, A. & DAVID, S. 2016. Arginase-1 is expressed exclusively by infiltrating myeloid cells in CNS injury and disease. *Brain Behav Immun,* 56**,** 61-7.

GRIGORIADIS, N., VAN PESCH, V. & GROUP, P. 2015. A basic overview of multiple sclerosis immunopathology. *Eur J Neurol,* 22 Suppl 2**,** 3-13.

HARADA, S., FUJITA-HAMABE, W. & TOKUYAMA, S. 2011. Effect of orexin-A on post-ischemic glucose intolerance and neuronal damage. *J Pharmacol Sci,* 115**,** 155-63.

HOYER, D. & JACOBSON, L. H. 2013. Orexin in sleep, addiction and more: is the perfect insomnia drug at hand? *Neuropeptides,* 47**,** 477-88.

SUBMITTED

IOANNOU, M., ALISSAFI, T., LAZARIDIS, I., DERAOS, G., MATSOUKAS, J., GRAVANIS, A., MASTORODEMOS, V., PLAITAKIS, A., SHARPE, A., BOUMPAS, D. & VERGINIS, P. 2012. Crucial role of granulocytic myeloid-derived suppressor cells in the regulation of central nervous system autoimmune disease. *J Immunol,* 188**,** 1136-46.

JADIDI-NIARAGH, F. & MIRSHAFIEY, A. 2011. Regulatory T-cell as orchestra leader in immunosuppression process of multiple sclerosis. *Immunopharmacol Immunotoxicol,* 33**,** 545-67.

JIANG, Z., JIANG, J. X. & ZHANG, G. X. 2014. Macrophages: a double-edged sword in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Immunol Lett,* 160**,** 17-22.

KASTIN, A. J. & AKERSTROM, V. 1999. Orexin A but not orexin B rapidly enters brain from blood by simple diffusion. *J Pharmacol Exp Ther,* 289**,** 219-23.

KATO, T., KANBAYASHI, T., YAMAMOTO, K., NAKANO, T., SHIMIZU, T., HASHIMOTO, T. & IKEDA, S. 2003. Hypersomnia and low CSF hypocretin-1 (orexin-A) concentration in a patient with multiple sclerosis showing bilateral hypothalamic lesions. *Intern Med,* 42**,** 743-5.

KITAMURA, E., HAMADA, J., KANAZAWA, N., YONEKURA, J., MASUDA, R., SAKAI, F. & MOCHIZUKI, H. 2010. The effect of orexin-A on the pathological mechanism in the rat focal cerebral ischemia. *Neurosci Res,* 68**,** 154-7.

KNUDSEN, S., JENNUM, P. J., KORSHOLM, K., SHEIKH, S. P., GAMMELTOFT, S. & FREDERIKSEN, J. L. 2008. Normal levels of cerebrospinal fluid hypocretin-1 and daytime sleepiness during attacks of relapsing-remitting multiple sclerosis and monosymptomatic optic neuritis. *Mult Scler,* 14**,** 734-8.

KODADEK, T. & CAI, D. 2010. Chemistry and biology of orexin signaling. *Mol Biosyst,* 6**,** 1366-75.

KUKKONEN, J. P. 2017. Orexin/Hypocretin Signaling. *Curr Top Behav Neurosci,* 33**,** 17-50.

LEGROUX, L. & ARBOUR, N. 2015. Multiple Sclerosis and T Lymphocytes: An Entangled Story. *J Neuroimmune Pharmacol,* 10**,** 528-46.

MILLS KO, E., MA, J. H., GUO, F., MIERS, L., LEE, E., BANNERMAN, P., BURNS, T., KO, D., SOHN, J., SOULIKA, A. M. & PLEASURE, D. 2014. Deletion of astroglial CXCL10 delays clinical onset but does not affect progressive axon loss in a murine autoimmune multiple sclerosis model. *J Neuroinflammation,* 11**,** 105.

SUBMITTED

MINAGAR, A. & ALEXANDER, J. S. 2003. Blood-brain barrier disruption in multiple sclerosis. *Mult Scler,* 9**,** 540-9.

MOLINÉ-VELÁZQUEZ, V., CUERVO, H., VILA-DEL SOL, V., ORTEGA, M. C., CLEMENTE, D. & DE CASTRO, F. 2011. Myeloid-derived suppressor cells limit the inflammation by promoting T lymphocyte apoptosis in the spinal cord of a murine model of multiple sclerosis. *Brain Pathol,* 21**,** 678-91.

MORENO, M., BANNERMAN, P., MA, J., GUO, F., MIERS, L., SOULIKA, A. M. & PLEASURE, D. 2014. Conditional ablation of astroglial CCL2 suppresses CNS accumulation of M1 macrophages and preserves axons in mice with MOG peptide EAE. *J Neurosci,* 34**,** 8175-85.

NAGAHARA, T., SAITOH, T., KUTSUMURA, N., IRUKAYAMA-TOMOBE, Y., OGAWA, Y., KURODA, D., GOUDA, H., KUMAGAI, H., FUJII, H., YANAGISAWA, M. & NAGASE, H. 2015. Design and Synthesis of Non-Peptide, Selective Orexin Receptor 2 Agonists. *J Med Chem,* 58**,** 7931-7.

NISHINO, S., RIPLEY, B., OVEREEM, S., LAMMERS, G. J. & MIGNOT, E. 2000. Hypocretin (orexin) deficiency in human narcolepsy. *Lancet,* 355**,** 39-40.

O'CONNOR, R. A. & ANDERTON, S. M. 2008. Foxp3+ regulatory T cells in the control of experimental CNS autoimmune disease. *J Neuroimmunol,* 193**,** 1-11.

OGAWA, Y., IRUKAYAMA-TOMOBE, Y., MURAKOSHI, N., KIYAMA, M., ISHIKAWA, Y., HOSOKAWA, N., TOMINAGA, H., UCHIDA, S., KIMURA, S., KANUKA, M., MORITA, M., HAMADA, M., TAKAHASHI, S., HAYASHI, Y. & YANAGISAWA, M. 2016. Peripherally administered orexin improves survival of mice with endotoxin shock. *Elife,* 5.

OKA, Y., KANBAYASHI, T., MEZAKI, T., ISEKI, K., MATSUBAYASHI, J., MURAKAMI, G., MATSUI, M., SHIMIZU, T. & SHIBASAKI, H. 2004. Low CSF hypocretin-1/orexin-A associated with hypersomnia secondary to hypothalamic lesion in a case of multiple sclerosis. *J Neurol,* 251**,** 885-6.

PAN, W., BANKS, W. A., KENNEDY, M. K., GUTIERREZ, E. G. & KASTIN, A. J. 1996. Differential permeability of the BBB in acute EAE: enhanced transport of TNT-alpha. *Am J Physiol,* 271**,** E636-42.

PAPUC, E., STELMASIAK, Z., GRIEB, P., PAWEL, G. & REJDAK, K. 2010. CSF hypocretin-1 concentrations correlate with the level of fatigue in multiple sclerosis patients. *Neurosci Lett,* 474**,** 9-12.

SUBMITTED

PASBAN-ALIABADI, H., ESMAEILI-MAHANI, S. & ABBASNEJAD, M. 2017. Orexin-A Protects Human Neuroblastoma SH-SY5Y Cells Against 6-Hydroxydopamine-Induced Neurotoxicity: Involvement of PKC and PI3K Signaling Pathways. *Rejuvenation Res,* 20**,** 125-133.

PEDRENO, M., MORELL, M., ROBLEDO, G., SOUZA-MOREIRA, L., FORTE-LAGO, I., CARO, M., O'VALLE, F., GANEA, D. & GONZALEZ-REY, E. 2014. Adrenomedullin protects from experimental autoimmune encephalomyelitis at multiple levels. *Brain Behav Immun,* 37**,** 152-63.

PRAJEETH, C. K., KRONISCH, J., KHOROOSHI, R., KNIER, B., TOFT-HANSEN, H., GUDI, V., FLOESS, S., HUEHN, J., OWENS, T., KORN, T. & STANGEL, M. 2017. Effectors of Th1 and Th17 cells act on astrocytes and augment their neuroinflammatory properties. *J Neuroinflammation,* 14**,** 204.

RANGACHARI, M. & KUCHROO, V. K. 2013. Using EAE to better understand principles of immune function and autoimmune pathology. *J Autoimmun,* 45**,** 31-9.

SAKURAI, T., AMEMIYA, A., ISHII, M., MATSUZAKI, I., CHEMELLI, R. M., TANAKA, H., WILLIAMS, S. C., RICHARSON, J. A., KOZLOWSKI, G. P., WILSON, S., ARCH, J. R., BUCKINGHAM, R. E., HAYNES, A. C., CARR, S. A., ANNAN, R. S., MCNULTY, D. E., LIU, W. S., TERRETT, J. A., ELSHOURBAGY, N. A., BERGSMA, D. J. & YANAGISAWA, M. 1998. Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell,* 92**,** 1 page following 696.

SOKOLOWSKA, P., URBANSKA, A., BIEGANSKA, K., WAGNER, W., CISZEWSKI, W., NAMIECINSKA, M. & ZAWILSKA, J. B. 2014. Orexins protect neuronal cell cultures against hypoxic stress: an involvement of Akt signaling. *J Mol Neurosci,* 52**,** 48-55.

SOUZA-MOREIRA, L., MORELL, M., DELGADO-MAROTO, V., PEDRENO, M., MARTINEZ-ESCUDERO, L., CARO, M., O'VALLE, F., LUQUE, R., GALLO, M., DE LECEA, L., CASTANO, J. P. & GONZALEZ-REY, E. 2013. Paradoxical effect of cortistatin treatment and its deficiency on experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol,* 191**,** 2144-54.

STOOLMAN, J. S., DUNCKER, P. C., HUBER, A. K. & SEGAL, B. M. 2014. Site-specific chemokine expression regulates central nervous system inflammation

SUBMITTED

and determines clinical phenotype in autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol,* 193**,** 564-70.

SVEJGAARD, A. 2008. The immunogenetics of multiple sclerosis. *Immunogenetics,* 60**,** 275-86.

TAN, Y. V., ABAD, C., LOPEZ, R., DONG, H., LIU, S., LEE, A., GOMARIZ, R. P., LECETA, J. & WASCHEK, J. A. 2009. Pituitary adenylyl cyclase-activating polypeptide is an intrinsic regulator of Treg abundance and protects against experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proc Natl Acad Sci U S A,* 106**,** 2012-7.

TSUJINO, N. & SAKURAI, T. 2009. Orexin/hypocretin: a neuropeptide at the interface of sleep, energy homeostasis, and reward system. *Pharmacol Rev,* 61**,** 162-76.

WINROW, C. J. & RENGER, J. J. 2014. Discovery and development of orexin receptor antagonists as therapeutics for insomnia. *Br J Pharmacol,* 171**,** 283-93.

XIONG, X., WHITE, R. E., XU, L., YANG, L., SUN, X., ZOU, B., PASCUAL, C., SAKURAI, T., GIFFARD, R. G. & XIE, X. S. 2013. Mitigation of murine focal cerebral ischemia by the hypocretin/orexin system is associated with reduced inflammation. *Stroke,* 44**,** 764-70.

XU, L., HILLIARD, B., CARMODY, R. J., TSABARY, G., SHIN, H., CHRISTIANSON, D. W. & CHEN, Y. H. 2003. Arginase and autoimmune inflammation in the central nervous system. *Immunology,* 110**,** 141-8.

YUAN, L. B., DONG, H. L., ZHANG, H. P., ZHAO, R. N., GONG, G., CHEN, X. M., ZHANG, L. N. & XIONG, L. 2011. Neuroprotective effect of orexin-A is mediated by an increase of hypoxia-inducible factor-1 activity in rat. *Anesthesiology,* 114**,** 340-54.

SUBMITTED

# Table 1

| | TOTAL CELL NUMBER | | |
|---|---|---|---|
| | **Naive** | **PBS** | **OxA** |
| **DLN** | $4.86\pm0.7\times10^{6}$ | $9.46\pm2.4\times10^{6}$ | $26.97\pm3.9\times10^{6}$ * |
| **Myeloid cells** | | | |
| **$CD11b^{+}$** | $1.96\pm0,3\times10^{4}$ | $19.44\pm3.7\times10^{4}$ | $57.37\pm11.5\times10^{4}$* |
| **$CD11c^{+}$** | $3.96\pm0.7\times10^{4}$ | $7.13\pm2.1\times10^{4}$ | $32.94\pm6.0\times10^{4}$* |
| **$CD11b^{+}CD11c^{+}$** | $1.97\pm0.3\times10^{4}$ | $7.38\pm2.1\times10^{4}$ | $27.09\pm4.5\times10^{4}$* |
| **$Ly6G^{+}Ly6C^{low}$** | $3.92\pm1.1\times10^{4}$ | $5.24\pm0.9\times10^{4}$ | $22.65\pm5.1\times10^{4}$* |
| **$Ly6G^{-}Ly6C^{high}$** | $0.31\pm0.08\times10^{4}$ | $9.59\pm1.9\times10^{4}$ | $22.61\pm4.6\times10^{4}$* |
| **$CD4^{+}$ cells** | | | |
| **$CD4^{+}$** | $1.63\pm0.2\times10^{6}$ | $2.15\pm0.4\times10^{6}$ | $5.51\pm0.8\times10^{6}$ * |
| **$Ki67^{+}$** | $8.92\pm1.3\times10^{4}$ | $33.41\pm8.8\times10^{4}$ | $95.39\pm14.6\times10^{4}$ * |
| **$CD69^{+}$** | $8.93\pm1.2\times10^{4}$ | $4.26\pm1.2\times10^{4}$ | $9.61\pm4.1\times10^{4}$ |
| **$CD44^{+}CD62L^{+}$ (Tcm)** | $11.47\pm1.7\times10^{4}$ | $23.97\pm5.8\times10^{4}$ | $57.31\pm8.4\times10^{4}$ * |
| **$CD44^{+}CD62L^{-}$ (Tem)** | $9.83\pm1.0\times10^{4}$ | $149.7\pm28.1\times10^{4}$ | $394.7\pm64.9\times10^{4}$ * |
| **$CD44^{-}CD62L^{+}$ (Tn)** | $137.0\pm20.0\times10^{4}$ | $34.21\pm8.5\times10^{4}$ | $80.32\pm12.84\times10^{4}$ * |
| **$CD8^{+}$ cells** | | | |
| **$CD8^{+}$** | $1.36\pm0.2\times10^{6}$ | $1.87\pm0.4\times10^{6}$ | $4.28\pm0.7\times10^{6}$ * |
| **$Ki67^{+}$** | $61.54\pm9.0\times10^{4}$ | $16.59\pm4.2\times10^{4}$ | $45.13\pm6.5\times10^{4}$ * |
| **$CD69^{+}$** | $6.16\pm0.8\times10^{4}$ | $4.23\pm1.3\times10^{4}$ | $8.34\pm3.3\times10^{4}$ |
| **$CD44^{+}CD62L^{+}$ (Tcm)** | $20.69\pm2.5\times10^{4}$ | $34.0\pm10.5\times10^{4}$ | $70.94\pm14.7\times10^{4}$ |
| **$CD44^{+}CD62L^{-}$ (Tem)** | $1.16\pm0.1\times10^{4}$ | $144.2\pm26.7\times10^{4}$ | $333.5\pm53.8\times10^{4}$ * |
| **$CD44^{-}CD62L^{+}$ (Tn)** | $112.8\pm16.8\times10^{4}$ | $3.43\pm0.7\times10^{4}$ | $9.24\pm1.4\times10^{4}$* |
| **Tregs** | $16.10\pm1.9\times10^{4}$ | $28.88\pm6.7\times10^{4}$ | $72.92\pm10.8\times10^{4}$ * |
| **$Ki67^{+}$Tregs** | $8.20\pm1.0\times10^{4}$ | $10.73\pm2.7\times10^{4}$ | $26.48\pm4.1\times10^{4}$* |

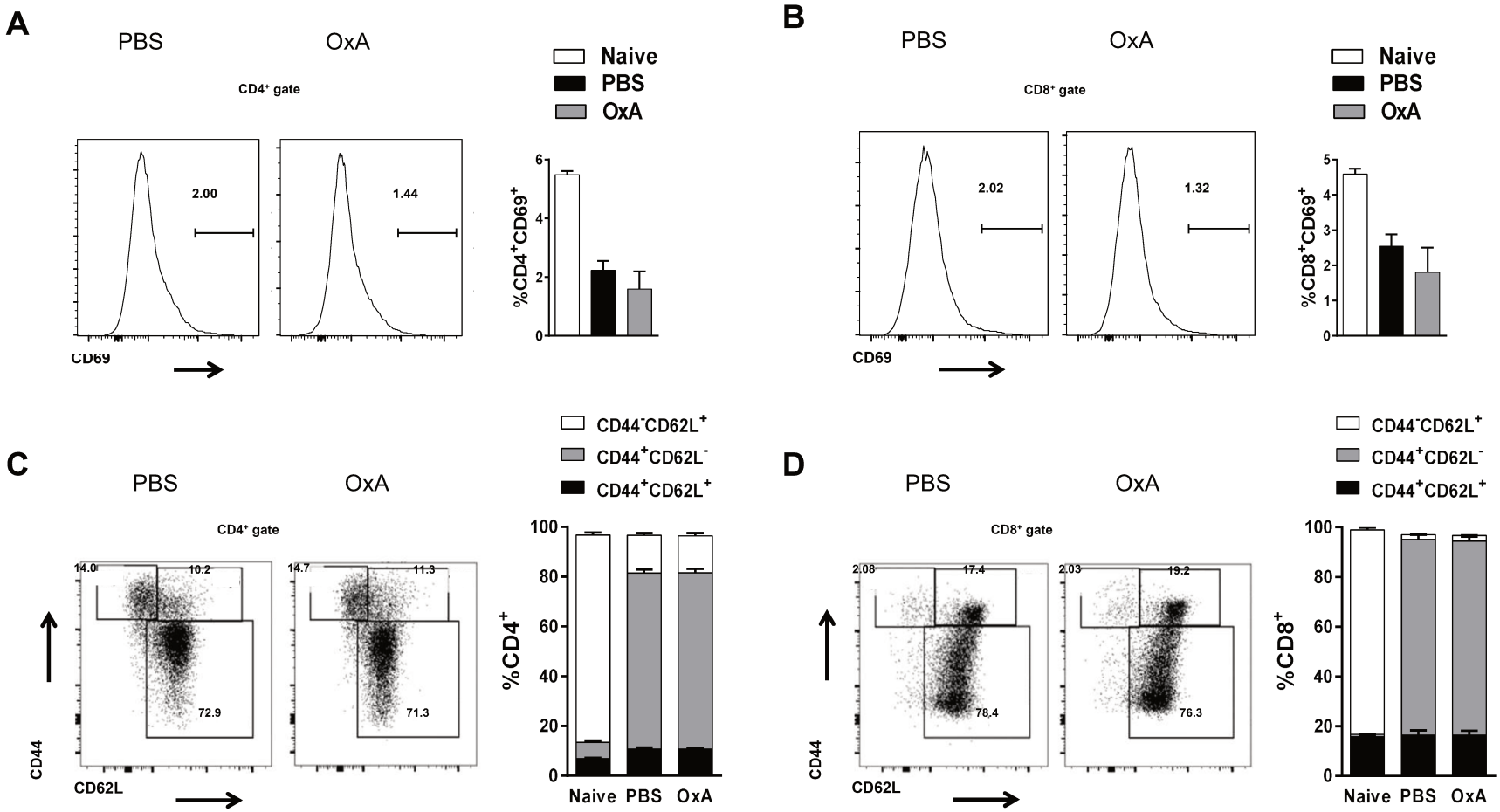
**Table 1.** On day 21 after MOG-immunization, draining lymph node cells from naive, PBS and OxA groups were analyzed by flow cytometry (n=7/group). Table shows the absolute numbers of each subpopulation (*i.e.* myeloid cells, $CD4^{+}$, and $CD8^{+}$ cells). *$P<0.05$ (*Mann-Whitney test*, compared to PBS group).

