



**HAL**  
open science

Mise en place d'un nouveau modèle murin d'encéphalite  
auto-immune à anticorps anti récepteur  
N-Methyl-D-Aspartate (NMDA)

Isabelle Wagnon

► To cite this version:

Isabelle Wagnon. Mise en place d'un nouveau modèle murin d'encéphalite auto-immune à anticorps anti récepteur N-Methyl-D-Aspartate (NMDA). Médecine humaine et pathologie. Normandie Université, 2021. Français. NNT : 2021NORMC409 . tel-03287004

**HAL Id: tel-03287004**

**<https://theses.hal.science/tel-03287004>**

Submitted on 15 Jul 2021

**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 ASPECTS MOLECULAIRES ET CELLULAIRES DE LA BIOLOGIE**

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

**Mise en place d'un nouveau modèle murin d'encéphalite auto-immune à anticorps anti récepteur N-Methyl-D-Aspartate (NMDA)**

**Présentée et soutenue par  
Isabelle WAGNON**

**Thèse soutenue le 09/06/2021  
devant le jury composé de**

Mme JOELLE CHABRY	Directeur de recherche au CNRS, Institut de Pharmacologie	Rapporteur du jury
M. FERHAT LOTFI	Chargé de recherche HDR, Aix-Marseille Université	Rapporteur du jury
M. ROLAND LIBLAU	Professeur des universités PraticienHosp, INSERM	Membre du jury
Mme CARINE ALI	Professeur des universités, Université Caen Normandie	Président du jury
M. FABIAN DOCAGNE	Directeur de recherche à l'INSERM, Université Caen Normandie	Directeur de thèse
M. ERIC MAUBERT	Maître de conférences HDR, Université Caen Normandie	Co-directeur de thèse

**Thèse dirigée par FABIAN DOCAGNE et ERIC MAUBERT, Physiopathologie et imagerie des troubles neurologiques**



UNIVERSITÉ  
CAEN  
NORMANDIE



Normande de Biologie Intégrative,  
Santé, Environnement



La science pour la santé  
From science to health



*Il y a deux moyens d'oublier les tracas de la vie : la musique et les chats. (Albert Schweitzer)*



## Remerciements

Tout d'abord je tiens à remercier le professeur Denis Vivien de m'avoir ouvert les portes de son laboratoire. Nous avons à disposition un matériel extraordinaire dans un cadre exceptionnel. Merci de m'avoir aidé et soutenu pour la suite de mon projet.

Une attention toute particulière pour Fabian Docagne, mon directeur de thèse. C'est en 2014 que j'ai découvert ton équipe et c'est en 2015 que j'ai eu la chance de l'intégrer. Tu m'as confié un projet exceptionnel : la mise en place d'un modèle animal. Un projet dur mais tellement stimulant. Grâce à toi, j'ai beaucoup appris en sciences mais aussi sur moi-même. Tu m'as donné les clés pour être plus rigoureuse. Ce travail ne serait pas ce qu'il est sans toi, tes précieux conseils et le temps que tu m'as consacré ces 5 dernières années (Eh oui depuis le master 1 !) Tout cela restera une expérience à jamais gravée dans ma mémoire. Tu es un super chef, à l'écoute et très humain.

Eric, merci beaucoup ! Tu as été patient et là quand j'avais besoin de toi. Je t'ai pris du temps durant le week-end mais je retiendrais que tu as toujours été là quand j'avais besoin de toi, un grand merci à toi.

Un grand merci à mes deux rapporteurs, le Dr. Joëlle Chabry et le Dr Lotfi Ferhat. C'est pour moi un honneur de vous compter parmi les membres de mon jury et je tiens à vous remercier pour l'expertise portée sur mon travail de thèse.

Un grand merci à mes examinateurs, Monsieur Roland Liblau, Madame Carine Ali et Madame Véronique Agin pour leur présence à ma thèse et leur expertise sur mon travail.

Merci à Pauline, tu as été une bouffée d'air frais dans mon ancien bureau. Nos conversations sur tout et rien, nos éclats de rire vont me manquer !! Je repense à « ganglion » notre vieil ami. Sans lui ma thèse eut été différente. Tu es une fille en or, j'ai de la chance de te compter parmi mes amis.

Un coucou aux anciens de ce bureau, Hélène, Anna.

Un merci et des encouragements futurs à Caroline, depuis le master 1 je travaille avec toi, aujourd'hui tu prends la relève, et je ne me fais pas de soucis sur ta réussite. Nos instants de perdition devant l'EEG, la pose des implants, les journées de chirurgie ; j'ai passé de très bons moments à tes côtés.

Merci à tout le labo, à l'équipe ; même si je ne me mêlais pas beaucoup aux autres (c'est mon caractère☺), je vous apprécie tous beaucoup.

Un MERCI énorme à Juju. Tu es une personne extraordinaire, j'aime nos longues discussions, nos moments passés ensemble. Tu vas aller loin mon Juju, très loin et j'espère voir et participer à cette réussite.

Julien, mon Juju, mon cœur. Tu es rentré dans ma vie il y a de cela un an. Tu es ma bouffée d'air et celui qui me motive quand je suis à bout. Tu as été très patient avec moi ces 3 derniers mois, je n'ai pas été facile à vivre mais tu ne m'en as jamais tenu rigueur. Tu es un chéri en or,

j'ai une chance unique de t'avoir. Je suis obligée de mentionner ici Tigrette, Céleste et le dernier petit guerrier de la famille Oscar. Merci pour vos ronrons et vos heures de pétrissage.

Merci à Varg, Carlito du haut de ton petit nuage et Hulk du haut du tien. Loki, merci d'avoir fait de mes matins un enfer, de mes nuits un cauchemar mais d'avoir une si jolie bouille.

Merci à Roger, Tomas. A très vite là-haut en plein blizzard.

Un grand merci à Florence, la plus belle rencontre de cette aventure passerelle, toujours là depuis notre aventure en médecine, une aide, une amie, une épaule sur qui compter en toutes circonstances.

Enfin, merci à mes parents, ces deux personnes exceptionnelles qui sont les piliers de ma vie. C'est à vous que je dédie cette thèse. Je vous aime au-delà du possible. Le trio unique.

## Résumé

L'encéphalite auto-immune à anticorps anti-N-méthyl-D-Aspartate (NMDAR) est une pathologie neuropsychiatrique touchant le système nerveux central (SNC). Elle est caractérisée par une production d'auto-anticorps dirigés contre le Domaine Amino-Terminal (ATD) de la sous unité GlunN1 du NMDAR. Les mécanismes mettant en cause la pathogénicité des anticorps au niveau cérébral font l'objet d'études. Cependant, peu d'étude préclinique s'intéresse aux mécanismes immuns et inflammatoires. Dans ce travail, nous proposons de mettre en place un nouveau modèle murin basé sur une immunisation active à l'aide d'un peptide contenant les acides aminés N368/G369 impliqués dans la maladie. Ce modèle murin est caractérisé par une ouverture de la barrière hémato-encéphalique (BHE) ; des hypersignaux périventriculaires en séquence T2-FLAIR ainsi que des dépôts d'immunoglobulines (IgGs) au sein du parenchyme cérébral. Deux semaines suivant l'immunisation, les souris développent des symptômes classiquement retrouvés dans la pathologie humaine. Ainsi, les souris présentent des déficits anxieux, des déficits de types dépressifs et des déficits de mémorisation spatiale à long terme. De plus, les souris montrent une susceptibilité plus importante aux crises d'épilepsie. Ces phénomènes coïncident avec une infiltration de lymphocytes B (B220<sup>+</sup>) dans le liquide céphalo-rachidien (LCR) ainsi qu'au niveau cérébral. Ces lymphocytes B se différencient en plasmocytes (CD138<sup>+</sup>) conduisant à une production d'IgGs dirigées contre le NMDAR. Ces IgGs sont retrouvées au niveau intrathécale. Enfin, une déplétion des lymphocytes B permet une réduction de la sévérité des déficits comportementaux observés. Ce modèle nous apporte un support pertinent pour la compréhension des mécanismes pathologiques impliqués dans la maladie ainsi qu'un modèle permettant de tester de nouvelles stratégies thérapeutiques ciblant le système immunitaire.