# Supplementary Table 1

| Gene | GenBank Accession Number | Primer sequence | |
|---|---|---|---|
| | | Sense | Antisense |
| **Target Gene** | | | |
| **Foxp3** | NM_054039 | 5'-GTATTGAGGGTGGGTGTCAGG-3' | 5'-GTCAGAGGCAGGCTGGATAAC-3' |
| **Hcrtr1** | NM_198959 | 5'-GAGCACTGGGCAGATGAACTCT-3' | 5'-TGCGGAAGATCTGGAAATAGGC-3' |
| **Hcrtr2** | NM_198962 | 5'-GGTTCATCATCGCCAAGGAGAC-3' | 5'-TGAGTCGGGTATCCTCATCATAG-3' |
| **Ifng** | NM_008337 | 5'-GCAACAGCAAGGCGAAAAAG-3' | 5'-ATCTCTTCCCCACCCCGAAT-3' |
| **Il4** | NM_021283 | 5'-CGAGGTCACAGGAGAAGGGA-3' | 5'-AAGCCCTACAGACGAGCTCACT-3' |
| **Il10** | NM_010548 | 5'-GGTTGCCAAGCCTTATCGGA-3' | 5'-ACCTGCTCCACTGCCTTGCT-3' |
| **Il17a** | NM_010552 | 5'-GGAGAGCTTCATCTGTGTCTCTG-3' | 5'-TTGGCCTCAGTGTTTGGACA-3' |
| **Ip-10** | NM_021274 | 5'-TGCTGGGTCTGAGTGGGACT-3' | 5'-CCCTATGGCCCTCATTCTCAC-3' |
| **Mcp-1** | NM_011333 | 5'-AAAAACCTGGATCGGAACCAA-3' | 5'-CGGGTCAACTTCACATTCAAAG-3' |
| **Tgfb1** | NM_011577 | 5'-TGCGCTTGCAGAGATTAAAA-3' | 5'-AGCCCTGTATTCCGTCTCCT-3' |
| **Tnfa** | NM_013693 | 5'-GGTGCCTATGTCTCAGCCTCTT-3' | 5'-CGATCACCCCGAAGTTCAGTA-3' |
| **Housekeeping Gene** | | | |
| **Hprt** | NM_013556 | 5'-TGGTGAAAAGGACCTCTCGAA-3' | 5'-TCAAGGGCATATCCAACAACA-3' |

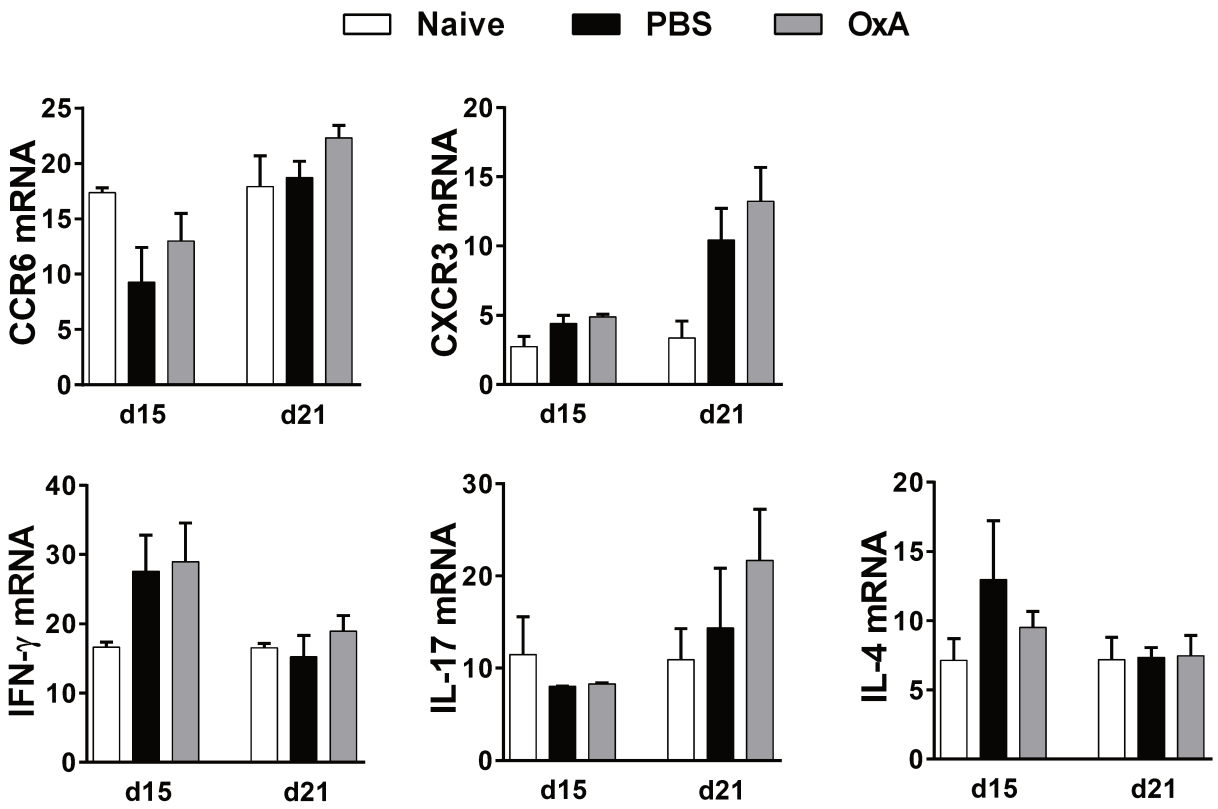
**Supplementary Table 1. List of primer sets used for PCR and real time RT-PCR.**

# Supplementary Figure 1



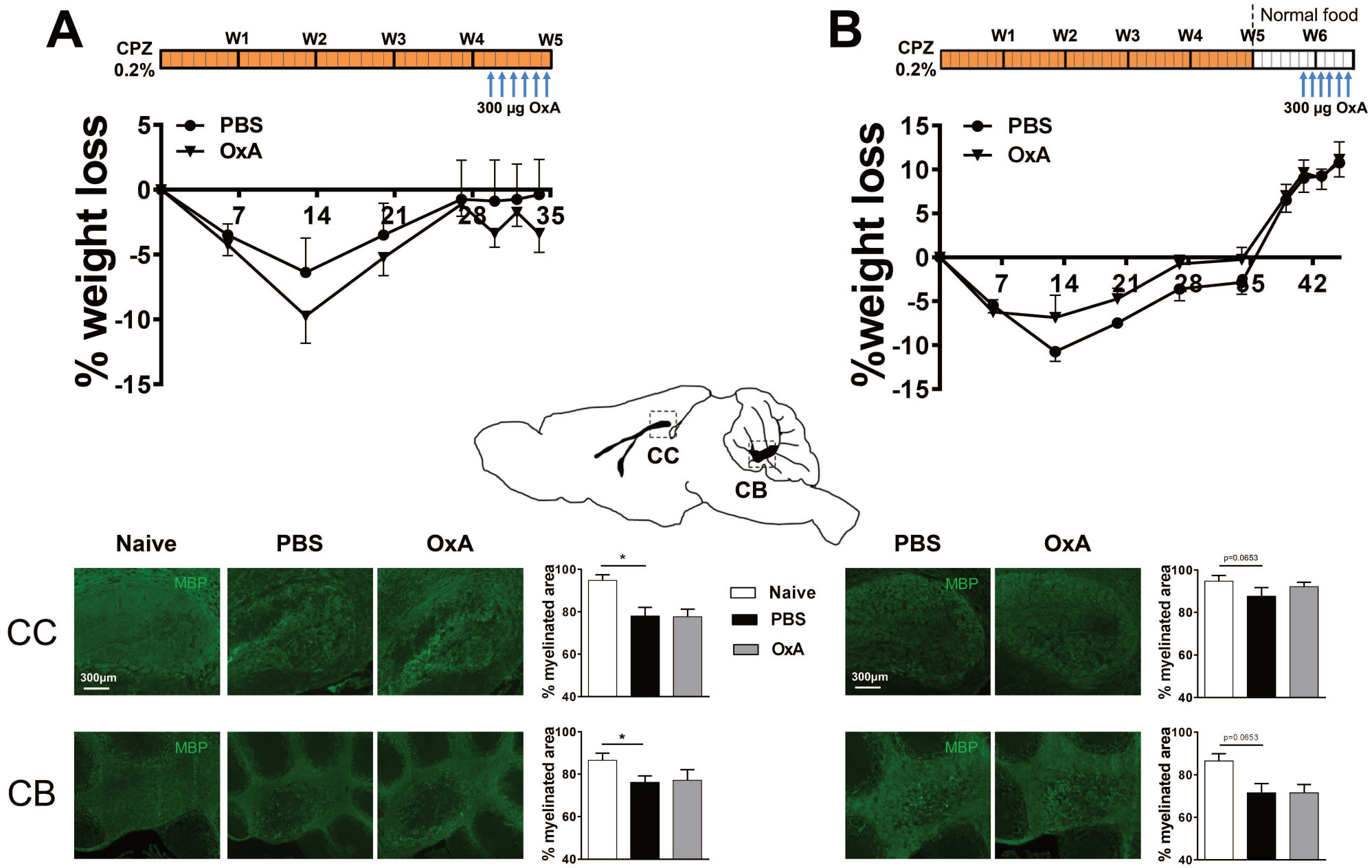

**Supplementary Figure 1. Orexin A treatment does not modulate the naïve and memory T cell profiles in the draining lymph nodes during EAE.** On day 21 post-EAE induction, draining lymph nodes were harvested from naïve, PBS and OxA groups. Cells were analyzed by flow cytometry. In **Panel A** and **Panel B**, cells were stained with anti-CD4, anti-CD8 and anti-CD69 antibodies. Representative histograms of CD69 for $CD4^+$ and $CD8^+$ cells are shown. In **Panel C** and **Panel D**, cells were stained with anti-CD4, anti-CD8, anti-CD44, anti-CD62L antibodies. Representative FACS plots of the percentage of $CD44^+CD62L^-$ (effector memory T, Tem), $CD44^+CD62L^+$ (central memory T, Tcm) and $CD44^-CD62L^+$ (naïve T, Tn) subsets are shown. Graphs show the percentage of each subpopulation from naïve, PBS and OxA mice (n=7/group).

# Supplementary Figure 2




**Supplementary Figure 2. Orexin A does not alter cytokine and chemokine receptor expression in the draining lymph nodes during EAE.** The level of cytokine (*i.e.* IFNγ (Th1), IL-17 (Th17) and IL-4 (Th2)) and chemokine receptor (CXCR3 and CCR6) mRNA expressions were determined by real time RT-PCR in naïve and EAE mice (*i.e.* 15 and 21 days after EAE induction in PBS- and OxA-treated mice; n=6/group).

# Supplementary Figure 3



**Supplementary Figure 3. Orexin A does not alter demyelination or remyelination in the cuprizone model.** In order to induce demyelination, C57BL/6Rj mice were given 0.2% of cuprizone (Sigma) mixed with normal powder food for five weeks (**Panel A**). For remyelination studies, after five weeks of cuprizone, mice were switched to normal powder food (without cuprizone) for eleven days (**Panel B**). In each model, mice were given daily IP injections of 300 µg of orexin A in 200 µL of PBS on the last six days of each protocol, and then sacrificed. Mice were weighed once per week until the start of orexin A treatment, and then weighed every day until the end of the treatment. Immunofluorescence staining of MBP was performed and MBP stained area was measured in two brain zones that were found to be highly demyelinated in this model, the corpus callosum (CC) and white substance of the cerebellum (CB). Representative images taken with an 20X objective are shown. The mean demyelination percentage of each of these areas is shown (n=8/group). *$P<0.05$ (*Mann-Whitney* test).

Au cours de cette étude, nous avons observé que l'administration de l'orexine A :

- diminue significativement la gravité de l'EAE chronique ;
- réduit l'infiltration des lymphocytes T $CD4^+$ auto-réactifs et les taux en ARNm de cytokines et chimiokines au niveau du SNC ;
- diminue la démyélinisation, l'astrogliose et l'activation microgliale ;
- n'a pas d'effet sur la prolifération des cellules issues de ganglions lymphatiques drainants et sur la production cytokinique à la suite d'une stimulation par le peptide $MOG_{35-55}$ *in vitro* ;
- n'impacte pas les processus de démyélinisation et de remyélinisation au cours du modèle de la CPZ.

Ces résultats suggèrent que l'orexine pourrait être un nouveau candidat thérapeutique qui devrait être étudié en amont pour le traitement de la SEP.

# V. Discussion et perspectives

# Discussion et perspectives

## Chapitre 1. Discussion et perspectives des deux articles présentés

### A. L'étude de l'agoniste de VPAC2

#### 1) Discussion

Cette étude a montré que l'agoniste de VPAC2, $BAY_{55\text{-}9837}$, par son administration systémique à court terme diminue significativement la gravité de l'EAE chronique accompagnée d'une forte réduction de l'infiltration des cellules immunitaires dans le SNC.

Une réponse immunitaire optimale nécessite l'interaction entre les lymphocytes et les CPA. De plus, pour être activés complétement, les lymphocytes T ont besoin de l'interaction entre les molécules du CMH et leur TCR ainsi que de la présence de différentes molécules de co-stimulation telles que CD86 à la surface des CPA. Une étude a démontré que VIP et PACAP favorisent l'expression de cette molécule *in vitro* à la surface des cellules dendritiques immatures alors qu'ils l'inhibent lorsque les cellules sont stimulées avec le LPS (Delgado et al., 2004a). VIP et PACAP diminuent également drastiquement la capacité des cellules dendritiques matures à stimuler la prolifération des lymphocytes Th ainsi que la sécrétion de cytokines de type Th1 et Th2. De plus, en conditions inflammatoires, VIP induit le développement de cellules dendritiques $CD11c^+$ tolérogéniques qui sont capables de promouvoir les lymphocytes Treg. Au cours de l'EAE, l'administration de ces cellules $CD11c^+$ tolérogéniques provoque la génération de lymphocytes Treg ainsi qu'une diminution de la gravité de la maladie (Delgado *et al.*, 2005b). En revanche, l'administration de l'agoniste de VPAC2 ne modifie pas l'expression de CD86 à la surface des CPA au pic de la maladie (résultats non montrés). Cela peut expliquer l'absence de différence des taux en cytokines (IFN-γ, IL-17 et IL-10) par les cellules provenant des ganglions lymphatiques entre les souris témoins et celles traitées par l'agoniste, après stimulation *ex-vivo* par la MOG. Cependant, nous avons observé une augmentation significative de la population $CD11c^+$ ainsi qu'une expression plus faible de CD86 à la surface des cellules dendritiques $CD11c^+$ et des monocytes $CD11b^+$ suggérant une activité moindre de CPA.

Un défaut de la population des Treg est une des signatures des maladies chroniques et autoimmunes telles que la SEP. A partir des résultats obtenus après immunisation de souris KO VPAC2 (Tan *et al.*, 2015), nous avons étudié l'impact de l'agoniste de VPAC2 sur cette

population T régulatrice. 15 jours après l'immunisation, le pourcentage en lymphocytes Treg $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ est significativement augmenté au sein des ganglions lymphatiques drainants des souris traitées par l'agoniste. De la même manière, la proportion en lymphocytes T $CD69^+CD4^+$ est significativement augmentée. Ces deux élévations sont en adéquation avec les résultats de l'étude de Radulovic (Radulovic *et al.*, 2012). En effet, ils ont démontré que le transfert de lymphocytes T $CD4^+CD69^-$ à des souris Rag-$1^{-/-}$ provoque une exacerbation de la gravité d'une colite ulcéreuse induite par le *dextran sodium sulphate*. L'aggravation de la maladie est due à une plus faible induction de la population des lymphocytes Treg $FoxP3^+$. Durant la phase tardive de la maladie, nous avons observé une diminution significative de la proportion des lymphocytes T $CD4^+CD69^+$ dans les ganglions lymphatiques ainsi que celle des lymphocytes Treg dans le thymus au cours de la phase tardive de la maladie. Ces résultats sont probablement la conséquence de la résolution de l'inflammation grâce au traitement par $BAY_{55\text{-}9837}$.

Tout cela suggère une phase d'immunisation moins efficace chez les souris traitées par l'agoniste de VPAC2 par rapport aux souris témoins.

Dans l'optique de comprendre les mécanismes de $BAY_{55\text{-}9837}$ au niveau du SNC, nous avons étudié l'expression en ARNm de différents médiateurs de la réponse immunitaire dans la moelle épinière durant la phase tardive de la maladie. La diminution significative des taux en ARNm de RORγT et d'iNOS ainsi qu'une tendance à la baisse des autres gènes pro- et anti-inflammatoires étudiés nous confirme l'efficacité moindre de la phase d'immunisation lorsque les souris ont été traitées par l'agoniste de VPAC2. De plus, les analyses d'immunofluorescence à partir de sections de moelle épinière ont montré une tendance à l'augmentation de l'aire positive pour le marqueur MBP chez le groupe traité, suggérant des processus de démyélinisation amoindris. Nous avons également observé une augmentation significative de l'aire positive pour le marqueur Iba-1, marqueur des macrophages/microglie, lorsque les souris ont été traitées par $BAY_{55\text{-}9837}$. Les macrophages et/ou la microglie ont deux phénotypes différents : les macrophages/microglie pro-inflammatoires et anti-inflammatoires, caractérisés par l'expression respective d'iNOS et d'Arg-1 (Jiang *et al.*, 2014). La diminution du taux en ARNm d'iNOS et l'augmentation de la proportion en macrophages/microglie Iba-$1^+$ suggèrent que le traitement favorise un phénotype anti-inflammatoire.

Dans les formes progressives de la SEP, les processus de neurodégénération prédominent ceux de l'inflammation. Pour déterminer si la diminution des processus de démyélinisation dans l'EAE induite par l'agoniste est seulement provoquée par la réduction de l'inflammation, nous avons utilisé le modèle toxique de la CPZ, indépendant de l'implication des lymphocytes T (Sachs *et al.*, 2014). La CPZ induit la mort des oligodendrocytes matures aboutissant à la démyélinisation. Notre étude a démontré que l'administration de $BAY_{55\text{-}9837}$ de façon systémique pendant 6 jours avant le sacrifice induit une diminution la destruction de la myéline par une augmentation de facteurs anti-inflammatoires comme l'Arg-1 et l'IL-10 au cours de la phase de démyélinisation.

Ces résultats sont résumés dans la figure suivante (Figure 14).

En parallèle des processus de démyélinisation, des processus de remyélinisation sont mis en place, même s'ils ne permettent pas une remyélinisation complète. Au cours de la phase de remyélinisation, le traitement par l'agoniste de VPAC2 facilite ce phénomène par une augmentation significative du pourcentage de l'aire $MBP^+$ au niveau du corps calleux et du cérébellum. L'arrêt de la CPZ permet aux oligodendrocytes précurseurs, caractérisés par le marqueur NG2, de se différencier en oligodendrocytes matures et d'induire la remyélinisation (Praet *et al.*, 2014; Sachs *et al.*, 2014). Par immunofluorescence, nous avons observé une diminution du pourcentage de l'aire $NG2^+$ chez les souris traitées par rapport aux souris non traitées par l'agoniste de VPAC2. Ce résultat suggère que $BAY_{55\text{-}9837}$ favorise cette différenciation et donc la remyélinisation. Enfin, l'étude du profil d'expression des gènes impliqués dans les processus de dé- et remyélinisation a montré que le traitement induit une baisse de facteurs pro-inflammatoires comme iNOS au cours de la phase de remyélinisation suggérant un soutien des processus de remyélinisation par l'agoniste de VPAC2.

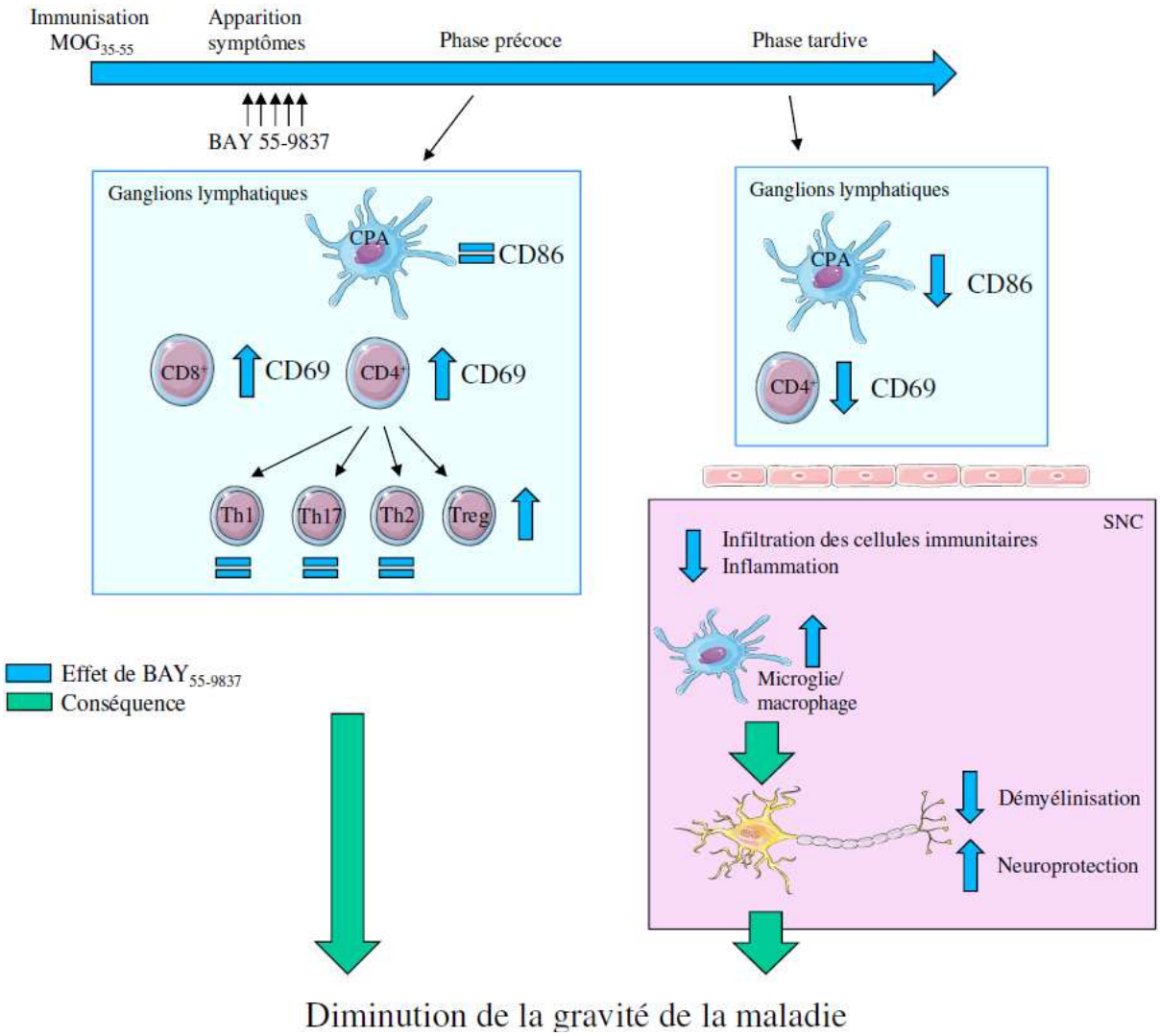



**Figure 14 : Schéma récapitulatif des effets potentiels de l'agoniste de VPAC2 au cours de l'EAE chronique**

CD: *cluster of differentiation* . CPA : cellule présentatrice d'antigène ; Th : lymphocyte T*helper*; SNC : système nerveux central

## 2) Perspectives

En perspective, il serait intéressant de disséquer les effets de l'agoniste de VPAC2 :

- sur l'activité suppressive des lymphocytes Treg par des expérimentations *in vitro* de cocultures de lymphocytes T effecteurs et de lymphocytes Treg provenant de souris traitées ou non par l'agoniste ;
- sur le phénotype tolérogène des cellules dendritiques par l'analyse des marqueurs de surface spécifiques (CMH de classe II, CD40, CD80 et CD86) de cellules dendritiques cultivées *in vitro* avec ou sans l'agoniste de VPAC2, par des expériences de prolifération *in vitro* de cocultures de lymphocytes T effecteurs et de cellules

dendritiques traitées ou non par l'agoniste.

De plus, les mécanismes cellulaires et moléculaires dans les deux modèles au niveau du SNC restent à être explorés plus en détails par immunofluorescence en se focalisant sur le phénotype de différents types cellulaires du SNC (macrophages, astrocytes, oligodendrocytes, neurones…).

L'effet de l'agoniste de VPAC2 sur les macrophages/microglie sera aussi étudié *in vitro* après stimulation avec du LPS en analysant la sécrétion de cytokines par ELISA mais aussi l'expression des molécules de surface spécifiques de chaque sous-population M1/M2 (CD200, CD206, CD80, CD86…) par cytométrie en flux.

## B. L'étude de l'orexine A

### 1) Discussion

L'étude réalisée avec l'orexine A a démontré la preuve de concept que l'administration systémique de l'orexine A pendant une courte durée (5 jours) de façon curative permet de diminuer significativement la gravité de l'EAE chronique (Figure 15).

Fatemi *et al.* ont également démontré que l'orexine pouvait efficacement diminuer les symptômes de l'EAE (Fatemi *et al.*, 2017b). Cependant, cette étude présentait plusieurs limites :

- les traitements utilisés étaient préventifs avec une durée de 20 jours après l'immunisation ;
- l'administration en icv. n'est pas appropriée pour l'utilisation de ce traitement chez l'Homme.

J'ai donc testé les effets curatifs de l'orexine A dans les processus inflammatoires à la périphérie et dans les processus neurodégénératifs au cours de l'EAE. Le traitement a été administré i.p. après l'apparition de la maladie durant seulement 5 jours. Nous avons choisi l'orexine A pour sa plus longue demi-vie par rapport à l'orexine B qui est plus rapidement métabolisé dans la circulation sanguine et pour sa capacité à se fixer sur les deux récepteurs OX1R et OX2R. De plus, des études ont démontré sa capacité de diffuser à travers la BHE (Kastin and Akerstrom, 1999). Cependant, d'autres prétendent que l'orexine A ne peut traverser une BHE intacte dans des conditions physiologiques (Fujiki *et al.*, 2003). Cependant, dans un contexte inflammatoire après administration de LPS, la perméabilité de cette barrière est altérée et l'orexine A, administré de façon systémique, atteint le SNC

(Ogawa *et al.*, 2016). La rupture de la perméabilité de la BHE, induite par la TP, permettrait donc à l'orexine A d'impacter les processus neurodégénératifs au cours de l'EAE.

Cette étude a démontré que l'orexine A augmente le nombre total des lymphocytes T dans les ganglions lymphatiques drainants et diminue fortement le nombre de lymphocytes T $CD4^+$ infiltrant la moelle épinière durant la phase tardive de la maladie. Cette accumulation périphérique pourrait être provoquée par un défaut du trafic des cellules immunitaires vers le SNC plutôt qu'une prolifération cellulaire excessive. En effet, l'étude de la prolifération par cytométrie en flux avec le marqueur Ki67 et par la restimulation par la MOG *ex-vivo* n'a montré aucune différence entre le groupe témoin et celui traité avec l'orexine A. Dans le même sens, les taux d'expression de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires sont diminués dans le SNC des souris traitées par l'orexine A, 21 jours après l'immunisation. Ces résultats suggèrent donc un défaut dans la phase effectrice et non dans la phase d'immunisation de la maladie.

Nous avons observé une diminution du taux en TGF-β, molécule anti-inflammatoire, comme le reste des autres gènes étudiés, dans le SNC au cours de la phase tardive de la maladie. Cependant, Fatemi *et al.* ont reporté une augmentation de ce taux lorsque l'orexine A est administré de façon icv. Cette discordance peut être expliquée par les voies d'administration différentes ainsi que par les durées de traitement qui diffèrent pouvant conduire à différents mécanismes d'action de l'orexine A (Fatemi et al., 2016).

Les astrocytes sont impliqués dans la pathogénèse de l'EAE. En effet, l'inactivation fonctionnelle de la voie NFκB de ces cellules (souris GFAP-IκBα-dn) provoque une diminution de la gravité de l'EAE avec une infiltration lymphocytaire moindre (Brambilla *et al.*, 2014). De plus, les astrocytes sont les principales sources des deux chimiokines, l'IP-10 et le MCP-1, qui facilitent le recrutement respectif des lymphocytes et des monocytes (Mills Ko *et al.*, 2014; Moreno *et al.*, 2014). D'ailleurs, l'invalidation génétique de l'un des deux induit une diminution de la gravité de l'EAE démontrant leur implication dans l'amplification de la réponse immunitaire dans le SNC. En accord avec la diminution de la proportion de l'aire $GFAP^+$ (marqueur des astrocytes), l'orexine A réduit les taux d'expression d'IP-10 et de MCP-1 suggérant une diminution de l'activation des astrocytes ce qui pourrait contribuer à la diminution de la gravité de l'EAE.

En plus des astrocytes, les cellules myéloïdes du SNC telles que les cellules microgliales et les macrophages infiltrés jouent un rôle important dans le développement de la maladie. D'une part, par la sécrétion de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires, elles peuvent amplifier le recrutement des cellules immunitaires. D'autre part, ces cellules produisent également des cytokines anti-inflammatoires aidant à la résolution de la maladie. Comme mentionné précédemment, les macrophages/microglie possèdent donc deux phénotypes pro-inflammatoire de type M1 et anti-inflammatoire de type M2. Duffy *et al.* ont démontré que l'orexine A oriente *in vitro* la polarisation des macrophages/microglie vers un phénotype M2 avec une augmentation de l'Arg-1 (Duffy *et al.*, 2015). Nous avons observé une diminution du pourcentage de marquage positif à la fois pour l'Iba-1 et pour l'Arg-1. L'orexine A induit donc une diminution de l'activation des macrophages/microglie et la réduction des cellules Arg-$1^{+}$ pourrait corréler avec l'infiltration diminuée des cellules immunitaires avec l'orexine A.

Nous avons également étudié les effets de l'orexine A au niveau des cellules myéloïdes périphériques. L'orexine A induit une augmentation du pourcentage de cellules $CD11b^{+}Ly6G^{+}Ly6C^{low}$. Ces cellules présentent une activité suppressive sur l'activation des lymphocytes T dans le contexte du cancer, mais leur rôle dans la pathogénèse de l'EAE reste controversé. Cependant, de nombreuses études démontrent leurs effets bénéfiques. Par exemple, ces cellules limitent l'inflammation dans la moelle épinière au cours de l'EAE en induisant l'apoptose des lymphocytes T (Moliné-Velázquez *et al.*, 2011). De plus, lorsqu'elles proviennent de souris EAE, elles suppriment les réponses immunitaires de type Th1 et Th17 spécifiques de l'antigène et ont un effet thérapeutique dépendent de l'expression de PD-L1 (Ioannou *et al.*, 2012). Il semblerait donc que l'orexine A diminue l'inflammation par l'augmentation du pourcentage des cellules $CD11b^{+}Ly6G^{+}Ly6C^{low}$ qui présentent une capacité de co-stimulation moindre vis-à-vis des lymphocytes T.

Enfin, nous n'avons observé aucun effet de l'orexine A sur les processus impliqués dans les phases de démyélinisation et de remyélinisation du modèle de la CPZ. Cela suggère que les effets de l'orexine A sur la démyélinisation pourrait être secondaire ceux sur l'inhibition des processus conduit par les lymphocytes T. Cependant, nous pouvons exclure que l'accessibilité de l'orexine A dans le SNC peut être moins importante dans le modèle de la CPZ par rapport à celle obtenue dans le modèle de l'EAE due aux différences de

perméabilité de la BHE.

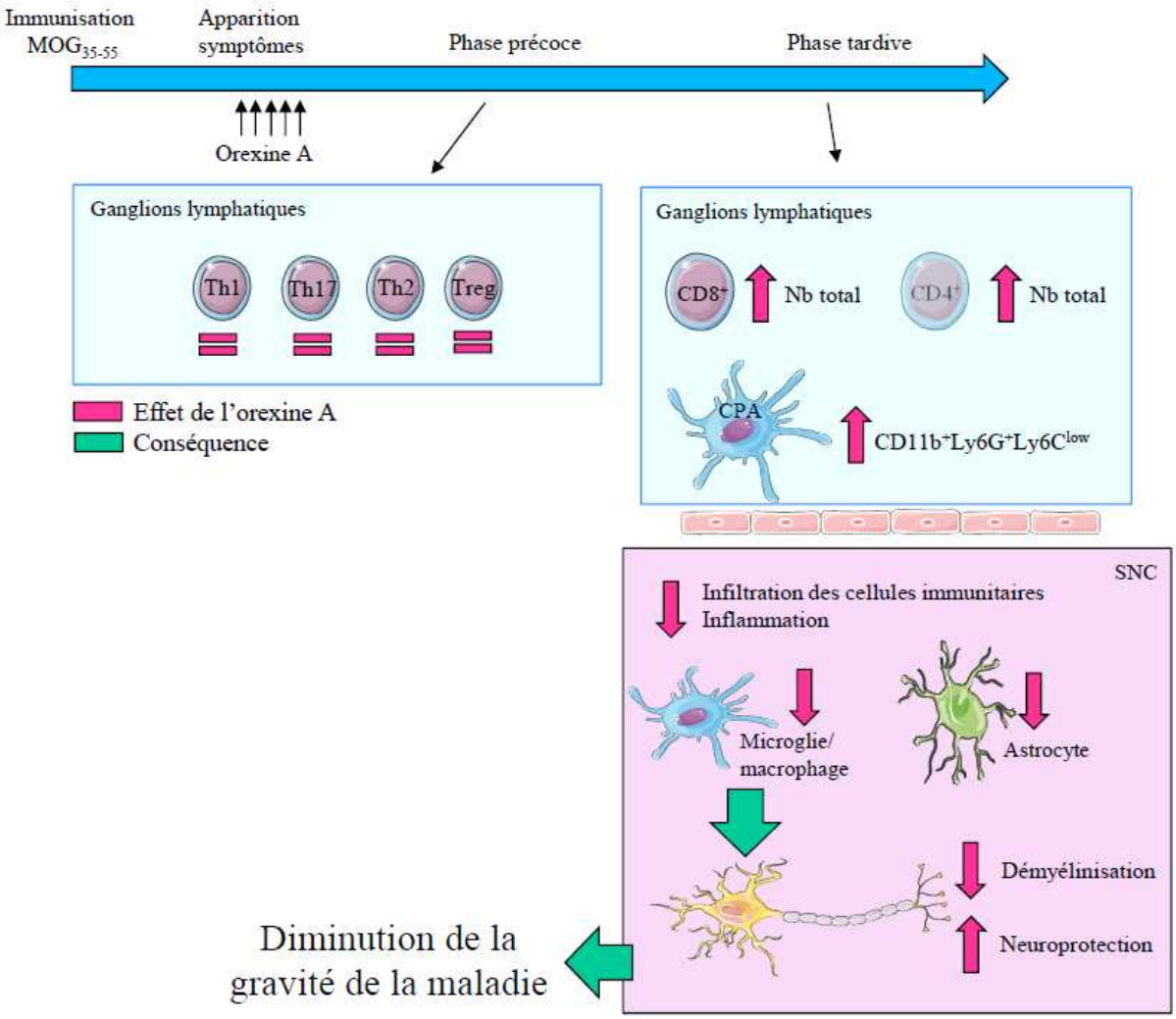



**Figure 15 : Schéma récapitulatif des effets de l'orexine A au cours de l'EAE chronique**
CD: *cluster of differentiation* . CPA : cellule présentatrice d'antigène ; Th : lymphocyte T*helper*; SNC : système nerveux central

## 2) Perspectives

Pour compléter cette étude, la phase effectrice au cours de l'EAE sera étudiée par :

- des tests de perméabilité de la BHE : analyse des laminines au niveau de la moelle épinière par immunofluorescence ou encore analyse de la diffusion du colorant bleu d'Evans par injection systémique entre les souris traitées ou non avec de l'orexine A après induction de l'EAE ;
- un transfert adoptif de lymphocytes provenant de souris traitées avec l'orexine A pour déterminer leur statut encéphalogène;

- l'utilisation de souris transgéniques Cx3cr1$^{+/GFP}$ pour examiner l'implication de la macrophages/microglie à la suite du traitement avec l'orexine A au cours de l'EAE (Brifault *et al.*, 2015).