## Summary

Anti-N-Methyl-D-Aspartate receptor (NMDAR) encephalitis is a neuropsychiatric disease characterized by an antibody-mediated autoimmune response against NMDAR GluN1 subunit. Mechanisms by which anti-NMDAR antibodies are pathogenic are known. However, implication of immune system is still poorly understood. Our new model proposes to induce active immunization against the region of NMDAR containing N368-G369 amino-acids implicated in the pathogenic response. This immunization leads to a blood-brain barrier (BBB) opening, periventricular hypersignals in T2-FLAIR MRI sequence and Immunoglobulins (IgGs) deposits into the brain parenchyma. Two weeks after immunization, mice develop clinical symptoms close to those observed in human pathology: depressive and anxiety-like behavior, spatial long-term memory impairment and increased sensitivity to seizures. This response is dependent of B-cell (B220<sup>+</sup>) recruitment into the brain and cerebro-spinal fluid (CSF) where they differentiated into plasma cell (CD138<sup>+</sup>). Finally, blocking B-cell response using a depleting cocktail of antibodies reduced the severity of symptoms in encephalitis mice. This model offers us a relevant model to better understand mechanisms implicated in the pathology and testing new therapeutic strategies targeting the immune system in anti-NMDAR encephalitis.

## Table des matières

<b>Liste des figures</b> .....	5
<b>Abréviations</b> .....	9
<b>Introduction</b> .....	11
<b>I : L'encéphalite auto-immune à anticorps anti-NMDAR (EAI-NMDAR)</b> .....	11
<b>I-1 : Etiologie et terrain</b> .....	11
<b>I-2 : Epidémiologie</b> .....	12
<b>I-3 : Les différentes formes d'encéphalite auto-immune à anticorps anti-NMDAR</b> .....	12
<b>I-3-A : L'encéphalite auto-immune à anticorps anti-NMDAR de type paranéoplasique</b> .....	13
<b>I-3-B : La forme infectieuse</b> .....	14
<b>I-4 : Symptomatologie clinique des différentes phases associées à l'EAI à anticorps anti-NMDAR</b> .....	14
<b>I-4-A : La symptomatologie clinique de la phase prodromale</b> .....	15
<b>I-4-B : La symptomatologie clinique de la phase psychiatrique</b> .....	16
<b>I-4-C : La symptomatologie clinique de la phase neurologique</b> .....	17
<b>I-5 : Outils diagnostics de la pathologie</b> .....	17
<b>I-5-A : Détection des auto-anticorps dans le sang et le liquide cébrospinal</b> .....	17
<b>I-5-B : Autres anomalies du liquide céphalo-rachidien</b> .....	19
<b>I-5-C : Autres examens complémentaires</b> .....	20
<b>I-5-D : Histologie cérébrale : études post-mortem et biopsies cérébrales</b> .....	23
<b>I-6 : Thérapies disponibles ou traitements</b> .....	25
<b>II : Le récepteur NMDA et son implication dans la physiopathologie de l'encéphalite auto-immune à anticorps anti récepteur NMDA</b> .....	26
<b>II.1 Généralité sur les récepteurs glutamatergiques</b> .....	26
<b>II-2 : Le NMDAR : structure, localisation et rôle en condition physiologique</b> .....	27
<b>II-2-A : Généralité sur le récepteur NMDA</b> .....	27
<b>II-2-B : Localisation des récepteurs NMDA</b> .....	28
<b>II-2-C : Structure du récepteur NMDA : constitution en sous unités</b> .....	28
<b>II-2-D : Caractérisation de l'épitope reconnu par les anticorps anti-NMDAR et effets directs sur l'activité du NMDAR</b> .....	31
<b>II-2-E : Effets des auto-anticorps anti-NMDAR sur l'adressage au niveau post synaptique du récepteur NMDA</b> .....	33
<b>II-2-F : L'hippocampe : une structure préférentiellement touchée dans l'EAI à anticorps anti récepteur NMDA</b> .....	36

<i>III : Les modèles murins d'encéphalite auto-immune à anticorps anti récepteur NMDA</i> .....	39
<i>III-1 : Le modèle d'infusion intra cérébroventriculaire</i> .....	39
<i>III-1-A : Présentation des tests comportementaux réalisés dans le modèle d'infusion intra cérébroventriculaire</i> .....	40
<i>III-1-B Etudes immunohistologiques dans le modèle d'infusion intra cérébroventriculaire</i> .....	43
<i>III-2 : Modèles murins d'EA à anticorps anti-NMDAR basés sur une immunisation active</i> .....	46
<i>III-2-A : Modèle de Pan et collaborateurs en 2017</i> .....	47
<i>III-2-B : Modèle de Jones et collaborateurs en 2019</i> .....	50
<i>III-2-C : Modèle de Ding et collaborateurs en 2021</i> .....	55
<i>III-3 : Modèle d'injection intracérébroventriculaire de Wright et collaborateurs en 2015 : une adaptation du modèle d'infusion pour l'étude de l'épilepsie</i> .....	60
<i>IV : Les lymphocytes B : cellules centrales dans l'encéphalite auto-immune à anticorps anti-NMDAR</i> .....	63
<i>IV-1 : Introduction</i> .....	64
<i>IV-2 : La phase indépendante de l'antigène : les principaux acteurs cellulaires et moléculaires précoces</i> .....	64
<i>IV-2-A : Développement précoce des cellules B au niveau embryonnaire et les principaux acteurs moléculaires associés</i> .....	65
<i>IV-2-B : Suite de la différenciation de la lignée B dans la moelle osseuse</i> .....	68
<i>IV-2-C : Suite du développement : l'acquisition du pré-récepteur de la cellule B (Pre-BCR)</i> .....	72
<i>IV-3 : Lymphocytes B transitionnels : passage vers les organes lymphoïdes secondaires</i> .....	74
<i>IV-4 : Différenciation et maturation des cellules B : les sous types B1 et B2</i> .....	75
<i>IV-4-A : Les lymphocytes B1</i> .....	76
<i>IV-4-A-a : Les lymphocytes B1-a</i> .....	77
<i>IV-4-A-b : Les lymphocytes B1-b</i> .....	77
<i>IV-4-B : Les lymphocytes B2</i> .....	78
<i>IV-4-B-a : Les lymphocytes B2 de la zone marginale</i> .....	78
<i>IV-4-B-b : Les lymphocytes B2 de la zone folliculaire</i> .....	79
<i>IV-5 : Lymphocytes B mémoire et plasmocyte</i> .....	79
<i>IV-5-A : Les lymphocytes B mémoires</i> .....	79
<i>IV-5-B : Les plasmocytes</i> .....	81
<i>IV-5-B-a : Les acteurs moléculaires au cœur de la formation du plasmocyte</i> .....	81
<i>IV-5-B-b : Les différentes populations plasmocytaires</i> .....	82
<i>IV-5-B-b-1 : Les plasmocytes à courte durée de vie</i> .....	83

IV-5-B-b-2 : Les plasmocytes à longue durée de vie.....	83
V - Les points de contrôle de régulation de la cellule B : prévention de l'auto-immunité.....	84
V-1 Introduction .....	84
V-1-A La tolérance centrale et périphérique .....	84
V-2 : L'immunité dans l'encéphalite auto-immune à anticorps anti NMDAR : l'hypothèse paranéoplasique .....	87
Objectifs de la thèse .....	91
VI: Résultats .....	94
VI-A: Article 1: Autoimmune encephalitis mediated by B-cell response against NMDAR in the mouse.....	94
VI-B: Article 2: Environmental enrichment alleviates the deleterious effects of stress in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE).....	116
VII- Discussion .....	127
VII-1 : Notre modèle confronté aux autres modèles animaux d'EAI à anticorps anti-NMDAR....	127
VII-1-A : Notre modèle confronté au modèle d'infusion de Planagumà et al., 2015.....	128
VII-1-B : Notre modèle confronté au modèle d'injection intra cérébroventriculaire de Wright et al. 2015.....	130
VII-1-C : Notre modèle par rapport à un modèle d'immunisation active réalisé sur une souche de souris transgéniques ApoE <sup>-/-</sup> .....	130
VII-1-D : Notre modèle confronté au modèle de Jones et al., 2019.....	132
VII-1-E : Notre modèle confronté au modèle de Ding et al., 2020 .....	133
VII-2 : Anticorps anti-NMDAR : bénéfiques ou délétères, une question d'épitopes .....	136
VII-3 : Le système immunitaire : point central de notre modèle .....	138
VII-4 : Pour aller plus loin dans l'étude du système immunitaire .....	139
VII-4-A : L'analyse des cytokines et des chemokines dans le LCR .....	139
VII-4-B : BAFF et APRIL : deux candidats de choix dans la lignée des lymphocytes B .....	141
VII-5 : Perspectives de recherches basées sur les études in vitro et in vivo .....	142
VII-5-A : Les études in vitro .....	142
VII-5-B : Les études in vivo .....	143
VIII : Conclusion.....	144
Bibliographie.....	146

## Liste des figures

**Figure 1 :** Photographie et immunomarquages obtenus à partir d'un tératome ovarien issu d'une patiente atteinte d'encéphalite auto-immune à anticorps anti-NMDAR.