L'absence d'effets de l'orexine A dans le modèle de la CPZ devra être confirmé par l'utilisation d'autres voies d'administration (intranasale ou icv.) permettant à l'orexine A d'accéder au SNC.

# Chapitre 2. Discussion générale

## A. Limites des modèles expérimentaux

Pour rappel, le modèle d'EAE chez la souris est le plus couramment utilisé en raison de son faible coût, de l'expansion rapide des colonies et de la manipulation génétique facile. La peptide $MOG_{35-55}$, émulsionné avec du CFA, est très encéphalitogène lorsqu'il est injecté en s.c. (et avec deux injections de TP aux jours 0 et 2) à des souris C57BL/6. Les souris âgées (plus de 9 semaines) développent une EAE chronique plus sévère. L'apparition de la maladie est similaire à celle de l'EAE aigüe mais, après le pic, le score clinique atteint un plateau. Les souris restent malades sans phase de rémission pendant au moins 20 jours. Ce modèle chronique mime la phase progressive de la SEP.

Ce modèle présente de nombreux avantages grâce à ses similarités avec la physiopathologie humaine telles que l'implication du SI à la périphérie comme au niveau du SNC, les processus de neurodégénérescence, ceux de remyélinisation qui ne permettent pas la remyélinisation complète ou encore l'absence de rémission complète.

La principale différence de ce modèle par rapport à la SEP est l'induction artificielle de la maladie par l'administration d'une émulsion de la MOG et de CFA ainsi que les injections de TP le jour de l'immunisation et deux jours plus tard. De plus, les lésions primaires sont induites par des lymphocytes T CD4$^{+}$ auto-réactifs. Elles sont principalement dues à une dégénérescence axonale massive puis par une démyélinisation alors que les processus de démyélinisation sont minimes voire absent contrairement à ce qu'il se passe chez les patients atteints de SEP (Kim *et al.*, 2006; Lassmann and Bradl, 2017; Nikić *et al.*, 2011; Soulika *et al.*, 2009). Chez la souris immunisée, la démyélinisation est principalement observée au niveau de la moelle épinière et de façon plus éparses dans le cerveau, alors que chez les patients, la démyélinisation est majoritaire dans le cerveau (Figure 16).

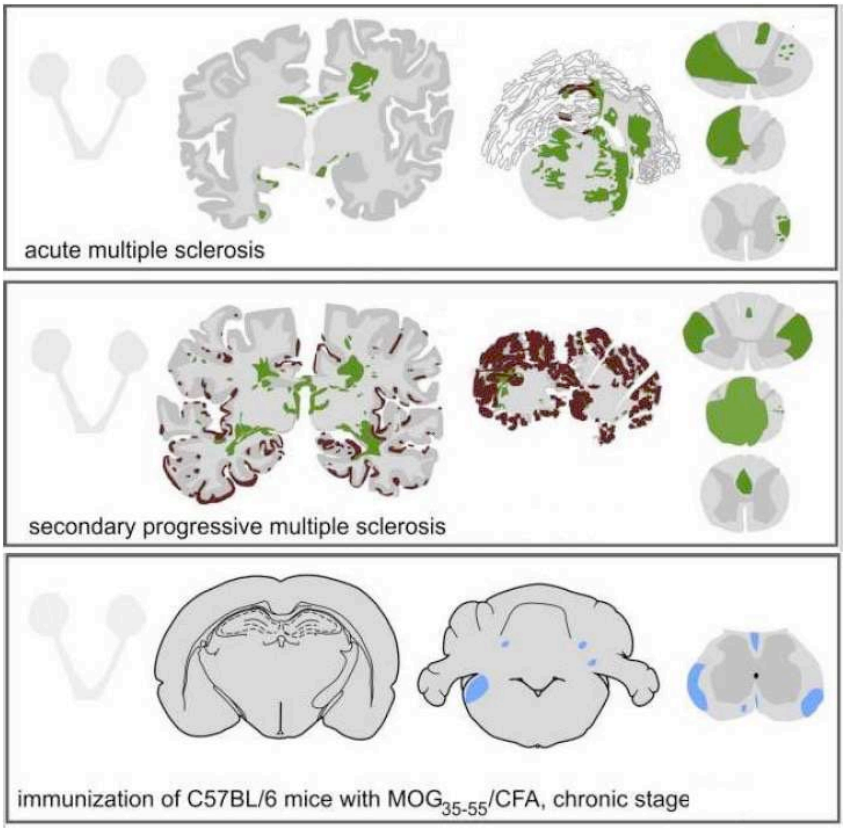



**Figure 16 : Comparaison des zones de démyélinisation au cours de la SEP et de l'EAE**, d'après Lassmann and Bradl, 2017, Acta Neuropathologica

Le modèle de la CPZ est un modèle toxique permettant d'étudier la démyélinisation et la remyélinisation en absence d'inflammation. Comme mentionné dans l'introduction, la CPZ est un chélateur du cuivre qui provoque la mort spécifique des oligodendrocytes matures de façon très reproductible. Elle est additionnée au régime alimentaire de l'animal (nourriture ou eau de boisson). Son arrêt permet une remyélinisation spontanée. Ce modèle a été longtemps ignoré par la communauté scientifique étudiant la SEP à cause de l'absence de l'implication des cellules immunitaires, lymphocytes T et B, dans la pathologie. Cependant, il est maintenant utilisé pour cette raison permettant ainsi d'étudier les processus de démyélinisation et de remyélinisation présents dans les formes progressives de la SEP lorsque les mécanismes de neurodégénérescence prédominent ceux de l'inflammation (Sachs *et al.*, 2014).

Au cours de ma thèse, j'ai étudié les effets de l'agoniste de VPAC2 et de l'orexine A dans ces deux modèles expérimentaux. L'utilisation des deux modèles complémentaires était nécessaire pour pallier les limites de chacun des modèles et ce qui nous permet d'obtenir les

mécanismes d'action de $BAY_{55-9837}$ et de l'orexine A en fonction des composantes inflammatoires et neurodégénératives de la SEP.

## B. Limites de l'utilisation de molécules peptidiques comme traitement

Les traitements actuels de la SEP sont principalement des immuno-suppresseurs ou -modulateurs administrés aux patients selon la forme et l'agressivité de la maladie. La première ligne de traitement (interféron β1, acétate de glatiramère, teriflunomide et diméthylfumarate) est utilisée chez des patients atteints d'une SEP moyennement active principalement pendant la SEP RR. Ces traitements présentent des effets secondaires listés dans le tableau 2 et deviennent inefficaces lorsque la maladie évolue. La deuxième ligne de traitement (fingolimod, alemtuzumab, daclizumab, natalizumab, mitoxantrone, ocrelizumab) est utilisée en cas de SEP progressive et lorsque ceux de la première ligne ne présentent plus d'effets. Ces traitements induisent des effets secondaires néfastes (Tableau 2) et ne sont plus efficaces lorsque les processus de neurodégénérescence s'amplifient.

L'utilisation de neuropeptides (tels que VIP, PACAP et les orexines) présente un intérêt thérapeutique contre la SEP, mais aussi d'autres maladies autoimmunes comme la polyarthrite rhumatoïde ou la maladie de Crohn (Abad et al., 2001, 2003; Gonzalez-Rey et al., 2006; Kato et al., 2004). En effet, dans le contexte de la SEP, leurs effets anti-inflammatoires et neuroprotecteurs modulent les composantes pro-inflammatoires et neurodégénératives de la SEP et de l'EAE. Cependant, ces neuropeptides présentent des fonctions pléiotropiques induisant des effets systémiques après leur administration *in vivo* (Delgado *et al.*, 2004b; Tsujino and Sakurai, 2009; Vaudry *et al.*, 2000). Pour une utilisation thérapeutique, il est nécessaire de cibler seulement l'un des récepteurs de ces neuropeptides afin de limiter les effets secondaires indésirables.

Actuellement, les agonistes ou antagonistes présents sur le marché sont principalement des peptides. Le principal inconvénient de l'utilisation de ces peptides est leur sensibilité aux protéases présentes dans le sang induisant leur dégradation rapide. Pour augmenter la durée de demi-vie de ces peptides, des études ont cherché à développer des peptides plus résistants aux protéases. Par exemple, les composés acetyl-[$Ala^{15}$, $Ala^{20}$]PACAP38-propylamide et acetyl-PACAP27-propylamide ont été développés à partir de PACAP et modifiés au niveau de sa partie N-terminale les rendant résistants à la peptidase dipeptidyle IV (processus protéolytique

majeur impliqué dans la dégradation de PACAP) (Bourgault *et al.*, 2008) ou encore le peptide MPAPO est un recombinant dérivé de PACAP et spécifique pour le récepteur PAC1 *(*Ma *et al.*, 2015) testé dans la réparation de la cornée et la sécheresse oculaire. De plus, une autre stratégie utilisée pour protéger les peptides de la dégradation est l'insertion du peptide d'intérêt dans des micelles ou des nanoparticules (Fernandez-Montesinos *et al.*, 2009; Onyüksel *et al.*, 2009).

## C. Perspectives générales

Présentement, la recherche de molécules non peptidiques est en cours grâce à la technique de criblage *in silico.* Notre équipe est en collaboration avec le Centre d'études et de recherche sur le médicament de Normandie (CERMN) qui dispose d'une chimiothèque de 17 000 molécules permettant de cibler des molécules non-peptidiques avec les propriétés bioactives de VIP, de PACAP et de l'orexine A. Par la suite, des expériences *in vitro* devront être réalisées pour déterminer les activités agonistes ou antagonistes de ces molécules pour les récepteurs de ces neuropeptides. Au vu des résultats à partir des souris KO VPAC1 *(Abad et al.*, 2016) et VPAC2 (Tan *et al.*, 2015) ainsi que mes travaux de thèse, les molécules non-peptidiques les plus intéressantes pour une utilisation thérapeutique pour la SEP seraient :

- un agoniste du récepteur VPAC2 ;
- un antagoniste et un agoniste du récepteur VPAC1 pour une combinaison séquentielle ;
- un agoniste des deux récepteurs OX1R et OX2R.

# VI. Conclusion

## Conclusion

Durant ma thèse, j'ai démontré que les neuropeptides, principalement VIP, PACAP et l'orexine A ainsi que leurs analogues peuvent être utilisés à visée thérapeutique contre la SEP.

Pour commencer, j'ai démontré que l'agoniste de VPAC2, $BAY_{55\text{-}9837}$, par l'administration systémique à court terme diminue significativement la gravité de l'EAE chronique accompagnée d'une forte réduction de l'infiltration des cellules immunitaires dans le SNC ainsi qu'une diminution de l'inflammation et augmentation de la proportion en microglie/macrophages dans la moelle épinière.

Dans le modèle de la CPZ, l'administration de $BAY_{55\text{-}9837}$ de façon systémique pendant 6 jours avant le sacrifice induit une diminution la destruction de la myéline par une baisse de facteurs pro-inflammatoires comme iNOS au cours de la phase de démyélinisation. De plus, il facilite la remyélinisation par une augmentation de facteurs anti-inflammatoires comme Arg-1 et IL-10 au cours de la phase de remyélinisation.

Un article exposant ces résultats est en cours de préparation.

En parallèle, l'étude réalisée avec l'orexine A a démontré la preuve de concept que l'administration systémique de l'orexine A pendant une courte durée (5 jours) de façon curative permet de diminuer significativement la gravité de l'EAE chronique. Nous avons observé une phase d'immunisation fonctionnelle. A la suite d'une stimulation à la $MOG_{35\text{-}55}$ *in vitro*, l'orexine n'a aucun effet sur la prolifération et sur la production cytokinique de cellules issues de ganglions lymphatiques drainants. Cependant, l'administration de l'orexine induit une phase effectrice limitée avec une réduction de l'infiltration des lymphocytes T $CD4^+$ auto-réactifs, des taux en ARNm de cytokines et chimiokines et une baisse de la démyélinisation, de l'astrogliose et de l'activation microgliale au niveau du SNC.

De plus, l'administration systémique de l'orexine pendant 6 jours ne semble pas avoir d'effet sur les phases de démyélinisation et remyélinisation du modèle de la CPZ.

Un article présentant les résultats avec l'orexine A est en cours de soumission.

En conclusion, pour combattre ces pathologies complexes telles que la SEP ou d'autres maladies autoimmunes et neurodégénératives. Il semble nécessaire de combiner plusieurs traitements de façon simultanée ou de manière séquentielle pour bloquer les différentes composantes de la maladie (inflammatoire et neurodégénérative dans le cas de la SEP).

# VII.Références

## Références


1. Abad, C., Martinez, C., Leceta, J., Gomariz, R.P., and Delgado, M. (2001). Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide Inhibits Collagen-Induced Arthritis: An Experimental Immunomodulatory Therapy. J. Immunol. *167*, 3182–3189.

2. Abad, C., Martinez, C., Juarranz, M.G., Arranz, A., Leceta, J., Delgado, M., and Gomariz, R.P. (2003). Therapeutic effects of vasoactive intestinal peptide in the trinitrobenzene sulfonic acid mice model of Crohn's disease. Gastroenterology *124*, 961–971.

3. Abad, C., Tan, Y.-V., Lopez, R., Nobuta, H., Dong, H., Phan, P., Feng, J.-M., Campagnoni, A.T., and Waschek, J.A. (2010). Vasoactive intestinal peptide loss leads to impaired CNS parenchymal T-cell infiltration and resistance to experimental autoimmune encephalomyelitis. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *107*, 19555–19560.

4. Abad, C., Gomariz, R., Waschek, J., Leceta, J., Martinez, C., Juarranz, Y., and Arranz, A. (2012). VIP in inflammatory bowel disease: state of the art. Endocr. Metab. Immune Disord. Drug Targets *12*, 316–322.

5. Abad, C., Jayaram, B., Becquet, L., Wang, Y., O'Dorisio, M.S., Waschek, J.A., and Tan, Y.-V. (2016). VPAC1 receptor (Vipr1)-deficient mice exhibit ameliorated experimental autoimmune encephalomyelitis, with specific deficits in the effector stage. J. Neuroinflammation *13*, 169.

6. Abbott, N.J., Patabendige, A.A.K., Dolman, D.E.M., Yusof, S.R., and Begley, D.J. (2010). Structure and function of the blood-brain barrier. Neurobiol. Dis. 37, 13–25.

7. Aktas, O., Kieseier, B., and Hartung, H.-P. (2010). Neuroprotection, regeneration and immunomodulation: broadening the therapeutic repertoire in multiple sclerosis. Trends Neurosci. *33*, 140–152.

8. Armstrong, B.D., Abad, C., Chhith, S., Cheung-Lau, G., Hajji, O.E., Nobuta, H., and Waschek, J.A. (2008). Impaired nerve regeneration and enhanced neuroinflammatory response in mice lacking pituitary adenylyl cyclase activating peptide. Neuroscience *151*, 63–73.

9. Audigier, S., Barberis, C., and Jard, S. (1986). Vasoactive intestinal polypeptide increases inositol phospholipid breakdown in the rat superior cervical ganglion. Brain Res. *376*, 363–367.

10. Bassan, M., Zamostiano, R., Davidson, A., Pinhasov, A., Giladi, E., Perl, O., Bassan, H., Blat, C., Gibney, G., Glazner, G., et al. (1999). Complete sequence of a novel protein containing a femtomolar-activity-dependent neuroprotective peptide. J. Neurochem. *72*, 1283–1293.

11. Baruch, K., Ron-Harel, N., Gal, H., Deczkowska, A., Shifrut, E., Ndifon, W., Mirlas-Neisberg, N., Cardon, M., Vaknin, I., Cahalon, L., et al. (2013). CNS-specific immunity at the choroid plexus shifts toward destructive Th2 inflammation in brain aging. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 110, 2264–2269.

12. Baxter, A.G. (2007). The origin and application of experimental autoimmune encephalomyelitis. Nat. Rev. Immunol. *7*, 904–912.

13. Beebe, X., Darczak, D., Davis-Taber, R.A., Uchic, M.E., Scott, V.E., Jarvis, M.F., and Stewart, A.O. (2008). Discovery and SAR of hydrazide antagonists of the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) receptor type 1 (PAC1-R). Bioorg. Med. Chem. Lett. *18*, 2162–2166.

14. Bettelli, E., Sullivan, B., Szabo, S.J., Sobel, R.A., Glimcher, L.H., and Kuchroo, V.K. (2004). Loss of T-bet, but not STAT1, prevents the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. J. Exp. Med. *200*, 79–87.

15. Bjelobaba, I., Begovic-Kupresanin, V., Pekovic, S., and Lavrnja, I. (2018). Animal models of multiple sclerosis: Focus on experimental autoimmune encephalomyelitis. J. Neurosci. Res. *96*, 1021–1042.

16. Bourgault, S., Vaudry, D., Botia, B., Couvineau, A., Laburthe, M., Vaudry, H., and Fournier, A. (2008). Novel stable PACAP analogs with potent activity towards the PAC1 receptor. Peptides 29, 919–932.

17. Brambilla, R., Morton, P.D., Ashbaugh, J.J., Karmally, S., Lambertsen, K.L., and Bethea, J.R. (2014). Astrocytes play a key role in EAE pathophysiology by orchestrating in the CNS the inflammatory response of resident and peripheral immune cells and by suppressing remyelination. Glia 62, 452–467.

18. Brenneman, D.E., and Eiden, L.E. (1986). Vasoactive intestinal peptide and electrical activity influence neuronal survival. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *83*, 1159–1162.

19. Brenneman, D.E., and Gozes, I. (1996). A femtomolar-acting neuroprotective peptide. J. Clin. Invest. *97*, 2299–2307.

20. Brenneman, D.E., Phillips, T.M., Festoff, B.W., and Gozes, I. (1997). Identity of Neurotrophic Molecules Released from Astroglia by Vasoactive Intestinal Peptide. Ann. N. Y. Acad. Sci. *814*, 167–173.

21. Brifault, C., Gras, M., Liot, D., May, V., Vaudry, D., and Wurtz, O. (2015). Delayed pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide delivery after brain stroke improves functional recovery by inducing m2 microglia/macrophage polarization. Stroke 46, 520–528.

22. Browne, P., Chandraratna, D., Angood, C., Tremlett, H., Baker, C., Taylor, B.V., and Thompson, A.J. (2014). Atlas of Multiple Sclerosis 2013: A growing global problem with widespread inequity. Neurology *83*, 1022–1024.

23. Bülbül, M., Tan, R., Gemici, B., Öngüt, G., and İzgüt-Uysal, V.N. (2008). Effect of orexin-a on ischemia-reperfusion-induced gastric damage in rats. J. Gastroenterol. *43*, 202–207.

24. Butovsky, O., Jedrychowski, M.P., Moore, C.S., Cialic, R., Lanser, A.J., Gabriely, G., Koeglsperger, T., Dake, B., Wu, P.M., Doykan, C.E., et al. (2014). Identification of a unique TGF-β-dependent molecular and functional signature in microglia. Nat. Neurosci. 17, 131–143

25. Canny, B.J., Rawlings, S.R., and Leong, D.A. (1992). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide specifically increases cytosolic calcium ion concentration in rat gonadotropes and somatotropes. Endocrinology *130*, 211–215.

26. Carrión, M., Pérez-García, S., Martínez, C., Juarranz, Y., Estrada-Capetillo, L., Puig-Kröger, A., Gomariz, R.P., and Gutiérrez-Cañas, I. (2016). VIP impairs acquisition of the macrophage proinflammatory polarization profile. J. Leukoc. Biol. *100*, 1385–1393.

27. Chu, A., Caldwell, J.S., and Chen, Y.A. (2010). Identification and characterization of a small molecule antagonist of human VPAC(2) receptor. Mol. Pharmacol. *77*, 95–101.

28. Compston, A., and Coles, A. (2002). Multiple sclerosis. Lancet Lond. Engl. *359*, 1221–1231.

29. Couvineau, A., Rouyer-Fessard, C., Darmoul, D., Maoret, J.J., Carrero, I., Ogier-Denis, E., and Laburthe, M. (1994). Human intestinal VIP receptor: cloning and functional expression of two cDNA encoding proteins with different N-terminal domains. Biochem. Biophys. Res. Commun. *200*, 769–776.

30. Cua, D.J., Sherlock, J., Chen, Y., Murphy, C.A., Joyce, B., Seymour, B., Lucian, L., To, W., Kwan, S., Churakova, T., et al. (2003). Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. Nature 421, 744–748.

31. Dargahi, N., Katsara, M., Tselios, T., Androutsou, M.-E., de Courten, M., Matsoukas, J., and Apostolopoulos, V. (2017). Multiple Sclerosis: Immunopathology and Treatment Update. Brain Sci. *7*.

32. Delgado, M. (2002). Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide inhibit the MEKK1/MEK4/JNK signaling pathway in endotoxin-activated microglia. Biochem. Biophys. Res. Commun. *293*, 771–776.

33. Delgado, M. (2003). Inhibition of interferon (IFN) gamma-induced Jak-STAT1 activation in microglia by vasoactive intestinal peptide: inhibitory effect on CD40, IFN-induced protein-10, and inducible nitric-oxide synthase expression. J. Biol. Chem. *278*, 27620–27629.

34. Delgado, M. (2005a). Vasoactive intestinal peptide generates CD4+CD25+ regulatory T cells in vivo. J. Leukoc. Biol. *78*, 1327–1338.

35. Delgado, M., Gonzalez-Rey, E., and Ganea, D. (2005b). The neuropeptide vasoactive intestinal peptide generates tolerogenic dendritic cells. J. Immunol. Baltim. Md 1950 175, 7311–7324.

36. Delgado, M., and Ganea, D. (2001). Inhibition of endotoxin-induced macrophage chemokine production by vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in vitro and in vivo. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *167*, 966–975.

37. Delgado, M., and Ganea, D. (2003a). Neuroprotective effect of vasoactive intestinal peptide (VIP) in a mouse model of Parkinson's disease by blocking microglial activation. FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol. *17*, 944–946.

38. Delgado, M., and Ganea, D. (2003b). Vasoactive intestinal peptide prevents activated microglia-induced neurodegeneration under inflammatory conditions: potential therapeutic role in brain trauma. FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol. *17*, 1922–1924.

39. Delgado, M., Martinez, C., Johnson, M.C., Gomariz, R.P., and Ganea, D. (1996). Differential expression of vasoactive intestinal peptide receptors 1 and 2 (VIP-R1 and VIP-R2) mRNA in murine lymphocytes. J. Neuroimmunol. *68*, 27–38.

40. Delgado, M., Sun, W., Leceta, J., and Ganea, D. (1999a). VIP and PACAP differentially regulate the costimulatory activity of resting and activated macrophages through the modulation of B7.1 and B7.2 expression. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *163*, 4213–4223.

41. Delgado, M., Pozo, D., Martinez, C., Leceta, J., Calvo, J.R., Ganea, D., and Gomariz, R.P. (1999b). Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide inhibit endotoxin-induced TNF-alpha production by macrophages: in vitro and in vivo studies. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *162*, 2358–2367.

42. Delgado, M., Munoz-Elias, E.J., Gomariz, R.P., and Ganea, D. (1999c). Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide enhance IL-10 production by murine macrophages: in vitro and in vivo studies. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *162*, 1707–1716.

43. Delgado, M., Munoz-Elias, E.J., Gomariz, R.P., and Ganea, D. (1999d). Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide prevent inducible nitric oxide synthase transcription in macrophages by inhibiting NF-kappa B and IFN regulatory factor 1 activation. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *162*, 4685–4696.

44. Delgado, M., Munoz-Elias, E.J., Martinez, C., Gomariz, R.P., and Ganea, D. (1999e). VIP and PACAP38 modulate cytokine and nitric oxide production in peritoneal macrophages and macrophage cell lines. Ann. N. Y. Acad. Sci. *897*, 401–414.

45. Delgado, M., Leceta, J., Gomariz, R.P., and Ganea, D. (1999f). Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide stimulate the induction of Th2 responses by up-regulating B7.2 expression. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *163*, 3629–3635.

46. Delgado, M., Martinez, C., Pozo, D., Calvo, J.R., Leceta, J., Ganea, D., and Gomariz, R.P. (1999g). Vasoactive intestinal peptide (VIP) and pituitary adenylate cyclase-activation polypeptide (PACAP) protect mice from lethal endotoxemia through the inhibition of TNF-alpha and IL-6. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *162*, 1200–1205.

47. Delgado, M., Abad, C., Martinez, C., Leceta, J., and Gomariz, R.P. (2001). Vasoactive intestinal peptide prevents experimental arthritis by downregulating both autoimmune and inflammatory components of the disease. Nat. Med. *7*, 563–568.

48. Delgado, M., Leceta, J., and Ganea, D. (2002). Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide promote in vivo generation of memory Th2 cells. FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol. *16*, 1844–1846.

49. Delgado, M., Leceta, J., and Ganea, D. (2003). Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide inhibit the production of inflammatory mediators by activated microglia. J. Leukoc. Biol. *73*, 155–164.

50. Delgado, M., Reduta, A., Sharma, V., and Ganea, D. (2004a). VIP/PACAP oppositely affects immature and mature dendritic cell expression of CD80/CD86 and the stimulatory activity for CD4(+) T cells. J. Leukoc. Biol. 75, 1122–1130.

51. Delgado, M., Pozo, D., and Ganea, D. (2004b). The significance of vasoactive intestinal peptide in immunomodulation. Pharmacol. Rev. *56*, 249–290.

52. Delgado, M., Gonzalez-Rey, E., and Ganea, D. (2004c). VIP/PACAP preferentially attract Th2 effectors through differential regulation of chemokine production by dendritic cells. FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol. *18*, 1453–1455..

53. Delgado, M., Chorny, A., Gonzalez-Rey, E., and Ganea, D. (2005a). Vasoactive intestinal peptide generates CD4+CD25+ regulatory T cells in vivo. J. Leukoc. Biol. 78, 1327–1338.

54. Delgado, M., Gonzalez-Rey, E., and Ganea, D. (2005b). The neuropeptide vasoactive intestinal peptide generates tolerogenic dendritic cells. J. Immunol. Baltim. Md 1950 175, 7311–7324.

55. Delgado, M., Toscano, M.G., Benabdellah, K., Cobo, M., O'Valle, F., Gonzalez-Rey, E., and Martín, F. (2008). In vivo delivery of lentiviral vectors expressing vasoactive intestinal peptide complementary DNA as gene therapy for collagen-induced arthritis. Arthritis Rheum. *58*, 1026–1037.

56. Delneste, Y., Herbault, N., Galea, B., Magistrelli, G., Bazin, I., Bonnefoy, J.Y., and Jeannin, P. (1999). Vasoactive intestinal peptide synergizes with TNF-alpha in inducing human dendritic cell maturation. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *163*, 3071–3075.

57. Dendrou, C.A., Fugger, L., and Friese, M.A. (2015). Immunopathology of multiple sclerosis. Nat. Rev. Immunol. 15, 545–558.

58. Deutsch, P.J., and Sun, Y. (1992). The 38-amino acid form of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide stimulates dual signaling cascades in PC12 cells and promotes neurite outgrowth. J. Biol. Chem. *267*, 5108–5113.

59. Ding, W., Manni, M., Stohl, L.L., Zhou, X.K., Wagner, J.A., and Granstein, R.D. (2012). Pituitary adenylate cyclase-activating peptide and vasoactive intestinal polypeptide bias Langerhans cell Ag presentation toward Th17 cells. Eur. J. Immunol. *42*, 901–911.

60. Duffy, C.M., Yuan, C., Wisdorf, L.E., Billington, C.J., Kotz, C.M., Nixon, J.P., and Butterick, T.A. (2015). Role of orexin A signaling in dietary palmitic acid-activated microglial cells. Neurosci. Lett. *606*, 140–144.

61. Dunzendorfer, S., Kaser, A., Meierhofer, C., Tilg, H., and Wiedermann, C.J. (2001). Cutting edge: peripheral neuropeptides attract immature and arrest mature blood-derived dendritic cells. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *166*, 2167–2172.

62. Engelhardt, B., and Ransohoff, R.M. (2005). The ins and outs of T-lymphocyte trafficking to the CNS: anatomical sites and molecular mechanisms. Trends Immunol. 26, 485–495.

63. Engelhardt, B., Wolburg-Buchholz, K., and Wolburg, H. (2001). Involvement of the choroid plexus in central nervous system inflammation. Microsc. Res. Tech. 52, 112–129.

64. Fatemi, I., Shamsizadeh, A., Roohbakhsh, A., Ayoobi, F., Sanati, M.H., and Motevalian, M. (2016a). Increase in mRNA Level of Orexin1 and 2 Receptors Following Induction of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis in Mice. Iran. J. Allergy Asthma Immunol. *15*, 20–26.

65. Fatemi, I., Shamsizadeh, A., Ayoobi, F., Taghipour, Z., Sanati, M.H., Roohbakhsh, A., and Motevalian, M. (2016b). Role of orexin-A in experimental autoimmune encephalomyelitis. J. Neuroimmunol. *291*, 101–109.

66. Ferber, I.A., Brocke, S., Taylor-Edwards, C., Ridgway, W., Dinisco, C., Steinman, L., Dalton, D., and Fathman, C.G. (1996). Mice with a disrupted IFN-gamma gene are susceptible to the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). J. Immunol. Baltim. Md 1950 156, 5–7.

67. Fernández-Arjona, M.D.M., Grondona, J.M., Granados-Durán, P., Fernández-Llebrez, P., and López-Ávalos, M.D. (2017). Microglia Morphological Categorization in a Rat Model of Neuroinflammation by Hierarchical Cluster and Principal Components Analysis. Front. Cell. Neurosci. 11, 235.

68. Fernandez-Montesinos, R., Castillo, P.M., Klippstein, R., Gonzalez-Rey, E., Mejias, J.A., Zaderenko, A.P., and Pozo, D. (2009). Chemical synthesis and characterization of silver-protected vasoactive intestinal peptide nanoparticles. Nanomed. 4, 919–930.

69. Fujiki, N., Yoshida, Y., Ripley, B., Mignot, E., and Nishino, S. (2003). Effects of IV and ICV hypocretin-1 (orexin A) in hypocretin receptor-2 gene mutated narcoleptic dogs and IV hypocretin-1 replacement therapy in a hypocretin-ligand-deficient narcoleptic dog. Sleep *26*, 953–959.

70. Ganea, D., and Delgado, M. (2002). Vasoactive intestinal peptide (VIP) and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) as modulators of both innate and adaptive immunity. Crit. Rev. Oral Biol. Med. Off. Publ. Am. Assoc. Oral Biol. *13*, 229–237.

71. Ganea, D., and Sun, L. (1993). Vasoactive intestinal peptide downregulates the expression of IL-2 but not of IFN gamma from stimulated murine T lymphocytes. J. Neuroimmunol. *47*, 147–158.

72. Ganea, D., Rodriguez, R., and Delgado, M. (2003). Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide: players in innate and adaptive immunity. Cell. Mol. Biol. Noisy--Gd. Fr. *49*, 127–142.

73. Gelfand, J.M. (2014). Multiple sclerosis. In Handbook of Clinical Neurology, (Elsevier), pp. 269–290.

74. Ghasemi, N., Razavi, S., and Nikzad, E. (2017). Multiple Sclerosis: Pathogenesis, Symptoms, Diagnoses and Cell-Based Therapy. Cell J. *19*, 1–10.

75. Giladi, E., Hill, J.M., Dresner, E., Stack, C.M., and Gozes, I. (2007). Vasoactive intestinal peptide (VIP) regulates activity-dependent neuroprotective protein (ADNP) expression in vivo. J. Mol. Neurosci. MN *33*, 278–283.

76. Goetzl, E.J., Voice, J.K., Shen, S., Dorsam, G., Kong, Y., West, K.M., Morrison, C.F., and Harmar, A.J. (2001). Enhanced delayed-type hypersensitivity and diminished immediate-type hypersensitivity in mice lacking the inducible VPAC(2) receptor for vasoactive intestinal peptide. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *98*, 13854–13859.

77. Gonzalez, B.J., Basille, M., Vaudry, D., Fournier, A., and Vaudry, H. (1997). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide promotes cell survival and neurite outgrowth in rat cerebellar neuroblasts. Neuroscience *78*, 419–430.

78. Gonzalez-Rey, E., Fernandez-Martin, A., Chorny, A., and Delgado, M. (2006a). Vasoactive intestinal peptide induces CD4+,CD25+ T regulatory cells with therapeutic effect in collagen-induced arthritis. Arthritis Rheum. *54*, 864–876.

79. Gonzalez-Rey, E., Fernandez-Martin, A., Chorny, A., Martin, J., Pozo, D., Ganea, D., and Delgado, M. (2006b). Therapeutic effect of vasoactive intestinal peptide on experimental autoimmune encephalomyelitis: down-regulation of inflammatory and autoimmune responses. Am. J. Pathol. *168*, 1179–1188.

80. Gonzalez-Rey, E., Chorny, A., and Delgado, M. (2007). Regulation of immune tolerance by anti-inflammatory neuropeptides. Nat. Rev. Immunol. *7*, 52–63.

81. Gonzalez-Rey, E., Gonzalez, M.A., Varela, N., O'Valle, F., Hernandez-Cortes, P., Rico, L., Büscher, D., and Delgado, M. (2010). Human adipose-derived mesenchymal stem cells reduce inflammatory and T cell responses and induce regulatory T cells in vitro in rheumatoid arthritis. Ann. Rheum. Dis. *69*, 241–248.

82. Gourlet, P., Vandermeers, A., Vertongen, P., Rathe, J., De Neef, P., Cnudde, J., Waelbroeck, M., and Robberecht, P. (1997a). Development of high affinity selective VIP1 receptor agonists. Peptides 18, 1539–1545.

83. Gourlet, P., De Neef, P., Cnudde, J., Waelbroeck, M., and Robberecht, P. (1997b). In vitro properties of a high affinity selective antagonist of the VIP1 receptor. Peptides 18, 1555–1560.

84. Gressens, P., Besse, L., Robberecht, P., Gozes, I., Fridkin, M., and Evrard, P. (1999). Neuroprotection of the developing brain by systemic administration of vasoactive intestinal peptide derivatives. J. Pharmacol. Exp. Ther. 288, 1207–1213.

85. Greter, M., Heppner, F.L., Lemos, M.P., Odermatt, B.M., Goebels, N., Laufer, T., Noelle, R.J., and Becher, B. (2005). Dendritic cells permit immune invasion of the CNS in an animal model of multiple sclerosis. Nat. Med. 11, 328–334

86. Gubernatorova, E.O., Perez-Chanona, E., Koroleva, E.P., Jobin, C., and Tumanov, A.V. (2016). Murine Model of Intestinal Ischemia-reperfusion Injury. J. Vis. Exp. JoVE.