**Figure 2 :** Évolution clinique des symptômes et du statut mental des patients dans l'encéphalite auto-immune à anticorps anti-NMDAR.

**Figure 3 :** Protocole d'immunocytochimie réalisé sur des cellules HEK-293 transfectées et testant la présence d'anticorps anti-NMDAR dans le LCR et le sérum d'un patient atteint d'EAI à anticorps anti-NMDAR.

**Figure 4 :** Immunomarquage anti-NMDAR sur une coupe de cerveau de rat révélé avec des anticorps anti-NMDAR issus du LCR d'un patient atteint de l'encéphalite auto-immune à anticorps anti-NMDAR.

**Figure 5 :** IRM cérébrale T2-FLAIR aux semaines 2 et 8 après l'établissement du diagnostic.

**Figure 6 :** Evolution des tracés EEG en fonction du statut clinique lors de l'EAI à anticorps anti-NMDAR.

**Figure 7 :** Biopsies cérébrales de deux patients atteints d'EAI anti-NMDAR.

**Figure 8 :** Organisation schématique d'une sous unité du NMDAR.

**Figure 9 :** Schéma de l'ATD de la sous unité GluN1 du NMDAR en condition sauvage ou mutée.

**Figure 10 :** Les récepteurs AMPA et NMDA sont physiologiquement localisés au niveau de l'élément post-synaptique.

**Figure 11 :** Interaction entre les récepteurs NMDA et éphrin-B2 (EPHB2-R) dans le cadre de l'EAI à anticorps anti-NMDAR.

**Figure 12 :** Evolution du titre en anticorps anti-NMDAR chez un patient atteint d'une forme d'encéphalite de type infectieuse.

**Figure 13 :** Mécanisme d'action des auto-anticorps anti-NMDAR au niveau synaptique.

**Figure 14 :** *Les anticorps de patients atteints de l'encéphalite auto-immune à anticorps anti NMDAR réduisent le nombre de récepteurs NMDA au niveau synaptique sans altérer le nombre de synapses.*

**Figure 15 :** *Présentation schématique du protocole utilisé dans le modèle de Planagumà et collaborateurs.*

**Figure 16 :** *Déficits mnésique, anhédonique et de type dépressif induits par l'infusion de LCR de patients atteints d'encéphalite à anticorps anti-NMDAR.*

**Figure 17 :** *L'infusion de LCR issus de patients atteints d'EAI anti-NMDAR n'induit pas chez la souris de modifications significatives lors de tests permettant d'évaluer l'anxiété, l'agressivité ou la locomotion.*

**Figure 18 :** *Visualisation (A et B) et quantification (C) de la fixation des anticorps humains dans le cerveau des souris infusées.*

**Figure 19 :** *Réduction spécifique de la densité de NMDAR totale et synaptique au niveau de l'hippocampe des souris dans le protocole d'infusion intracérébroventriculaire.*

**Figure 20 :** *Absence d'infiltrations immunitaires et de mort de type apoptotique dans le modèle d'infusion intracérébroventriculaire développé par Planagumà et collaborateurs.*

**Figure 21 :** *Image extraite de l'étude de Pan et collaborateurs illustrant le protocole utilisé lors de la mise en place du modèle murin d'EAI à anticorps anti-NMDAR.*

**Figure 22 :** *Test du champs ouvert (open field) pratiqué chez les souris ApoE<sup>-/-</sup> et ApoE<sup>+/+</sup> 27 jours post immunisation avec de l'ovalbumine seule ou bien avec les quatre peptides GluN1-NMDAR.*

**Figure 23 :** *Immunohistochimie et quantification des cellules immunitaires Iba1<sup>+</sup> et CD3<sup>+</sup> infiltrées au sein de l'hippocampe post-immunisation chez les souris ApoE<sup>-/-</sup>.*

**Figure 24 :** *Schéma du protocole expérimental utilisé dans l'étude de Jones et collaborateurs en 2019.*

**Figure 25 :** *Protocole comportemental utilisé dans le modèle de Jones et collaborateurs en 2019.*



**Figure 26 :** Photographie d'immunohistochimie mettant en évidence l'infiltration de cellules immunitaires au sein du SNC dans le modèle de Jones et collaborateurs.

**Figure 27 :** Protocole expérimental utilisé dans le modèle de Ding et collaborateurs en 2021.

**Figure 28 :** Tableau récapitulatif des différents peptides conçus et utilisés pour les immunisations dans le modèle murin proposé par Ding et collaborateurs en 2021.

**Figure 29 :** Image issue d'une technique d'ICC sur cellule HEK293 transfectées utilisant le LCR issu de l'immunisation contre le peptide muté GluN1(N368Q).

**Figure 30 :** Photographie d'IHC de coupe d'hippocampe et de cervelet de souris immunisées contre le peptide GluN1<sub>356-385</sub> et les souris contrôles ciblées par un marquage anti-IgG.

**Figure 31 :** Diagrammes représentant les différents tests comportementaux réalisés par les souris immunisées contre le peptide GluN1<sub>356-385</sub> et les souris du groupe contrôle 12 semaines post immunisation.

**Figure 32 :** Dispositif d'implant EEG placé sur le crâne de la souris et relié à un boîtier d'enregistrement en sous cutané, au niveau dorsal.

**Figure 33 :** Sévérité et nombre de convulsions observés dans le modèle d'injection intra cérébroventriculaire de LCR chez des sujets contrôles (A) ou des patients (B) après une injection unique de PTZ.

**Figure 34 :** Schéma représentant le diagramme des principaux acteurs transcriptionnels et cellulaires au cours de l'hématopoïèse.

**Figure 35 :** Schéma représentant les principales étapes de développement des lymphocytes B dans la moelle osseuse associées aux principaux marqueurs de surface murins puis la sortie du LB immature de la moelle osseuse vers la rate où il pourra poursuivre sa différenciation et sa maturation.

**Figure 36 :** Représentation schématique de la recombinaison V(D)J de la chaîne lourde (IgH) à partir de segments de gène de la lignée germinale.

**Figure 37 :** Représentation schématique des positions et structures des séquences de signal de recombinaison (RSS – Recombinase Sequence Signal) au niveau des segments des gènes V, D et J et des séquences C des chaînes lourdes.

**Figure 38 :** Schéma représentant la structure moléculaire du pré-BCR.

**Figure 39 :** Cellules B immatures transitionnelles : de la sortie de la moelle osseuse à la rate associées à leurs marqueurs de surface chez la souris.

**Figure 40 :** Schéma représentant les lignées (B1 et B2) et leurs fonctions associées.

**Figure 41 :** Les cinq sous types de cellules B mémoires murines

**Figure 42 :** Les différents stades cellulaires allant du lymphocyte B au plasmocyte.

**Figure 43 :** Développement des cellules B au sein de la moelle osseuse et mécanisme de tolérance centrale et périphérique.

**Figure 44 :** Physiopathologie et réponse immunitaire de la forme paranéoplasique.

**Figure 45 :** Tableau récapitulatif des modèles présentés dans ce travail et leurs principales caractéristiques.

**Figure 46 :** Tableau récapitulatif des avantages et des inconvénients de chaque modèle expliqué dans le manuscrit (Bleu) (Planagumà et al., 2015 ; Pan et al., 2017 ; Jones et al., 2019 ; Ding et al., 2021) et la comparaison à notre modèle (Wagnon et al., 2020) (rose).

## *Abréviations*

AID : Activation-Induced cytidine Deaminase

AMPA : acide 2-amino-3-(5-méthyl-3-hydroxy-1,2-oxazol-4-yl) propanoïque.

ATD : Amino-Terminal Domain

AVC : Accident Vasculaire Cérébral

BAFFR : B-cell-Activating Factor Receptor

BHE : Barrière Hémato-Encéphalique

BSAP : B-cell-Specific-Activator Protein

CB : CentroBlaste

CC : CentroCyte

CDC : Commutation De Classe

CD : Cluster de Différenciation

CG : Centre Germinatif

CLP : Common Lymphoid Progenitor

CTD : Carboxyl Terminal Domain

EAE : Encéphalomyélite Auto-immune Expérimentale

EAI : Encéphalite Auto-Immune

EBD : Extreme Delta Brush

EEG : Electroencéphalographie

EphB2R : Récepteur EphB2

FLAIR : Fluid Attenuated Inversion Recovery

Fo : Folliculaire

GRDA : Generalized Rhythmic Delta Activity

HC : Heavy Chain

HEK 293 : Human Embryonic Kidney 293

HSC : Hemapoietic Stem Cell

HSV-1 : Herpes Simplex Virus de type 1

ICOS : Inducible COStimulator

Ig : Immunoglobuline

IL : InterLeukine

IVIg : ImmunoGlobulines par voie IntraVeineuse

KLH : Keyhole Limpet Hemocyanin

LC : Light Chain

LCR : Liquide Céphalo-Rachidien

LBD : Ligand Binding Site

IRM : Imagerie par Résonance Magnétique

MOG : Glycoprotéine Oligodendrogliale de Myéline

NAbs : Natural Antibodies

NMDA : N-Méthyl-D-Aspartate

NMDAR : N-Méthyl-D-Aspartate Receptor

PAX-5 : Paired-Box Protein 5

PD-1 : Programme Death-1

PLP : Protéine ProtéoLipidique

Pré-B : Précurseur de lymphocyte B

Pro-B : Progéniteur de lymphocyte B

SEP : Sclérose En Plaques

SHM : Somatic Hyper Mutation

SNC : Système Nerveux Central

TACI : Transmembrane Activator and Calcium-modulating cyclophilin-ligand Interactor

TNF $\alpha$  : Tumor Necrosis Factor alpha

VZV : Virus de la Varicelle-Zona

## Introduction

Au sens commun, une encéphalite est une inflammation plus ou moins étendue de l'encéphale qui se traduit par des symptômes variés tels que fièvre, fatigue, maux de tête, troubles de la vision, troubles de la conscience, modifications du comportement, convulsions, ou paralysies. Cette inflammation peut être provoquée par une infection (bactérienne, parasitaire ou virale), un processus auto-immun, des toxines, ou peut encore être due à d'autres étiologies (Tumeurs, accident vasculaire cérébral).

Nous verrons à travers ce travail que certaines pathologies auto-immunes peuvent être la résultante indirecte d'autres atteintes de l'organisme. C'est le cas de l'encéphalite auto-immune (EAI) à anticorps anti-récepteur NMDA (NMDAR). L'EAI à anticorps anti-NMDAR peut, dans une de ses formes, être la conséquence d'une tumeur induisant des syndromes neuropsychiatriques paranéoplasiques, c'est-à-dire qu'ils se développent en parallèle du développement d'une tumeur. La découverte de cette pathologie a suscité l'intérêt de la communauté scientifique en tant que désordre dysimmunitaire pouvant affecter la mémoire et la cognition (Dalmau *et al.*, 2008). Ses similitudes avec la schizophrénie sur le plan syndromique en font un sujet d'étude pertinent notamment pour l'établissement de diagnostic différentiel précis mais également pour l'étude des troubles psychiatriques dans un contexte immunitaire. Cette pathologie, au carrefour de la neurologie, de la psychiatrie et de la médecine interne reste encore aujourd'hui obscure et souvent mal diagnostiquée.

## I : L'encéphalite auto-immune à anticorps anti-NMDAR (EAI-NMDAR)

### I-1 : Etiologie et terrain

L'EAI à anticorps anti-NMDAR est une pathologie qui a été découverte en **2007** par le neurologue espagnol **Josef Dalmau** (Dalmau *et al.*, 2007 ; Sansing *et al.*, 2007). La pathologie affecte **1,5 personnes par million d'individus chaque année dans le monde**. Ce chiffre est probablement sous-estimé étant donné le nombre croissant de nouveaux cas diagnostiqués par an (Venkatesaen *et al.*, 2013 ; Venkatesan et Adatia., 2017).

Au même titre que d'autres pathologies auto-immunes, l'EAI à anticorps anti-NMDAR touche majoritairement **le jeune adulte** avec une prédisposition pour le **sexe féminin**. La femme est affectée dans 81 % des cas (Dalmau *et al.*, 2008 ; Leypold *et al.*, 2015 ; Venkatesan et Adatia., 2017). L'âge médian d'apparition de la maladie se situe entre **21 et 23 ans** ; 37 % des sujets féminins ont moins de 18 ans et 5% ont plus de 45 ans (Dalmau *et al.*, 2008 ; Leypold *et al.*, 2013 ; Leypold *et al.*, 2015 ; le Guen *et al.*, 2015). Le patient le plus jeune avait 2 mois et le plus âgé, 85 ans (Kayser et Dalmau.,2016). **Les hommes** peuvent également être affectés par la maladie mais en moindre mesure (Le guen *et al.*, 2015).

### ***I-2 : Epidémiologie***

Les anticorps anti-NMDAR ont été pour la première fois caractérisés en 2007 chez douze femmes par l'équipe barcelonaise du Pr. Josef Dalmau (Dalmau *et al.*, 2007), c'est-à-dire deux ans après la description clinique des premiers cas (Vitaliani *et al.*, 2005). Par la suite, une meilleure sensibilisation et formation du personnel médical face à cette nouvelle pathologie a permis d'augmenter de manière significative le nombre de cas diagnostiqués ainsi que la rapidité d'établissement du diagnostic. Depuis lors, l'encéphalite à anticorps anti-NMDAR semble être la plus fréquente des encéphalites auto-immunes (Granerod *et al.* 2010) et infectieuses chez les personnes de moins de 30 ans (Gable *et al.* 2012).

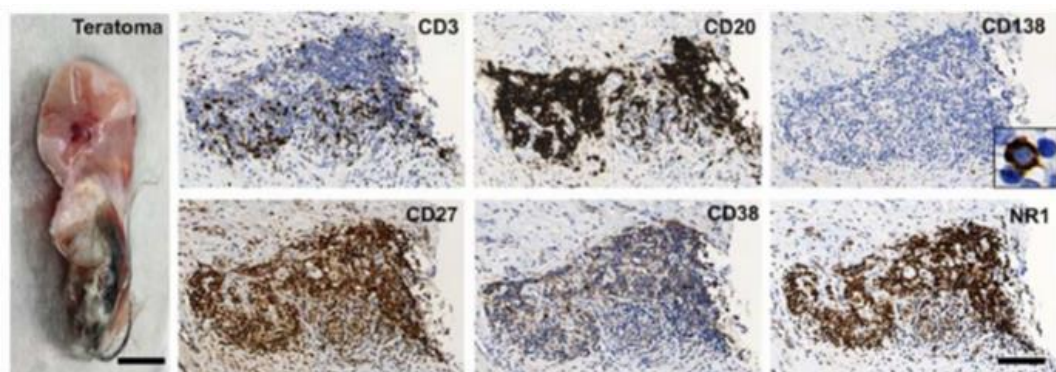
Nous allons, ci-après, décrire les deux principales formes d'EAI à anticorps anti-NMDAR classiquement rencontrées : la forme infectieuse et la forme paranéoplasique.

### ***I-3 : Les différentes formes d'encéphalite auto-immune à anticorps anti-NMDAR***

Depuis sa découverte en tant que syndrome paranéoplasique, plusieurs autres formes d'EAI à anticorps anti-NMDAR ont pu être mises en évidence. **Deux grands types** d'EAI à anticorps anti-NMDAR peuvent être différenciés et sont, soit liés à une **tumeur**, soit associés à la présence d'un **agent infectieux**. Nous allons ici nous focaliser sur ces deux formes qui restent celles les plus classiquement rencontrées dans la littérature scientifique.

### *I-3-A : L'encéphalite auto-immune à anticorps anti-NMDAR de type paranéoplasique*

Un évènement paranéoplasique correspond à l'ensemble des manifestations pouvant se mettre en place en parallèle d'une tumeur. Dans ce cas précis, la tumeur est un **tératome** signifiant en grec « tumeur monstre » (*figure 1*). Cette tumeur est composée de cellules germinales pluripotentes permettant la présence de tissus complexes tels que du tissu nerveux localisé dans des zones anormales (exemple : l'ovaire) (Day *et al.*, 2014 ; Lemura *et al.*, 2018). D'une manière générale, ce type de tumeur se compose de cellules issues des 3 feuilletts embryonnaires classiquement décrits que sont l'endoderme, le mésoderme et l'ectoderme. Ces trois feuilletts peuvent en théorie donner n'importe quel tissu ou ébauche d'organe. Il est ainsi possible d'observer au sein de ces tératomes des cheveux, des dents ou bien encore des ébauches d'yeux pour la partie macroscopique. Pour la partie microscopique, nous constatons la présence d'un important infiltrat de cellules immunitaires composé principalement de lymphocytes B (CD20), de plasmocytes (CD138) et, de manière plus rare, de lymphocytes T (CD3) (*Figure 1*) (Tüzün *et al.*, 2009 ; Braverman *et al.*, 2015 ; Lemura *et al.*, 2018 ; Chefdeville *et al.*, 2019). Dans le cas des encéphalites de type paranéoplasique, l'ovaire est l'organe le plus souvent touché (80 % des cas) (Dalmau *et al.*, 2007-2008 ; Florance *et al.*, 2009 ; Dalmau *et al.*, 2011).