87. Gutiérrez-Cañas, I., Juarranz, M.G., Collado, B., Rodríguez-Henche, N., Chiloeches, A., Prieto, J.C., and Carmena, M.J. (2005). Vasoactive intestinal peptide induces neuroendocrine differentiation in the LNCaP prostate cancer cell line through PKA, ERK, and PI3K. The Prostate *63*, 44–55.

88. Harada, S., Fujita-Hamabe, W., and Tokuyama, S. (2011). Effect of orexin-A on post-ischemic glucose intolerance and neuronal damage. J. Pharmacol. Sci. *115*, 155–163.

89. Harikrishnan, L.S., Srivastava, N., Kayser, L.E., Nirschl, D.S., Kumaragurubaran, K., Roy, A., Gupta, A., Karmakar, S., Karatt, T., Mathur, A., et al. (2012). Identification and optimization of small molecule antagonists of vasoactive intestinal peptide receptor-1 (VIPR1). Bioorg. Med. Chem. Lett. *22*, 2287–2290.

90. Hashimoto, H., Ishihara, T., Shigemoto, R., Mori, K., and Nagata, S. (1993). Molecular cloning and tissue distribution of a receptor for pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide. Neuron *11*, 333–342.

91. Hashimoto, H., Nogi, H., Mori, K., Ohishi, H., Shigemoto, R., Yamamoto, K., Matsuda, T., Mizuno, N., Nagata, S., and Baba, A. (1996). Distribution of the mRNA for a pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide receptor in the rat brain: an in situ hybridization study. J. Comp. Neurol. *371*, 567–577.

92. Hemmer, B., Kieseier, B., Cepok, S., and Hartung, H.-P. (2003). New immunopathologic insights into multiple sclerosis. Curr. Neurol. Neurosci. Rep. 3, 246–255.

93. Herz, J., Filiano, A.J., Smith, A., Yogev, N., and Kipnis, J. (2017). Myeloid Cells in the Central Nervous System. Immunity *46*, 943–956.

94. Hiremath, M.M., Chen, V.S., Suzuki, K., Ting, J.P.Y., and Matsushima, G.K. (2008). MHC class II exacerbates demyelination in vivo independently of T cells. J. Neuroimmunol. *203*, 23–32.

95. Hofstetter, H.H., Shive, C.L., and Forsthuber, T.G. (2002). Pertussis toxin modulates the immune response to neuroantigens injected in incomplete Freund's adjuvant: induction of Th1 cells and experimental autoimmune encephalomyelitis in the presence of high frequencies of Th2 cells. J. Immunol. Baltim. Md 1950 169, 117–125.

96. Hohlfeld, R., Dornmair, K., Meinl, E., and Wekerle, H. (2016). The search for the target antigens of multiple sclerosis, part 1: autoreactive CD4+ T lymphocytes as pathogenic effectors and therapeutic targets. Lancet Neurol. 15, 198–209.

97. Ioannou, M., Alissafi, T., Lazaridis, I., Deraos, G., Matsoukas, J., Gravanis, A., Mastorodemos, V., Plaitakis, A., Sharpe, A., Boumpas, D., et al. (2012). Crucial role of granulocytic myeloid-derived suppressor cells in the regulation of central nervous system autoimmune disease. J. Immunol. Baltim. Md 1950 188, 1136–1146.

98. Inutsuka, A., and Yamanaka, A. (2013). The physiological role of orexin/hypocretin neurons in the regulation of sleep/wakefulness and neuroendocrine functions. Front. Endocrinol. *4*, 18.

99. Irving, E.A., Harrison, D.C., Babbs, A.J., Mayes, A.C., Campbell, C.A., Hunter, A.J., Upton, N., and Parsons, A.A. (2002). Increased cortical expression of the orexin-1 receptor following permanent middle cerebral artery occlusion in the rat. Neurosci. Lett. *324*, 53–56.

100. Ishido, M. (2010). Activation of STAT3 by pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) during PACAP-promoted neurite outgrowth of PC12 cells. J. Mol. Neurosci. MN *42*, 349–358.

101. Ishihara, T., Shigemoto, R., Mori, K., Takahashi, K., and Nagata, S. (1992). Functional expression and tissue distribution of a novel receptor for vasoactive intestinal polypeptide. Neuron *8*, 811–819.

102. İzgüt-Uysal, V.N., Gemici, B., and Tan, R. (2011). Effect of orexin-A on phagocytic activity of peritoneal macrophage in starved rats. Cell. Immunol. *271*, 85–88.

103. Jabrane-Ferrat, N., Bloom, D., Wu, A., Li, L., Lo, D., Sreedharan, S.P., Turck, C.W., and Goetzl, A.E. (1999). Enhancement by vasoactive intestinal peptide of gamma-interferon production by antigen-stimulated type 1 helper T cells. FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol. *13*, 347–353.

104. Janeway CA Jr, Travers P, Walport M, et al. Immunobiology: The Immune System in Health and Disease. 5th edition. New York: Garland Science; 2001. Principles of innate and adaptive immunity.

105. Jamshidian, A., Shaygannejad, V., Pourazar, A., Zarkesh-Esfahani, S.-H., and Gharagozloo, M. (2013). Biased Treg/Th17 balance away from regulatory toward inflammatory phenotype in relapsed multiple sclerosis and its correlation with severity of symptoms. J. Neuroimmunol. 262, 106–112.

106. Jiang, X., Jing, H., and Ganea, D. (2002). VIP and PACAP down-regulate CXCL10 (IP-10) and up-regulate CCL22 (MDC) in spleen cells. J. Neuroimmunol. *133*, 81–94.

107. Jiang, Z., Jiang, J.X., and Zhang, G.-X. (2014). Macrophages: a double-edged sword in experimental autoimmune encephalomyelitis. Immunol. Lett. 160, 17–22.

108. Jimeno, R., Leceta, J., Martínez, C., Gutiérrez-Cañas, I., Carrión, M., Pérez-García, S., Garín, M., Mellado, M., Gomariz, R.P., and Juarranz, Y. (2014). Vasoactive intestinal peptide maintains the nonpathogenic profile of human th17-polarized cells. J. Mol. Neurosci. MN *54*, 512–525.

109. Jöhren, O., Neidert, S.J., Kummer, M., Dendorfer, A., and Dominiak, P. (2001). Prepro-orexin and orexin receptor mRNAs are differentially expressed in peripheral tissues of male and female rats. Endocrinology *142*, 3324–3331.

110. Jóźwiak-Bębenista, M., Kowalczyk, E., and Nowak, J.Z. (2015). The cyclic AMP effects and neuroprotective activities of PACAP and VIP in cultured astrocytes and neurons exposed to oxygen-glucose deprivation. Pharmacol. Rep. PR *67*, 332–338.

111. Kaczmarek, P., Skrzypski, M., Pruszynska-Oszmalek, E., Sassek, M., Kolodziejski, P.A., Billert, M., Szczepankiewicz, D., Wojciechowicz, T., Maechler, P., Nowak, K.W., et al. (2017). Chronic orexin-A (hypocretin-1) treatment of type 2 diabetic rats improves glucose control and beta-cell functions. J. Physiol. Pharmacol. Off. J. Pol. Physiol. Soc. *68*, 669–681.

112. Kastin, A.J., and Akerstrom, V. (1999). Orexin A but not orexin B rapidly enters brain from blood by simple diffusion. J. Pharmacol. Exp. Ther. *289*, 219–223.

113. Kato, H., Ito, A., Kawanokuchi, J., Jin, S., Mizuno, T., Ojika, K., Ueda, R., and Suzumura, A. (2004). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis by suppressing the functions of antigen presenting cells. Mult. Scler. Houndmills Basingstoke Engl. *10*, 651–659.

114. Kigerl, K.A., Gensel, J.C., Ankeny, D.P., Alexander, J.K., Donnelly, D.J., and Popovich, P.G. (2009). Identification of two distinct macrophage subsets with divergent effects causing either neurotoxicity or regeneration in the injured mouse spinal cord. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. 29, 13435–13444.

115. Kim, W.K., Kan, Y., Ganea, D., Hart, R.P., Gozes, I., and Jonakait, G.M. (2000). Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylyl cyclase-activating polypeptide inhibit tumor necrosis factor-alpha production in injured spinal cord and in activated microglia via a cAMP-dependent pathway. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *20*, 3622–3630.

116. Kim, W.-K., Ganea, D., and Jonakait, G.M. (2002). Inhibition of microglial CD40 expression by pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide is mediated by interleukin-10. J. Neuroimmunol. *126*, 16–24.

117. Kim, J.H., Budde, M.D., Liang, H.-F., Klein, R.S., Russell, J.H., Cross, A.H., and Song, S.-K. (2006). Detecting axon damage in spinal cord from a mouse model of multiple sclerosis. Neurobiol. Dis. 21, 626–632.

118. Kinhult, J., Uddman, R., Laan, M., Lindén, A., and Cardell, L.O. (2001). Pituitary adenylate cyclase-activating peptide inhibits neutrophil chemotaxis. Peptides *22*, 2151–2154.

119. Kinhult, J., Egesten, A., Uddman, R., and Cardell, L.O. (2002). PACAP enhances the expression of CD11b, CD66b and CD63 in human neutrophils. Peptides *23*, 1735–1739.

120. Kipnis, J. (2016). Multifaceted interactions between adaptive immunity and the central nervous system. Science *353*, 766–771.

121. Kirchgessner, A.L., and Liu, M. (1999). Orexin synthesis and response in the gut. Neuron *24*, 941–951.

122. Kitamura, E., Hamada, J., Kanazawa, N., Yonekura, J., Masuda, R., Sakai, F., and Mochizuki, H. (2010). The effect of orexin-A on the pathological mechanism in the rat focal cerebral ischemia. Neurosci. Res. *68*, 154–157.

123. Kıray, H., Lindsay, S.L., Hosseinzadeh, S., and Barnett, S.C. (2016). The multifaceted role of astrocytes in regulating myelination. Exp. Neurol. *283*, 541–549.

124. Kohm, A.P., Carpentier, P.A., Anger, H.A., and Miller, S.D. (2002). Cutting edge: CD4+CD25+ regulatory T cells suppress antigen-specific autoreactive immune responses and central nervous system inflammation during active experimental autoimmune encephalomyelitis. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *169*, 4712–4716.

125. Kotan, D., Deniz, O., Aygul, R., and Yıldırım, A. (2013). Acute cerebral ischaemia: Relationship between serum and cerebrospinal fluid orexin-A concentration and infarct volume. J. Int. Med. Res. *41*, 404–409.

126. Kukkonen, J.P., and Leonard, C.S. (2014). Orexin/hypocretin receptor signalling cascades. Br. J. Pharmacol. *171*, 314–331.

127. Kunis, G., Baruch, K., Rosenzweig, N., Kertser, A., Miller, O., Berkutzki, T., and Schwartz, M. (2013). IFN-γ-dependent activation of the brain's choroid plexus for CNS immune surveillance and repair. Brain J. Neurol. 136, 3427–3440.

128. Laburthe, M., Couvineau, A., Gaudin, P., Maoret, J.J., Rouyer-Fessard, C., and Nicole, P. (1996). Receptors for VIP, PACAP, secretin, GRF, glucagon, GLP-1, and other members of their new family of G protein-linked receptors: structure-function relationship with special reference to the human VIP-1 receptor. Ann. N. Y. Acad. Sci. *805*, 94-109; discussion 110-111.

129. Laburthe, M., Couvineau, A., and Marie, J.C. (2002). VPAC receptors for VIP and PACAP. Receptors Channels *8*, 137–153.

130. de Lecea, L., Kilduff, T.S., Peyron, C., Gao, X., Foye, P.E., Danielson, P.E., Fukuhara, C., Battenberg, E.L., Gautvik, V.T., Bartlett, F.S., et al. (1998). The hypocretins: hypothalamus-specific peptides with neuroexcitatory activity. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 95, 322–327.

131. Landtblom, A.-M., Fazio, P., Fredrikson, S., and Granieri, E. (2010). The first case history of multiple sclerosis: Augustus d'Esté (1794–1848). Neurol. Sci. *31*, 29–33.

132. Langer, I. (2012). Mechanisms involved in VPAC receptors activation and regulation: lessons from pharmacological and mutagenesis studies. Front. Endocrinol. *3*.

133. Langer, I., and Robberecht, P. (2005). Mutations in the carboxy-terminus of the third intracellular loop of the human recombinant VPAC1 receptor impair VIP-stimulated [Ca2+]i increase but not adenylate cyclase stimulation. Cell. Signal. *17*, 17–24.

134. Langer, I., Langlet, C., and Robberecht, P. (2005). Effect of inactivating mutations on phosphorylation and internalization of the human VPAC2 receptor. J. Mol. Endocrinol. *34*, 405–414.

135. Lapenna, A., De Palma, M., and Lewis, C.E. (2018). Perivascular macrophages in health and disease. Nat. Rev. Immunol. 18, 689–702.

136. Lassmann, H., and Bradl, M. (2017). Multiple sclerosis: experimental models and reality. Acta Neuropathol. (Berl.) 133, 223–244.

137. Le Péchon-Vallée, C., Magalon, K., Rasolonjanahary, R., Enjalbert, A., and Gérard, C. (2000). Vasoactive intestinal polypeptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptides stimulate mitogen-activated protein kinase in the pituitary cell line GH4C1 by a 3',5'-cyclic adenosine monophosphate pathway. Neuroendocrinology *72*, 46–56.

138. Leceta, J., Gomariz, R.P., Martinez, C., Abad, C., Ganea, D., and Delgado, M. (2000). Receptors and transcriptional factors involved in the anti-inflammatory activity of VIP and PACAP. Ann. N. Y. Acad. Sci. *921*, 92–102.

139. Lee, M., Lelievre, V., Zhao, P., Torres, M., Rodriguez, W., Byun, J.Y., Doshi, S., Ioffe, Y., Gupta, G., de los Monteros, A.E., et al. (2001). Pituitary adenylyl cyclase-activating polypeptide stimulates DNA synthesis but delays maturation of oligodendrocyte progenitors. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *21*, 3849–3859.

140. Leray, E., Vukusic, S., Debouverie, M., Clanet, M., Brochet, B., Sèze, J. de, Zéphir, H., Defer, G., Lebrun-Frenay, C., Moreau, T., et al. (2015). Excess Mortality in Patients with Multiple Sclerosis Starts at 20 Years from Clinical Onset: Data from a Large-Scale French Observational Study. PLOS ONE *10*, e0132033.

141. Leray, E., Moreau, T., Fromont, A., and Edan, G. (2016). Epidemiology of multiple sclerosis. Rev. Neurol. (Paris) *172*, 3–13.

142. Lighvani, A.A., Frucht, D.M., Jankovic, D., Yamane, H., Aliberti, J., Hissong, B.D., Nguyen, B.V., Gadina, M., Sher, A., Paul, W.E., et al. (2001). T-bet is rapidly induced by interferon-gamma in lymphoid and myeloid cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 98, 15137–15142.

143. Louveau, A., Smirnov, I., Keyes, T.J., Eccles, J.D., Rouhani, S.J., Peske, J.D., Derecki, N.C., Castle, D., Mandell, J.W., Lee, K.S., et al. (2015). Structural and functional features of central nervous system lymphatic vessels. Nature *523*, 337–341.

144. Lu, N., and DiCicco-Bloom, E. (1997). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide is an autocrine inhibitor of mitosis in cultured cortical precursor cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *94*, 3357–3362.

145. Lu, N., Zhou, R., and DiCicco-Bloom, E. (1998). Opposing mitogenic regulation by PACAP in sympathetic and cerebral cortical precursors correlates with differential expression of PACAP receptor (PAC1-R) isoforms. J. Neurosci. Res. *53*, 651–662.

146. Lublin, F.D., Reingold, S.C., Cohen, J.A., Cutter, G.R., Sorensen, P.S., Thompson, A.J., Wolinsky, J.S., Balcer, L.J., Banwell, B., Barkhof, F., et al. (2014). Defining the clinical course of multiple sclerosis: The 2013 revisions. Neurology *83*, 278–286.

147. Lutz, E.M., Sheward, W.J., West, K.M., Morrow, J.A., Fink, G., and Harmar, A.J. (1993). The VIP2 receptor: molecular characterisation of a cDNA encoding a novel receptor for vasoactive intestinal peptide. FEBS Lett. *334*, 3–8.

148. Ma, Y., Zhao, S., Wang, X., Shen, S., Ma, M., Xu, W., and Hong, A. (2015). A New Recombinant PACAP-Derived Peptide Efficiently Promotes Corneal Wound Repairing and Lacrimal Secretion. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 56, 4336–4349.

149. Macchi, B., Marino-Merlo, F., Nocentini, U., Pisani, V., Cuzzocrea, S., Grelli, S., and Mastino, A. (2015). Role of inflammation and apoptosis in multiple sclerosis: Comparative analysis between the periphery and the central nervous system. J. Neuroimmunol. 287, 80–87.MacKenzie, C.J., Lutz, E.M., McCulloch, D.A., Mitchell, R., and Harmar, A.J. (1996). Phospholipase C activation by VIP1 and VIP2 receptors expressed in COS 7 cells involves a pertussis toxin-sensitive mechanism. Ann. N. Y. Acad. Sci. *805*, 579–584.

150. MacKENZIE, C.J., Lutz, E.M., McCULLOCH, D.A., Mitchell, R., and Harmar, A.J. (2006). Phospholipase C Activation by VIP1 and VIP2 Receptors Expressed in COS 7 Cells Involves a Pertussis Toxin-Sensitive Mechanism. Ann. N. Y. Acad. Sci. *805*, 579–584.

151. Malendowicz, L.K., Tortorella, C., and Nussdorfer, G.G. (1999). Orexins stimulate corticosterone secretion of rat adrenocortical cells, through the activation of the adenylate cyclase-dependent signaling cascade. J. Steroid Biochem. Mol. Biol. *70*, 185–188.

152. Martinez, C., Delgado, M., Pozo, D., Leceta, J., Calvo, J.R., Ganea, D., and Gomariz, R.P. (1998). VIP and PACAP enhance IL-6 release and mRNA levels in resting peritoneal macrophages: in vitro and in vivo studies. J. Neuroimmunol. *85*, 155–167.