**Figure 1 : Photographie et immunomarquages obtenus à partir d'un tératome ovarien issu d'une patiente atteinte d'encéphalite auto-immune à anticorps anti-NMDAR.**

*Photographie du tératome (barre d'échelle : 0.2 cm). Sur la droite de la photographie, nous observons, à fort grossissement, des immunomarquages mettant en évidence différentes populations leucocytaires au sein du tératome ainsi qu'un immunomarquage anti-GluN1 (anciennement NR1). Les immunomarquages du haut illustrent la présence de lymphocytes T (CD3<sup>+</sup>), de lymphocytes B (CD20<sup>+</sup>) et de plasmocytes (CD138<sup>+</sup>). Les images du bas montrent la*

*présence de cellules CD27<sup>+</sup> et CD38<sup>+</sup> (marqueurs des lymphocytes B mémoires) et un immunomarquage anti-GluN1. La sous unité GluN1 du NMDAR est largement exprimée au sein de ce tératome. Barre d'échelle : 100  $\mu$ m (D'après l'étude de Makuch et al., 2018).*

D'autres cancers peuvent induire une EAI à anticorps anti-NMDAR comme dans le cas des tératomes médiastinaux (situés dans le médiastin, près de l'ensemble cœur-poumons) ou encore le carcinome pulmonaire à petites cellules (Dalmau *et al.*, 2008 ; Dalmau *et al.*, 2011 ; Venkatesan et Adatia., 2017). Chez les individus masculins, l'étiologie paranéoplasique est plus rarement évoquée mais des tératomes testiculaires peuvent être rapportés dans différents cas cliniques (Dalmau *et al.*, 2008 ; Dalmau *et al.*, 2011 ; Venkatesan et Adatia., 2017).

### ***I-3-B : La forme infectieuse***

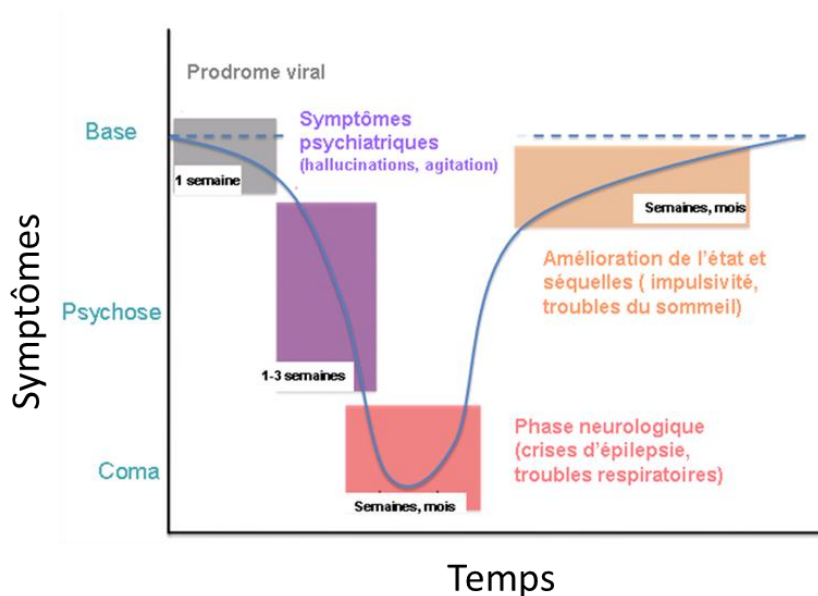
Cette forme nécessite l'implication d'un agent bactérien ou viral à distance. Le **sang** et le **liquide céphalorachidien** (LCR) sont analysés dans le but de trouver le pathogène mis en cause (Venkatesan *et al.*, 2013). Les patients présentent souvent des sérologies positives pour le virus de l'Herpès simplex de type 1 (HSV-1) (Nosadini., 2017), pour l'entérovirus de type 1 ou encore pour le *Mycoplasma pneumoniae* ; ce dernier étant toutefois plus impliqué dans les cas pédiatriques que nous ne traiterons pas ici (Dalmau *et al.*, 2011 ; Venkatesan *et al.*, 2013). Il est également possible de retrouver le virus varicelle-zona (VZV) ou encore le virus de la grippe H1N1 (Le Guen *et al.*, 2015). Il est important de noter que malgré de larges investigations, l'étiologie des encéphalites, dans leur globalité, reste inconnue dans 30 à 60% des cas (Glaser *et al.*, 2003 ; Glaser *et al.*, 2006 ; Granerod *et al.*, 2010 ; Bloch et Glaser 2015 ; Pillai *et al.*, 2015 ; Parpia *et al.*, 2016).

### ***I-4 : Symptomatologie clinique des différentes phases associées à l'EAI à anticorps anti-NMDAR***

La symptomatologie clinique de l'EAI à anticorps anti-NMDAR est vaste et présente des manifestations à la fois psychiatriques et neurologiques. Il est admis que cette pathologie



évolue selon trois phases distinctes caractérisées par une symptomatologie propre à chacune d'entre elles ; ces trois phases sont décrites ci-après (**Figure 2**).



**Figure 2 : Évolution clinique des symptômes et du statut mental des patients dans l'encéphalite auto-immune à anticorps anti-NMDAR au cours du temps.**

Trois phases cliniques se dégagent dans cette pathologie. Une phase dite prodromale (rectangle gris), une phase psychiatrique (rectangle violet) et une dernière dite phase neurologique (rectangle rose). Chaque phase va évoluer de manière bien spécifique avec des symptômes propres dont la gravité augmente avec le temps. Plus la pathologie évolue et plus les symptômes vont être invalidants pouvant conduire au coma. Néanmoins, cette pathologie reste traitable avec des séquelles peu importantes si elle est diagnostiquée rapidement et efficacement (D'après l'étude de Kayser et Dalmau, 2014).

#### **I-4-A : La symptomatologie clinique de la phase prodromale**

Cette phase initiale correspond à des symptômes classiquement rencontrés lors d'une grippe ou d'une gastro-entérite d'origine virale ; elle peut durer entre 1 et 21 jours en fonction des patients (Dalmau *et al.*, 2007 ; Venkatesan et Adatia., 2017) mais elle dure en moyenne une semaine (**figure 2**) (Kayser et Dalmau., 2014). Au cours de cette phase, des épisodes de fièvre, des courbatures, des céphalées et la présence de troubles gastriques plus ou moins sévères sont observés. Cette phase est constatée chez 70 % des patients mais est souvent négligée ou oubliée par les patients eux-mêmes (Dalmau *et al.*, 2008 ; Florance *et al.*, 2009 ;

Dalmau *et al.*, 2011 ; Peery *et al.*, 2012 ; Zekeridou *et al.*, 2015 ; Leypold *et al.*, 2015). À la suite de ce prodrome, la maladie va évoluer de manière brutale avec des symptômes caractérisant une maladie neuropsychiatrique.

#### ***I-4-B : La symptomatologie clinique de la phase psychiatrique***

La phase psychiatrique débute après la phase prodromale (*figure 2*). Les symptômes que nous allons présenter peuvent mimer un premier épisode psychotique schizophrénique (renforçant la nécessité de diagnostiquer efficacement cette pathologie). Ainsi, 77 % des patients sont, en première intention, hospitalisés en unité psychiatrique et de ce fait, souvent mal diagnostiqués (Dalmau *et al.*, 2007 ; Sansing *et al.*, 2007 ; Dalmau *et al.*, 2008 ; Sarosh R Irani *et al.*, 2010 ; Wandinger *et al.*, 2011 ; Maat *et al.*, 2012 ; Titulaer *et al.*, 2013 ; Le guen *et al.*, 2015 ; Bost., 2016 ; Venkatesan et Adatia., 2017). Les premières manifestations commencent généralement par une baisse de l'attention alternant avec des périodes de forte agitation. Apparaissent ensuite certaines manifestations physiques comme des dyskinésies (mouvements anormaux et involontaires) centrées surtout sur la face et la bouche, des mouvements involontaires des membres supérieurs et inférieurs mais aussi des troubles du sommeil (Dalmau *et al.*, 2008 ; Dalmau *et al.*, 2011 ; Le Guen *et al.*, 2015 ; Blattner *et al.*, 2018). Des symptômes psychotiques positifs peuvent venir s'ajouter à ce tableau clinique tels que la présence d'idées délirantes ou encore des hallucinations visuelles et/ou auditives (Le Guen *et al.*, 2015). Des crises d'épilepsie sont aussi décrites et peuvent survenir dès la phase psychiatrique pour souvent se majorer durant la phase neurologique (*figure 2*) (Dalmau *et al.*, 2011 ; Le Guen *et al.*, 2015 ; Venkatesan et Adatia., 2017). L'apparition de crises d'épilepsie sera plus fréquente chez les hommes durant la phase psychiatrique, tandis que les femmes vont être touchées en première intention par des déficits psychiatriques (Viaccoz *et al.*, 2014 ; Bost., 2016). Les enfants, lors des cas pédiatriques (Armangue *et al.*, 2013) peuvent eux aussi être touchés par des crises d'épilepsie tandis que les personnes âgées vont d'avantage être affectées par des déficits mnésiques (Titulaer *et al.*, 2013). Plus l'EAI à anticorps anti-NMDAR est diagnostiquée tôt et plus les traitements permettront une récupération efficace sans trop de séquelles, la complexité résidant alors dans l'établissement d'un diagnostic différentiel correct (Sansing *et al.*, 2007 ; Dalmau *et al.*, 2008 ; Dalmau *et al.* 2011).

#### ***I-4-C : La symptomatologie clinique de la phase neurologique***

À ce stade de la maladie, une étiologie plutôt en faveur d'un trouble organique est généralement évoquée. Les symptômes psychiatriques laissent place à des symptômes neurologiques tels que des dysautonomies (anomalie du système nerveux autonome) avec notamment des troubles sphinctériens, une hypoventilation, la présence d'une tachycardie ou encore de l'hyperthermie (**figure 2**) (Dalmau *et al.*, 2011 ; Le Guen *et al.*, 2015 ; Kayser et Dalmau., 2016 ; Venkatesan et Adatia., 2017). Notons également qu'à ce stade, 76 % des patients souffrent de crises d'épilepsie. Durant cette phase et en l'absence d'un traitement adéquat, l'état du patient va considérablement se dégrader. Certaines personnes vont sombrer dans un mutisme total et présenter une atonie musculaire généralisée. D'autres vont nécessiter une ventilation artificielle et la pose d'une sonde nasogastrique (Dalmau *et al.*, 2011 ; Le Guen *et al.*, 2015 ; Kayser et Dalmau., 2016). Si rien n'est réalisé dans un délai convenable, la personne peut sombrer dans le coma ou décéder.

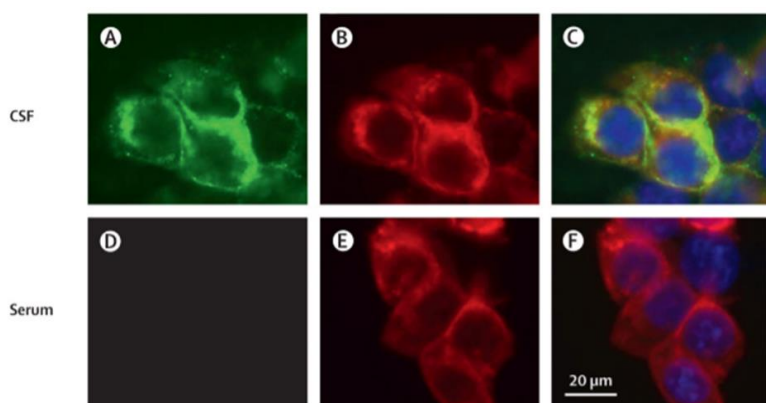
#### ***I-5 : Outils diagnostics de la pathologie***

Depuis ces dix dernières années, la recherche sur les encéphalites d'origine paranéoplasique et infectieuse a permis une évolution considérable de nos connaissances. Les diagnostics sont de plus en plus rapides et fiables et permettent de mieux cibler l'agent responsable de la pathologie. Les techniques de diagnostic actuelles sont basées sur des analyses sanguines, du LCR ou encore en utilisant des séquences d'imagerie par résonance magnétique (IRM) ; ces approches permettent de mieux diagnostiquer et comprendre les EAIs à anticorps anti-NMDAR. Les méthodes de diagnostic utilisées en routine clinique sont décrites dans les paragraphes ci-dessous.

##### ***I-5-A : Détection des auto-anticorps dans le sang et le liquide cébrospinal***

La **présence d'auto-anticorps dirigés contre le NMDAR** dans le **LCR** ou dans le **sérum** est la **condition sine qua none** pour l'établissement du diagnostic (Sansing *et al.*, 2007 ; Dalmau *et al.*, 2008 ; Dalmau *et al.*, 2011 ; Gresa-Arribas *et al.*, 2014). Les auto-anticorps anti-NMDAR sont les **biomarqueurs clés** de cette maladie ; ils permettent, entre autres, de poser un diagnostic rapide et sûr. La présence de ces anticorps est plus pertinente quand elle est

établie dans le LCR plutôt que dans le sérum (Titulaer *et al.*, 2013) (**Figure 3**). Dans le but d'écartier les faux positifs, le sérum et le LCR doivent être testés ensemble avec les préconisations cliniques de routine (Dalmau *et al.*, 2011). La présence d'anticorps anti-NMDAR dans le LCR est le signe qu'une **production intrathécale d'immunoglobulines** est en cours. La **méthode de détection la plus couramment utilisée consiste à incuber le LCR ou le sérum sur des cellules embryonnaires humaines de rein** (Human Embryonic Kidney 293 – HEK293) **transfectées** avec les sous unités **GluN1a et GluN2b du NMDAR**. Le LCR (**Figure 3.A**) et le sérum (**Figure 3.D**) sont testés. Comme mentionné plus haut, le sérum peut s'avérer séronégatif (**Figure 3.D**) (Sansing *et al.*, 2007 ; Dalmau *et al.*, 2011).

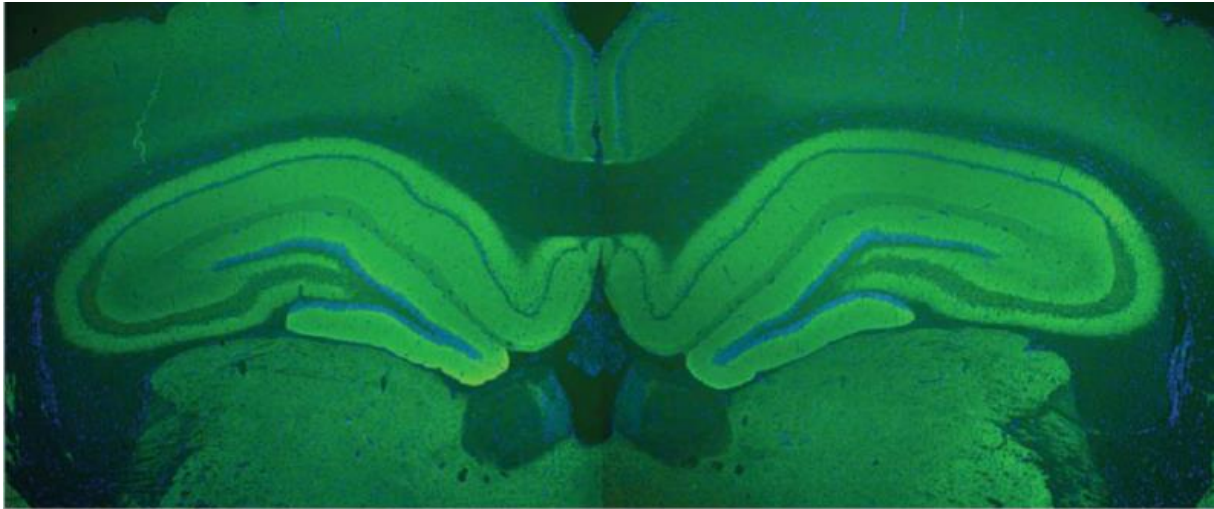


**Figure 3 : Protocole d'immunocytochimie réalisé sur des cellules HEK-293 transfectées afin de tester la présence d'anticorps anti-NMDAR dans le LCR et le sérum d'un patient atteint d'EAI à anticorps anti-NMDAR.**

Le LCR (**A**) et le sérum du patient (**D**) ont été testés à la dilution 1 : 40. L'immunomarquage a été comparé avec un anticorps commercial ciblant la sous unité GluN1 extracellulaire du NMDAR (**B et E**) puis, les deux images ont été superposées nous montrant un marquage parfaitement similaire (**C**). La même expérience a été réalisée à partir du sérum du patient (**D**). Contrairement au LCR (**A**) et à l'immun-sérum commercial (**E**), le sérum du patient ne montre pas d'immunomarquage anti-NMDAR sur ces cellules transfectées (**D**). (Barre d'échelle : 20µm). (D'après l'étude de Dalmau *et al.*, 2011).