153. Martínez, C., Juarranz, Y., Abad, C., Arranz, A., Miguel, B.G., Rosignoli, F., Leceta, J., and Gomariz, R.P. (2005). Analysis of the role of the PAC1 receptor in neutrophil recruitment, acute-phase response, and nitric oxide production in septic shock. J. Leukoc. Biol. *77*, 729–738.

154. Martínez-Fuentes, A.J., Castaño, J.P., Gracia-Navarro, F., and Malagón, M.M. (1998). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) 38 and PACAP27 activate common and distinct intracellular signaling pathways to stimulate growth hormone secretion from porcine somatotropes. Endocrinology *139*, 5116–5124.

155. McCulloch, D.A., Lutz, E.M., Johnson, M.S., MacKenzie, C.J., and Mitchell, R. (2000). Differential activation of phospholipase D by VPAC and PAC1 receptors. Ann. N. Y. Acad. Sci. *921*, 175–185.

156. Metwali, A., Blum, A.M., Li, J., Elliott, D.E., and Weinstock, J.V. (2000). IL-4 regulates VIP receptor subtype 2 mRNA (VPAC2) expression in T cells in murine schistosomiasis. FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol. *14*, 948–954.

157. Metwali, A., Blum, A.M., Elliott, D.E., and Weinstock, J.V. (2002). IL-4 inhibits vasoactive intestinal peptide production by macrophages. Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. *283*, G115-121.

158. Miller, D.H., and Leary, S.M. (2007). Primary-progressive multiple sclerosis. Lancet Neurol. 6, 903–912.

159. Mills Ko, E., Ma, J.H., Guo, F., Miers, L., Lee, E., Bannerman, P., Burns, T., Ko, D., Sohn, J., Soulika, A.M., et al. (2014). Deletion of astroglial CXCL10 delays clinical onset but does not affect progressive axon loss in a murine autoimmune multiple sclerosis model. J. Neuroinflammation 11, 105.

160. Miyata, A., Arimura, A., Dahl, R.R., Minamino, N., Uehara, A., Jiang, L., Culler, M.D., and Coy, D.H. (1989). Isolation of a novel 38 residue-hypothalamic polypeptide which stimulates adenylate cyclase in pituitary cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. *164*, 567–574.

161. Miyata, A., Jiang, L., Dahl, R.D., Kitada, C., Kubo, K., Fujino, M., Minamino, N., and Arimura, A. (1990). Isolation of a neuropeptide corresponding to the N-terminal 27 residues of the pituitary adenylate cyclase activating polypeptide with 38 residues (PACAP38). Biochem. Biophys. Res. Commun. *170*, 643–648.

162. Miyata, A., Sato, K., Hino, J., Tamakawa, H., Matsuo, H., and Kangawa, K. (1998). Rat aortic smooth-muscle cell proliferation is bidirectionally regulated in a cell cycle-dependent manner via PACAP/VIP type 2 receptor. Ann. N. Y. Acad. Sci. *865*, 73–81.

163. Modi, H.R., Wang, Q., Gd, S., Sherman, D., Greenwald, E., Savonenko, A.V., Geocadin, R.G., and Thakor, N.V. (2017). Intranasal post-cardiac arrest treatment with orexin-A facilitates arousal from coma and ameliorates neuroinflammation. PloS One *12*, e0182707.

164. Moliné-Velázquez, V., Cuervo, H., Vila-Del Sol, V., Ortega, M.C., Clemente, D., and de Castro, F. (2011). Myeloid-derived suppressor cells limit the inflammation by promoting T lymphocyte apoptosis in the spinal cord of a murine model of multiple sclerosis. Brain Pathol. Zurich Switz. *21*, 678–691.

165. Moreno, M., Bannerman, P., Ma, J., Guo, F., Miers, L., Soulika, A.M., and Pleasure, D. (2014). Conditional ablation of astroglial CCL2 suppresses CNS accumulation of M1 macrophages and preserves axons in mice with MOG peptide EAE. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *34*, 8175–8185.

166. Moro, O., and Lerner, E.A. (1997). Maxadilan, the vasodilator from sand flies, is a specific pituitary adenylate cyclase activating peptide type I receptor agonist. J. Biol. Chem. 272, 966–970.

167. Moroo, I., Tatsuno, I., Uchida, D., Tanaka, T., Saito, J., Saito, Y., and Hirai, A. (1998). Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) stimulates mitogen-activated protein kinase (MAPK) in cultured rat astrocytes. Brain Res. *795*, 191–196.

168. Muscettola, M., and Grasso, G. (1990). Somatostatin and vasoactive intestinal peptide reduce interferon gamma production by human peripheral blood mononuclear cells. Immunobiology *180*, 419–430.

169. Nakamachi, T., Endo, S., Ohtaki, H., Yin, L., Kenji, D., Kudo, Y., Funahashi, H., Matsuda, K., and Shioda, S. (2005). Orexin-1 receptor expression after global ischemia in mice. Regul. Pept. *126*, 49–54.

170. Nakamachi, T., Nakamura, K., Oshida, K., Kagami, N., Mori, H., Watanabe, J., Arata, S., Yofu, S., Endo, K., Wada, Y., et al. (2011). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) stimulates proliferation of reactive astrocytes in vitro. J. Mol. Neurosci. MN *43*, 16–21.

171. Nicole, P., Lins, L., Rouyer-Fessard, C., Drouot, C., Fulcrand, P., Thomas, A., Couvineau, A., Martinez, J., Brasseur, R., and Laburthe, M. (2000). Identification of key residues for interaction of vasoactive intestinal peptide with human VPAC1 and VPAC2 receptors and development of a highly selective VPAC1 receptor agonist. Alanine scanning and molecular modeling of the peptide. J. Biol. Chem. 275, 24003–24012.

172. Nikić, I., Merkler, D., Sorbara, C., Brinkoetter, M., Kreutzfeldt, M., Bareyre, F.M., Brück, W., Bishop, D., Misgeld, T., and Kerschensteiner, M. (2011). A reversible form of axon damage in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. Nat. Med. 17, 495–499.

173. Nowak, K.W., Maćkowiak, P., Switońska, M.M., Fabiś, M., and Malendowicz, L.K. (2000). Acute orexin effects on insulin secretion in the rat: in vivo and in vitro studies. Life Sci. *66*, 449–454.

174. O'Connor, R.A., Prendergast, C.T., Sabatos, C.A., Lau, C.W.Z., Leech, M.D., Wraith, D.C., and Anderton, S.M. (2008). Cutting edge: Th1 cells facilitate the entry of Th17 cells to the central nervous system during experimental autoimmune encephalomyelitis. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *181*, 3750–3754.

175. Offen, D., Sherki, Y., Melamed, E., Fridkin, M., Brenneman, D.E., and Gozes, I. (2000). Vasoactive intestinal peptide (VIP) prevents neurotoxicity in neuronal cultures: relevance to neuroprotection in Parkinson's disease. Brain Res. *854*, 257–262.

176. Ogawa, Y., Irukayama-Tomobe, Y., Murakoshi, N., Kiyama, M., Ishikawa, Y., Hosokawa, N., Tominaga, H., Uchida, S., Kimura, S., Kanuka, M., et al. (2016). Peripherally administered orexin improves survival of mice with endotoxin shock. ELife *5*.

177. Ohtaki, H., Nakamachi, T., Dohi, K., Aizawa, Y., Takaki, A., Hodoyama, K., Yofu, S., Hashimoto, H., Shintani, N., Baba, A., et al. (2006). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) decreases ischemic neuronal cell death in association with IL-6. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *103*, 7488–7493.

178. Oleszak, E.L., Chang, J.R., Friedman, H., Katsetos, C.D., and Platsoucas, C.D. (2004). Theiler's virus infection: a model for multiple sclerosis. Clin. Microbiol. Rev. *17*, 174–207.

179. Olson, K.E., Kosloski-Bilek, L.M., Anderson, K.M., Diggs, B.J., Clark, B.E., Gledhill, J.M., Shandler, S.J., Mosley, R.L., and Gendelman, H.E. (2015). Selective VIP Receptor Agonists Facilitate Immune Transformation for Dopaminergic Neuroprotection in MPTP-Intoxicated Mice. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *35*, 16463–16478.

180. Onoue, S., Endo, K., Ohshima, K., Yajima, T., and Kashimoto, K. (2002). The neuropeptide PACAP attenuates beta-amyloid (1-42)-induced toxicity in PC12 cells. Peptides *23*, 1471–1478.

181. Onyüksel, H., Mohanty, P.S., and Rubinstein, I. (2009). VIP-grafted sterically stabilized phospholipid nanomicellar 17-allylamino-17-demethoxy geldanamycin: a novel targeted nanomedicine for breast cancer. Int. J. Pharm. 365, 157–161.

182. Ottaway, C.A. (1984). In vitro alteration of receptors for vasoactive intestinal peptide changes the in vivo localization of mouse T cells. J. Exp. Med. *160*, 1054–1069.

183. Ottaway, C.A. (1987). Selective effects of vasoactive intestinal peptide on the mitogenic response of murine T cells. Immunology *62*, 291–297.

184. Paolicelli, R.C., Bolasco, G., Pagani, F., Maggi, L., Scianni, M., Panzanelli, P., Giustetto, M., Ferreira, T.A., Guiducci, E., Dumas, L., et al. (2011). Synaptic pruning by microglia is necessary for normal brain development. Science 333, 1456–1458.

185. Pisegna, J.R., and Wank, S.A. (1993). Molecular cloning and functional expression of the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide type I receptor. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *90*, 6345–6349.

186. Pozo, D., Delgado, M., Martinez, C., Gomariz, R.P., Guerrero, J.M., and Calvo, J.R. (1997). Functional characterization and mRNA expression of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) type I receptors in rat peritoneal macrophages. Biochim. Biophys. Acta *1359*, 250–262.

187. Pozo, D., Guerrero, J.M., and Calvo, J.R. (2002). Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide inhibit LPS-stimulated MIP-1alpha production and mRNA expression. Cytokine *18*, 35–42.

188. Praet, J., Guglielmetti, C., Berneman, Z., Van der Linden, A., and Ponsaerts, P. (2014). Cellular and molecular neuropathology of the cuprizone mouse model: clinical relevance for multiple sclerosis. Neurosci. Biobehav. Rev. 47, 485–505.

189. Rabchevsky, A.G., Degos, J.D., and Dreyfus, P.A. (1999). Peripheral injections of Freund's adjuvant in mice provoke leakage of serum proteins through the blood-brain barrier without inducing reactive gliosis. Brain Res. 832, 84–96.

190. Radjavi, A., Smirnov, I., Derecki, N., and Kipnis, J. (2014). Dynamics of the meningeal CD4(+) T-cell repertoire are defined by the cervical lymph nodes and facilitate cognitive task performance in mice. Mol. Psychiatry 19, 531–533.

191. Radulovic, K., Manta, C., Rossini, V., Holzmann, K., Kestler, H.A., Wegenka, U.M., Nakayama, T., and Niess, J.H. (2012). CD69 regulates type I IFN-induced tolerogenic signals to mucosal CD4 T cells that attenuate their colitogenic potential. J. Immunol. Baltim. Md 1950 188, 2001–2013.

192. Rangon, C.-M., Goursaud, S., Medja, F., Lelièvre, V., Mounien, L., Husson, I., Brabet, P., Jégou, S., Janet, T., and Gressens, P. (2005). VPAC2 receptors mediate vasoactive intestinal peptide-induced neuroprotection against neonatal excitotoxic brain lesions in mice. J. Pharmacol. Exp. Ther. *314*, 745–752.

193. Reich, D.S., Lucchinetti, C.F., and Calabresi, P.A. (2018). Multiple Sclerosis. N. Engl. J. Med. *378*, 169–180.

194. Sachs, H.H., Bercury, K.K., Popescu, D.C., Narayanan, S.P., and Macklin, W.B. (2014). A new model of cuprizone-mediated demyelination/remyelination. ASN Neuro *6*.

195. Said, S.I., and Mutt, V. (1969). A peptide fraction from lung tissue with prolonged peripheral vasodilator activity. Scand. J. Clin. Lab. Investig. Suppl. *107*, 51–56.

196. Said, S.I., and Mutt, V. (1970). Polypeptide with broad biological activity: isolation from small intestine. Science *169*, 1217–1218.

197. Said, S.I., and Rosenberg, R.N. (1976). Vasoactive intestinal polypeptide: abundant immunoreactivity in neural cell lines and normal nervous tissue. Science *192*, 907–908.

198. Sakaguchi, S., Wing, K., and Miyara, M. (2007). Regulatory T cells - a brief history and perspective. Eur. J. Immunol. 37 Suppl 1, S116-123.

199. Sakurai, T., Amemiya, A., Ishii, M., Matsuzaki, I., Chemelli, R.M., Tanaka, H., Williams, S.C., Richardson, J.A., Kozlowski, G.P., Wilson, S., et al. (1998). Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. Cell 92, 573–585.

200. Schwartz, M., and Deczkowska, A. (2016). Neurological Disease as a Failure of Brain-Immune Crosstalk: The Multiple Faces of Neuroinflammation. Trends Immunol. 37, 668–679

201. Sher, A., and Coffman, R.L. (1992). Regulation of immunity to parasites by T cells and T cell-derived cytokines. Annu. Rev. Immunol. *10*, 385–409.

202. Shechter, R., Miller, O., Yovel, G., Rosenzweig, N., London, A., Ruckh, J., Kim, K.-W., Klein, E., Kalchenko, V., Bendel, P., et al. (2013). Recruitment of beneficial M2 macrophages to injured spinal cord is orchestrated by remote brain choroid plexus. Immunity 38, 555–569.

203. Sherwood, N.M., Krueckl, S.L., and McRory, J.E. (2000). The origin and function of the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP)/glucagon superfamily. Endocr. Rev. *21*, 619–670.

204. Sheward, W.J., Lutz, E.M., and Harmar, A.J. (1995). The distribution of vasoactive intestinal peptide2 receptor messenger RNA in the rat brain and pituitary gland as assessed by in situ hybridization. Neuroscience *67*, 409–418.

205. Shioda, S., Shuto, Y., Somogyvari-Vigh, A., Legradi, G., Onda, H., Coy, D.H., Nakajo, S., and Arimura, A. (1997). Localization and gene expression of the receptor for pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in the rat brain. Neurosci. Res. *28*, 345–354.

206. Simons, M., and Nave, K.-A. (2015). Oligodendrocytes: Myelination and Axonal

Support. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 8, a020479.

207. Soares, M.B., Titus, R.G., Shoemaker, C.B., David, J.R., and Bozza, M. (1998). The vasoactive peptide maxadilan from sand fly saliva inhibits TNF-alpha and induces IL-6 by mouse macrophages through interaction with the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) receptor. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *160*, 1811–1816.

208. Sokołowska, P., Urbańska, A., Biegańska, K., Wagner, W., Ciszewski, W., Namiecińska, M., and Zawilska, J.B. (2014). Orexins protect neuronal cell cultures against hypoxic stress: an involvement of Akt signaling. J. Mol. Neurosci. MN *52*, 48–55.

209. Sonobe, Y., Takeuchi, H., Kataoka, K., Li, H., Jin, S., Mimuro, M., Hashizume, Y., Sano, Y., Kanda, T., Mizuno, T., et al. (2016). Interleukin-25 expressed by brain capillary endothelial cells maintains blood-brain barrier function in a protein kinase Cϵ-dependent manner. J. Biol. Chem. 291, 12573.

210. Soulika, A.M., Lee, E., McCauley, E., Miers, L., Bannerman, P., and Pleasure, D. (2009). Initiation and progression of axonopathy in experimental autoimmune encephalomyelitis. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. 29, 14965–14979.

211. Spengler, D., Waeber, C., Pantaloni, C., Holsboer, F., Bockaert, J., Seeburg, P.H., and Journot, L. (1993). Differential signal transduction by five splice variants of the PACAP receptor. Nature *365*, 170–175.

212. Starr, T.K., Jameson, S.C., and Hogquist, K.A. (2003). Positive and negative selection of T cells. Annu. Rev. Immunol. 21, 139–176.

213. Straub, S.G., and Sharp, G.W. (1996). A wortmannin-sensitive signal transduction pathway is involved in the stimulation of insulin release by vasoactive intestinal polypeptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide. J. Biol. Chem. *271*, 1660–1668.

214. Sun, L., and Ganea, D. (1993). Vasoactive intestinal peptide inhibits interleukin (IL)-2 and IL-4 production through different molecular mechanisms in T cells activated via the T cell receptor/CD3 complex. J. Neuroimmunol. *48*, 59–69.

215. Takahashi, K., Rochford, C.D.P., and Neumann, H. (2005). Clearance of apoptotic neurons without inflammation by microglial triggering receptor expressed on myeloid cells-2. J. Exp. Med. 201, 647–657.

216. Tan, Y.-V., Abad, C., Lopez, R., Dong, H., Liu, S., Lee, A., Gomariz, R.P., Leceta, J., and Waschek, J.A. (2009). Pituitary adenylyl cyclase-activating polypeptide is an intrinsic regulator of Treg abundance and protects against experimental autoimmune encephalomyelitis. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *106*, 2012–2017.

217. Tan, Y.-V., Abad, C., Wang, Y., Lopez, R., and Waschek, J.A. (2013). Pituitary adenylate cyclase activating peptide deficient mice exhibit impaired thymic and extrathymic regulatory T cell proliferation during EAE. PloS One *8*, e61200.

218. Tan, Y.-V., Abad, C., Wang, Y., Lopez, R., and Waschek, J. (2015). VPAC2 (vasoactive intestinal peptide receptor type 2) receptor deficient mice develop exacerbated experimental autoimmune encephalomyelitis with increased Th1/Th17 and reduced Th2/Treg responses. Brain. Behav. Immun. *44*, 167–175.

219. Tang, H., Welton, A., and Ganea, D. (1995). Neuropeptide regulation of cytokine expression: effects of VIP and Ro 25-1553. J. Interferon Cytokine Res. Off. J. Int. Soc. Interferon Cytokine Res. *15*, 993–1003.

220. Tang, H., Sun, L., Xin, Z., and Ganea, D. (1996). Down-regulation of cytokine expression in murine lymphocytes by PACAP and VIP. Ann. N. Y. Acad. Sci. *805*, 768–778.

221. Tatsuno, I., Gottschall, P.E., and Arimura, A. (1991a). Specific binding sites for pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) in rat cultured astrocytes: molecular identification and interaction with vasoactive intestinal peptide (VIP). Peptides *12*, 617–621.