Une autre méthode peut également être utilisée. Elle est basée sur la **détection immunohistochimique des anticorps anti-NMDAR sur des coupes d'hippocampe de rat**. En effet, comme l'illustre la **figure 4**, l'hippocampe est une structure particulièrement riche en récepteurs glutamatergiques de type NMDA (**Figure 4**) et c'est cette zone qui reste majoritairement ciblée par les auto-anticorps dans la maladie. Les intensités des immunomarquages au niveau du cortex, du striatum et du cervelet restent, quant à elles, beaucoup plus faible en comparaison et sont donc des structures de moindre pertinence pour ces tests (Dalmau *et al.*, 2008 ; Moscato *et al.*, 2010). Notez que cette forte expression

hippocampique de NMDAR est fortement impliquée dans les phénomènes mnésiques et cognitifs associés à cette structure (De broucke *et al.*, 2011).



**Figure 4 : Immunomarquage anti-NMDAR sur une coupe de cerveau de rat révéle avec des anticorps anti-NMDAR issus du LCR d'un patient atteint de l'encéphalite auto-immune à anticorps anti-NMDAR.**

*Nous observons ici un fort marquage au niveau de l'hippocampe où l'intensité de fluorescence est beaucoup plus forte que dans les autres structures cérébrales visibles sur cette illustration. (D'après Dalmau *et al.*, 2008).*

#### ***1-5-B : Autres anomalies du liquide céphalo-rachidien***

L'analyse du LCR permet d'obtenir d'autres informations complémentaires cruciales en dehors de la seule présence d'anticorps anti-NMDAR. Ces données complémentaires sont autant d'informations nous guidant sur la gravité de la pathologie et sur son évolution. **Le LCR est anormal chez 80 % des patients** (Dalmau *et al.*, 2008 ; Dalmau *et al.*, 2011 ; Gresa-Arribas *et al.*, 2014). Chez l'humain, le volume total de LCR circulant dans le SNC est d'environ 140 millilitres. Il est produit à raison de 0,2 à 0,7 millilitres par minute soit l'équivalent d'une production quotidienne comprise entre 500 à 700 millilitres. Ce haut débit permet, entre autres, un haut taux de renouvellement et donc une épuration des déchets du SNC faisant du LCR un important système de drainage des acides aminés, neurotransmetteurs mais aussi des toxines. La composition du LCR est stable et finement régulée. On rapporte un taux de protéines compris entre 15 et 40 mg/dl, un taux de lactate entre 1 et 3 mmol/l et un taux de

glucose compris entre 50 et 80 mg/dl. Des leucocytes sont aussi présents de manière physiologique et font office de sentinelles immunitaires. Entre 0 et 5 éléments cellulaires par mm<sup>2</sup> chez l'adulte (Hrishi et Sethuraman., 2019). Chez les patients atteints par l'EAI à anticorps anti-NMDAR, une **pléiocytose** peut être détectée (c'est-à-dire, une numération anormale de cellules dans le LCR). Dans le LCR, cette pléiocytose serait due à la présence de lymphocytes B (CD20<sup>+</sup> chez l'homme) ainsi que des plasmocytes (CD138<sup>+</sup>). Elle est, dans ce cas, nommée **pléiocytose lymphocytaire**. Ainsi, les plasmocytes sont responsables de la sécrétion intrathécale d'immunoglobulines au sein du système nerveux central (Martinez-Hernandez *et al.*, 2011 ; Dale *et al.*, 2012) et permettraient donc de générer un certain taux pathologique d'immunoglobulines cérébrales. Cette pléiocytose lymphocytaire est observée chez 90 % des patients (Dalmau *et al.*, 2007 ; Dalmau *et al.*, 2008 ; Dalmau *et al.*, 2011 ; Dale *et al.*, 2012 ; Titulaer *et al.*, 2013 ; Venkatsen *et al.*, 2017).

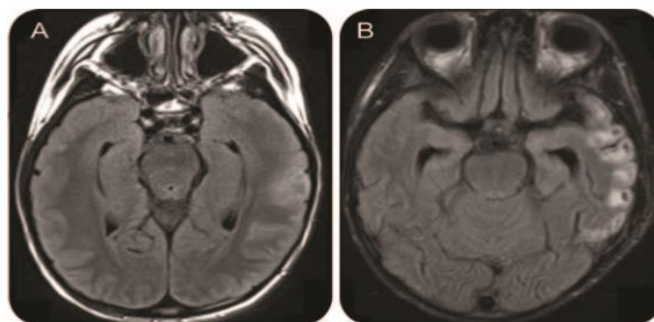
Pour compléter le diagnostic, un profil des **bandes oligoclonales** peut être réalisé. Il s'avère positif chez 60 % des patients (Tüzün *et al.*, 2009 ; Dalmau *et al.*, 2011 ; Kayser et Dalmau., 2016 ; Venkatesan et Adatia., 2017). Ces bandes oligoclonales reflètent la synthèse intrathécale d'IgG et sont typiques pour chaque maladie auto-immune (Lalivie P., 2011). Un autre paramètre important est la concentration en protéine totale autrement nommée **protéinorachie**. C'est un paramètre qui varie également chez 33 % des patients et qui correspond à une augmentation de la concentration en protéines totales dans le LCR (Venkatesan et Adatia., 2017).

### ***I-5-C : Autres examens complémentaires***

Les analyses du sérum et du LCR permettent d'obtenir des informations cruciales mais elles ont parfois besoin de l'appui d'autres techniques pour comprendre l'état d'avancement de la maladie et les possibles atteintes cérébrales. Les techniques actuelles, en particulier, **l'imagerie par résonance magnétique (IRM)**, permettent d'obtenir des informations supplémentaires. Cependant, l'IRM peut s'avérer normale chez 50 à 70 % des patients (Dalmau *et al.*, 2007 ; Dalmau *et al.*, 2008 ; Dalmau *et al.*, 2011 ; De Broucker T., 2011). Pour les patients dont l'IRM met en évidence des anomalies, différentes séquences peuvent être utilisées en



fonction de ce qui est recherché. Ainsi, l'utilisation d'une séquence en **pondération T2** permet de mettre en évidence des **anomalies** au niveau de l'**hippocampe**, du **cortex préfrontal**, des **ganglions de la base**. Ces anomalies sont visibles sous la forme **d'hypersignaux**, c'est-à-dire avec des zones plus claires que le tissu cérébral avoisinant et sain (Dalmau *et al.*, 2007). La périphérie des ventricules doit aussi être analysée. Pour cela, la séquence en pondération T2 n'est pas optimale. En revanche, La séquence en pondération **T2-FLAIR** (FLAIR - *Fluid Attenuated Inversion Recovery*) répond mieux à cette problématique en inversant le signal de l'eau (faisant passer les ventricules de blanc à noir) permettant alors de **mieux révéler les lésions** sous forme **d'hypersignaux péri-ventriculaires**. Ces signaux sont typiquement rencontrés chez certains patients atteints par cette pathologie (Irani *et al.*, 2010 ; De Broueker T., 2011). Dans certains cas, des lésions kystiques peuvent être mise en évidence plusieurs semaines après le début des symptômes. Ces lésions forment des sortes de cavités qui se remplissent de liquide (*figure 5 A et B*) ; elles sont visibles sous forme d'hypersignaux (*Figure 5*). L'étiologie de ces cavités reste encore inexpliquée (Martinez-Hernandez *et al.*, 2011). A l'instar de la séquence T2, la séquence pondérée T2-FLAIR peut aussi mettre en évidence des hypersignaux à distance des ventricules. Ainsi, on retrouve chez certains patients, ces hypersignaux au sein de l'hippocampe (Sansing *et al.*, 2007).