222. Tatsuno, I., Gottschall, P.E., and Arimura, A. (1991b). Inhibition of mitogen-stimulated proliferation of murine splenocytes by a novel neuropeptide, pituitary adenylate cyclase activating polypeptide: a comparative study with vasoactive intestinal peptide. Endocrinology *128*, 728–734.

223. Tatsuno, I., Morio, H., Tanaka, T., Uchida, D., Hirai, A., Tamura, Y., and Saito, Y. (1996). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) is a regulator of astrocytes: PACAP stimulates proliferation and production of interleukin 6 (IL-6), but not nerve growth factor (NGF), in cultured rat astrocyte. Ann. N. Y. Acad. Sci. *805*, 482–488.

224. Taylor, A.W., Streilein, J.W., and Cousins, S.W. (1994). Immunoreactive vasoactive intestinal peptide contributes to the immunosuppressive activity of normal aqueous humor. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *153*, 1080–1086.

225. Thannickal, T.C., Moore, R.Y., Nienhuis, R., Ramanathan, L., Gulyani, S., Aldrich, M., Cornford, M., and Siegel, J.M. (2000). Reduced number of hypocretin neurons in human narcolepsy. Neuron 27, 469–474.

226. Thompson, A.J., Baranzini, S.E., Geurts, J., Hemmer, B., and Ciccarelli, O. (2018). Multiple sclerosis. Lancet Lond. Engl. 391, 1622–1636.

227. Tremlett, H., Yinshan Zhao, null, and Devonshire, V. (2008). Natural history of secondary-progressive multiple sclerosis. Mult. Scler. Houndmills Basingstoke Engl. 14, 314–324.

228. Tsujino, N., and Sakurai, T. (2009). Orexin/hypocretin: a neuropeptide at the interface of sleep, energy homeostasis, and reward system. Pharmacol. Rev. *61*, 162–176.

229. Tsutsumi, M., Claus, T.H., Liang, Y., Li, Y., Yang, L., Zhu, J., Dela Cruz, F., Peng, X., Chen, H., Yung, S.L., et al. (2002). A potent and highly selective VPAC2 agonist enhances glucose-induced insulin release and glucose disposal: a potential therapy for type 2 diabetes. Diabetes 51, 1453–1460.

230. University of California, San Francisco MS-EPIC Team:, Cree, B.A.C., Gourraud, P.-A., Oksenberg, J.R., Bevan, C., Crabtree-Hartman, E., Gelfand, J.M., Goodin, D.S., Graves, J., Green, A.J., et al. (2016). Long-term evolution of multiple sclerosis disability in the treatment era. Ann. Neurol. 80, 499–510.

231. Usdin, T.B., Bonner, T.I., and Mezey, E. (1994). Two receptors for vasoactive intestinal polypeptide with similar specificity and complementary distributions. Endocrinology *135*, 2662–2680.

232. Ushiyama, M., Sugawara, H., Inoue, K., Kangawa, K., Yamada, K., and Miyata, A. (2006). Characterization of the PAC1 variants expressed in the mouse heart. Ann. N. Y. Acad. Sci. *1070*, 586–590.

233. Van, C., Condro, M.C., Lov, K., Zhu, R., Ricaflanca, P.T., Ko, H.H., Diep, A.L., Hoang, A.Q., Pisegna, J., Rohrer, H., et al. (2018). PACAP/PAC1 Regulation of Inflammation via the Sympathetic Nervous System in a Model of Multiple Sclerosis. J. Mol. Neurosci.

234. Vassiliou, E., Jiang, X., Delgado, M., and Ganea, D. (2001). TH2 lymphocytes secrete functional VIP upon antigen stimulation. Arch. Physiol. Biochem. *109*, 365–368.

235. Vaudry, D., Gonzalez, B.J., Basille, M., Yon, L., Fournier, A., and Vaudry, H. (2000). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its receptors: from structure to functions. Pharmacol. Rev. *52*, 269–324.

236. Vaudry, D., Pamantung, T.F., Basille, M., Rousselle, C., Fournier, A., Vaudry, H., Beauvillain, J.C., and Gonzalez, B.J. (2002a). PACAP protects cerebellar granule neurons against oxidative stress-induced apoptosis. Eur. J. Neurosci. *15*, 1451–1460.

237. Vaudry, D., Rousselle, C., Basille, M., Falluel-Morel, A., Pamantung, T.F., Fontaine, M., Fournier, A., Vaudry, H., and Gonzalez, B.J. (2002b). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide protects rat cerebellar granule neurons against ethanol-induced apoptotic cell death. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *99*, 6398–6403.

238. Venken, K., Hellings, N., Hensen, K., Rummens, J.-L., and Stinissen, P. (2010). Memory CD4+CD127high T cells from patients with multiple sclerosis produce IL-17 in response to myelin antigens. J. Neuroimmunol. 226, 185–191.

239. Verma, A.K., Manohar, M., Venkateshaiah, S.U., Blecker, U., Collins, M.H., and Mishra, A. (2018). Role of Vasoactive Intestinal Peptide in Promoting the Pathogenesis of Eosinophilic Esophagitis (EoE). Cell. Mol. Gastroenterol. Hepatol. *5*, 99–100.e7.

240. Viglietta, V., Baecher-Allan, C., Weiner, H.L., and Hafler, D.A. (2004). Loss of functional suppression by CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. J. Exp. Med. 199, 971–979.

241. Voice, J., Donnelly, S., Dorsam, G., Dolganov, G., Paul, S., and Goetzl, E.J. (2004). c-Maf and JunB Mediation of Th2 Differentiation Induced by the Type 2 G Protein-Coupled Receptor (VPAC2) for Vasoactive Intestinal Peptide. J. Immunol. *172*, 7289–7296.

242. Voice, J.K., Dorsam, G., Lee, H., Kong, Y., and Goetzl, E.J. (2001). Allergic diathesis in transgenic mice with constitutive T cell expression of inducible vasoactive intestinal peptide receptor. FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol. *15*, 2489–2496.

243. Voice, J.K., Grinninger, C., Kong, Y., Bangale, Y., Paul, S., and Goetzl, E.J. (2003). Roles of vasoactive intestinal peptide (VIP) in the expression of different immune phenotypes by wild-type mice and T cell-targeted type II VIP receptor transgenic mice. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *170*, 308–314.

244. Wang, G., Qi, C., Fan, G.-H., Zhou, H.-Y., and Chen, S.-D. (2005). PACAP protects neuronal differentiated PC12 cells against the neurotoxicity induced by a mitochondrial complex I inhibitor, rotenone. FEBS Lett. *579*, 4005–4011.

245. Wang, H.Y., Xin, Z., Tang, H., and Ganea, D. (1996). Vasoactive intestinal peptide inhibits IL-4 production in murine T cells by a post-transcriptional mechanism. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *156*, 3243–3253.

246. Wang, H.Y., Jiang, X.M., and Ganea, D. (2000). The neuropeptides VIP and PACAP inhibit IL-2 transcription by decreasing c-Jun and increasing JunB expression in T cells. J. Neuroimmunol. *104*, 68–78.

247. Williams, A., Piaton, G., and Lubetzki, C. (2007). Astrocytes--friends or foes in multiple sclerosis? Glia *55*, 1300–1312.

248. Wingerchuk, D.M. (2012). Smoking: effects on multiple sclerosis susceptibility and disease progression. Ther. Adv. Neurol. Disord. *5*, 13–22.

249. Wu, J.Y., Henins, K.A., Gressens, P., Gozes, I., Fridkin, M., Brenneman, D.E., and Hill, J.M. (1997). Neurobehavioral development of neonatal mice following blockade of VIP during the early embryonic period. Peptides *18*, 1131–1137.

250. Xia, M., Leppert, D., Hauser, S.L., Sreedharan, S.P., Nelson, P.J., Krensky, A.M., and Goetzl, E.J. (1996). Stimulus specificity of matrix metalloproteinase dependence of human T cell migration through a model basement membrane. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *156*, 160–167.

251. Xia, M., Sreedharan, S.P., Bolin, D.R., Gaufo, G.O., and Goetzl, E.J. (1997). Novel cyclic peptide agonist of high potency and selectivity for the type II vasoactive intestinal peptide receptor. J. Pharmacol. Exp. Ther. 281, 629–633.

252. Xiong, X., White, R.E., Xu, L., Yang, L., Sun, X., Zou, B., Pascual, C., Sakurai, T., Giffard, R.G., and Xie, X.S. (2013). Mitigation of murine focal cerebral ischemia by the hypocretin/orexin system is associated with reduced inflammation. Stroke *44*, 764–770.

253. Yadav, M., Rosenbaum, J., and Goetzl, E.J. (2008). Cutting edge: vasoactive intestinal peptide (VIP) induces differentiation of Th17 cells with a distinctive cytokine profile. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *180*, 2772–2776.

254. Yan, G.-T., Lin, J., and Liao, J. (2005). [Distribution of Orexin-A mRNA expression in different organs and its variation in acute inflammation]. Zhongguo Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue Chin. Crit. Care Med. Zhongguo Weizhongbing Jijiuyixue *17*, 207–210.

255. Yuan, L., Dong, H., Zhang, H.-P., Zhao, R., Gong, G., Chen, X., Zhang, L., and Xiong, L. (2011). Neuroprotective Effect of Orexin-A Is Mediated by an Increase of Hypoxia-inducible Factor-1 Activity in Rat: Anesthesiology *114*, 340–354.

256. Zeng, N., Athmann, C., Kang, T., Lyu, R.M., Walsh, J.H., Ohning, G.V., Sachs, G., and Pisegna, J.R. (1999). PACAP type I receptor activation regulates ECL cells and gastric acid secretion. J. Clin. Invest. *104*, 1383–1391.

257. Zhou, L., Chong, M.M.W., and Littman, D.R. (2009). Plasticity of CD4+ T cell lineage differentiation. Immunity *30*, 646–655.

258. Zoecklein, L.J., Pavelko, K.D., Gamez, J., Papke, L., McGavern, D.B., Ure, D.R., Njenga, M.K., Johnson, A.J., Nakane, S., and Rodriguez, M. (2003). Direct comparison of demyelinating disease induced by the Daniel's strain and BeAn strain of Theiler's murine encephalomyelitis virus. Brain Pathol. Zurich Switz. 13, 291–308.

259. Zupan, V., Hill, J.M., Brenneman, D.E., Gozes, I., Fridkin, M., Robberecht, P., Evrard, P., and Gressens, P. (1998). Involvement of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide II vasoactive intestinal peptide 2 receptor in mouse neocortical astrocytogenesis. J. Neurochem. *70*, 2165–2173.

Références de site web:

1. Anthony Harmar, Jan Fahrenkrug, Edward J. Goetzl, Illana Gozes, Marc Laburthe, Victor May, Joseph R. Pisegna, Sami I. Said, David Vaudry, Hubert Vaudry, James A. Waschek. VIP and PACAP receptors: $VPAC_1$ receptor. Last modified on 20/02/2018. Accessed on 03/06/2018. IUPHAR/BPS Guide to PHARMACOLOGY, http://www.guidetopharmacology.org/GRAC/ObjectDisplayForward?objectId=371.

2. Anthony Harmar, Jan Fahrenkrug, Edward J. Goetzl, Illana Gozes, Marc Laburthe, Victor May, Joseph R. Pisegna, Sami I. Said, David Vaudry, Hubert Vaudry, James A. Waschek. VIP and PACAP receptors: $VPAC_2$ receptor. Last modified on 20/02/2018. Accessed on 03/06/2018. IUPHAR/BPS Guide to PHARMACOLOGY, http://www.guidetopharmacology.org/GRAC/ObjectDisplayForward?objectId=372.

3. Anthony Harmar, Jan Fahrenkrug, Edward J. Goetzl, Illana Gozes, Marc Laburthe, Victor May, Joseph R. Pisegna, Sami I. Said, David Vaudry, Hubert Vaudry, James A. Waschek. VIP and PACAP receptors: $PAC_1$ receptor. Last modified on 20/02/2018. Accessed on 03/06/2018. IUPHAR/BPS Guide to PHARMACOLOGY, http://www.guidetopharmacology.org/GRAC/ObjectDisplayForward?objectId=370.

4. Christopher J. Winrow, Paul Coleman, Luis de Lecea, Thomas Kilduff, Jyrki P. Kukkonen, Rod Porter, John Renger, Jerome M Siegel, Gregor Sutcliffe, Neil Upton. Orexin receptors: OX1 receptor. Last modified on 20/02/2018. Accessed on 14/06/2018. IUPHAR/BPS Guide to PHARMACOLOGY, http://www.guidetoimmunopharmacology.org/GRAC/ObjectDisplayForward?objectId=321.

5. Christopher J. Winrow, Paul Coleman, Luis de Lecea, Thomas Kilduff, Jyrki P. Kukkonen, Rod Porter, John Renger, Jerome M Siegel, Gregor Sutcliffe, Neil Upton. Orexin receptors: OX2 receptor. Last modified on 20/02/2018. Accessed on 14/06/2018. IUPHAR/BPS Guide to PHARMACOLOGY, http://www.guidetopharmacology.org/GRAC/ObjectDisplayForward?objectId=322.

2¯ħı þ¯

La scl¶rose en plaques (SEP) est une maladie autoimmune inflammatoire et neurod¶g¶n¶rative du syst· me nerveux central (SNC) chez le jeune adulte r¶sultant d˘une alt¶ration cibl¶e de la my¶line. Les premiers sympt×mes de la SEP sont une d¶t¶rioration cognitive, des vertiges, des douleurs, de la fatigue et une perte de la vision. En condition physiologique, les axones des neurones sont entour¶s par une gaine de my¶line synth¶tis¶e par les oligodendrocytes permettant d˘acc¶l¶rer la vitesse de conduction des influx nerveux et de pr¶venir la mort neuronale. Le mod· le exp¶rimental le plus utilis¶ dans l˘¶tude des m¶canismes de la SEP est le mod· le de l˘enc¶phalomy¶lite autoimmune exp¶rimentale (EAE). Apr· s une immunisation contre la glycoprot¶ine oligodendrocytaire de la my¶line 35-55 ($MOG_{35-55}$), les lymphocytes T Cluster of differentiation (CD)4$^+$ helper (Th)1 et Th17 auto-r¶actifs induisent une r¶ponse inflammatoire aigu¹ ¯ la p¶riph¶rie puis migrent dans le SNC. Ils provoquent alors une r¶ponse inflammatoire dirig¶e contre la my¶line, avec l˘intervention des cellules my¶lo¾des. Cela aboutit ¯ la destruction des gaines de my¶line diminuant la vitesse de conduction des influx nerveux et une perte axonale, responsables des sympt×mes mentionn¶s pr¶c¶demment. A l˘heure actuelle, les traitements contre la SEP peuvent ralentir la progression de la paralysie et diminuer la s¶v¶rit¶ ainsi que l˘incidence des sympt×mes diminuant l˘inflammation. En revanche, ils n˘ont pas d˘effets sur les formes progressives de la maladie au cours desquelles les processus neurod¶g¶n¶ratifs s˘amplifient et dominent ceux de l˘inflammation. Il est donc n¶cessaire de trouver de nouvelles th¶rapies qui pourront ¯ la fois bloquer l˘inflammation et promouvoir la remy¶linisation et la neuror¶g¶n¶ration.

Dans cette optique, de nouvelles cibles th¶rapeutiques ont ¶merg¶ pour traiter la SEP : le Vasoactive Intestinal Peptide (VIP), le Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide (PACAP), l˘orexine A, leurs r¶cepteurs ainsi que leurs analogues. En effet, ces neuropeptides pr¶sentent des activit¶s anti-inflammatoires et neuroprotectrices. Mes travaux de th· se ont port¶ sur l˘¶tude des effets d˘un agoniste de VPAC2, l˘un des r¶cepteurs de VIP et PACAP, et de l˘orexine A sur les processus inflammatoires et neurod¶g¶n¶ratifs dans le mod· le d˘EAE ainsi que dans le mod· le toxique de la cuprizone (CPZ), induisant la mort des oligodendrocytes matures et la d¶my¶linisation ind¶pendamment des lymphocytes T.

Apr· s une immunisation contre la $MOG_{35-55}$, un traitement syst¶mique de court dur¶e avec $BAY_{55-9837}$, un agoniste de VPAC2, diminue la s¶v¶rit¶ de l˘EAE chronique en diminuant la r¶ponse inflammatoire ¯ la p¶riph¶rie avec une baisse de l˘activation lymphocytaire, de l˘activit¶ de pr¶sentation antig¶nique des cellules dendritiques et des monocytes ainsi qu˘une modulation de la population des lymphocytes T r¶gulateurs. Au niveau de la moelle ¶pini· re, l˘infiltration des cellules immunitaires est moindre et la proportion en microglie/macrophages est plus ¶lev¶e apr· s traitement par l˘agoniste de VPAC2. De plus, $BAY_{55-9837}$ diminue les processus de d¶my¶linisation et favorise ceux de remy¶linisation dans le mod· le de la CPZ.

En parall· le, l˘administration intrap¶riton¶ale ¯ court terme de l˘orexine A diminue drastiquement la s¶v¶rit¶ de l˘EAE chronique. Le traitement ne pr¶sente pas d˘effet sur la phase d˘immunisation de l˘EAE mais limite la phase effectrice avec une diminution de l˘infiltration des lymphocytes T CD4$^+$, des m¶diateurs inflammatoires, de la d¶my¶linisation, de l˘astrogliose et de l˘activation microgliale au niveau du SNC. Par contre, l˘administration syst¶mique de l˘orexine A ne semble pas avoir d˘effet sur les phases de d¶my¶linisation et de remy¶linisation au cours du mod· le de la CPZ.

Des perspectives prometteuses sont donc ouvertes pour le d¶veloppement de strat¶gies th¶rapeutiques efficaces utilisant des neuropeptides et leurs analogues contre la SEP ainsi que d˘autres maladies inflammatoires et/ou neurod¶g¶n¶ratives.

Projet cofinanc¶ par l˘Union Europ¶enne et la R¶gion Normandie. L˘Europe s˘engage en Normandie avec le Fonds Europ¶en de D¶veloppement R¶gional (FEDER)

Mots-cl¶s : agoniste de VPAC2, cuprizone, enc¶phalomy¶lite autoimmune exp¶rimentale, orexine A, scl¶rose en plaques, neuropeptides