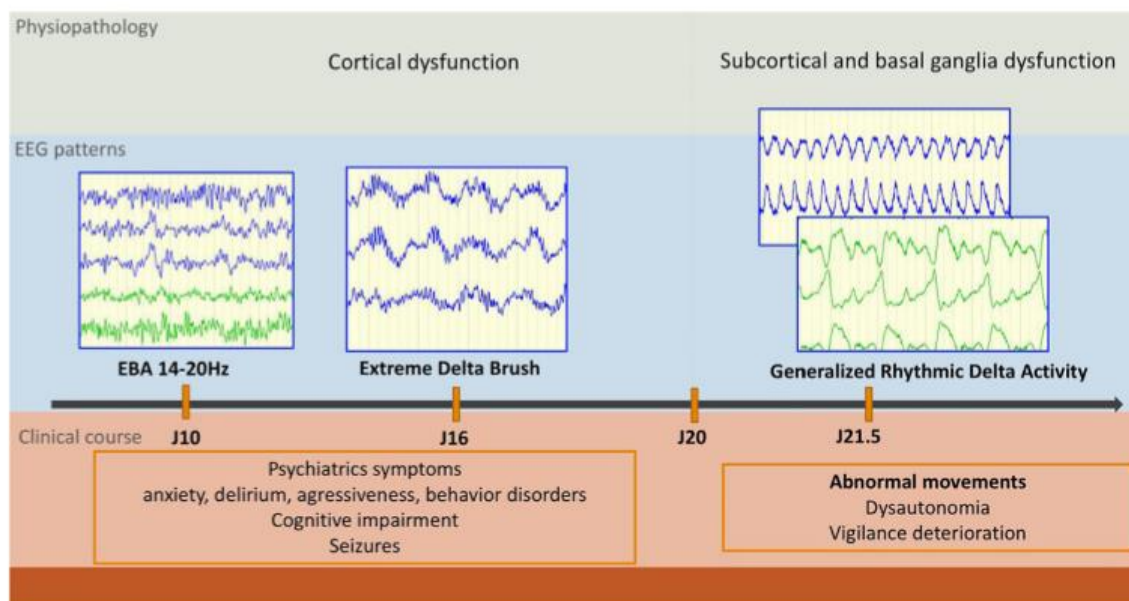
**Figure 5 : IRM cérébrale T2-FLAIR aux semaines 2 et 8 après l'établissement du diagnostic chez un patient.**

*Un hypersignal est visible dans l'hémisphère gauche deux semaines après le diagnostic (A). Cet hypersignal évolue en lésions kystiques importantes (B) 8 semaines après le début des symptômes. (D'après l'étude de Martinez-Hernandez *et al.*, 2011).*

Le diagnostic de l'EAI peut encore être affiné par **l'électroencéphalographie (EEG)**. Ainsi, chez les patients atteints d'EAI à anticorps anti-NMDAR, le tracé de l'électroencéphalographie (EEG) est anormal dans 80 % des cas (Dalmau *et al.*, 2008 ; Gable *et al.*, 2009 ; Dalmau *et al.*, 2011 ; De Broueker T., 2011). Les patients peuvent présenter un **tracé anormal et désorganisé** avec une activité cérébrale ralentie **ou bien** présenter un **EEG normal**. Plus rarement, certains patients présentent des tracés en faveur d'une activité pro-épileptique (Dalmau *et al.*, 2011 ; Graus *et al.*, 2016 ; Geis *et al.*, 2019). En général, au début de la maladie, une **activité Beta extrême** (EBA – *Extreme Beta Activity*) peut être révélée, les pics se situant alors entre 14 et 20 Hertz ou supérieure à 25 Hertz (Jeannin-Mayer *et al.*, 2019). L'évolution de la maladie fait aussi évoluer le tracé EEG. Des ondes nommées « **Extreme Delta Brush** » (EDB – *Extreme Delta Brush*) ont été décrites pour la première fois en 2012 dans l'EAI à anticorps anti-NMDAR. Ces ondes peuvent parfois apparaître sur le tracé EEG (Schmitt *et al.*, 2012). Ces EDB seraient associées à la fois avec les symptômes psychiatriques et neurologiques et elles seraient principalement détectées au début de la maladie (Jeannin-Mayer *et al.*, 2019). On estime que 58 % des patients vont présenter ces EDB qui font maintenant partie du diagnostic de l'EAI à anticorps anti-NMDAR (Graus *et al.*, 2016 ; Jeannin-Mayer *et al.*, 2019). Plus tard dans l'évolution de la maladie, environ 50% des patients vont présenter une **activité généralisée d'onde Delta rythmique ralentie** (GRDA – *Generalized rhythmic Delta Activity*). Ces GRDA sont plus généralement associées à des mouvements involontaires et sont surtout observées durant la phase neurologique (Jeannin-Mayer *et al.*, 2019). Enfin, les patients peuvent présenter toutes ou une partie de ces altérations visibles à



l'EEG. L'étude de Jeannin-Mayer et collaborateurs en 2019, présente et résume ces altérations électroencéphalographiques associées avec l'évolution de la pathologie (**Figure 6**).



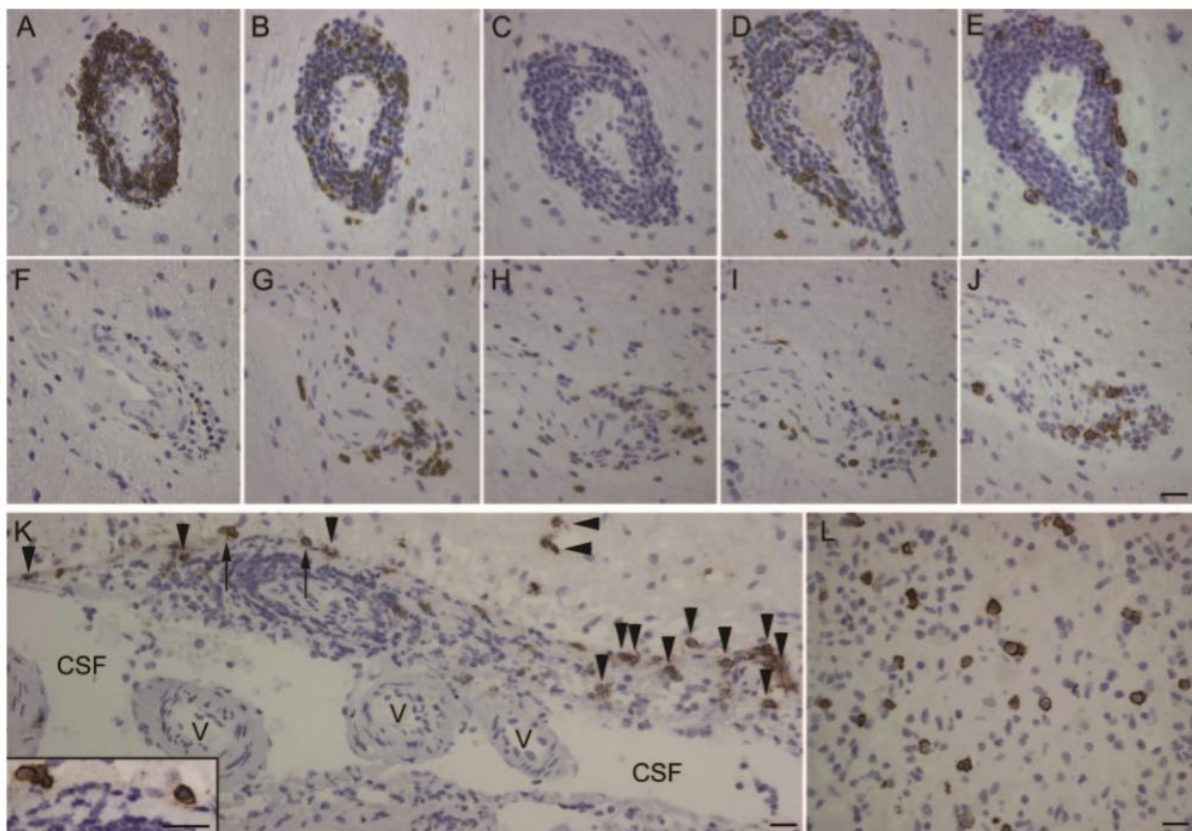
**Figure 6 : Evolution des tracés EEG en fonction du statut clinique lors de l'EAI à anticorps anti-NMDAR au cours du temps.**

Cette figure détaille l'évolution des anomalies qu'il est possible d'observer à l'EEG avec des ondes de typiques : une activité beta excessive entre 14 et 20Hz, carré bleu à gauche avec les ondes bleues et vertes (EBA – Extreme beta activity). Présence d'ondes delta extrêmes, carré bleu du milieu avec les ondes bleues (EDB – Extreme Delta Brush). Présence d'ondes rythmiques généralisées présentant une activité delta (GRDA – Generalized Rhythmic Delta Activity) carré bleu à droite avec les ondes bleues et vertes. Ces 3 profils d'ondes peuvent être corrélés aux symptômes (orange) et aux hypothèses physiopathologiques associées (Gris) chez les patients souffrant d'EAI à anticorps anti-NMDAR et cela en fonction du temps (D'après l'étude de Jeannin-Mayer et al., 2019).

#### **I-5-D : Histologie cérébrale : études post-mortem et biopsies cérébrales**

De rares études histologiques réalisées à partir de tissus post-mortem et de biopsies ont permis d'acquérir les premières données indispensables pour mieux connaître et comprendre les différents acteurs mis en jeu dans la pathologie. A titre d'exemple, les travaux de Martinez-Fernandez et collaborateurs en 2011 ont permis de révéler des infiltrats composés majoritairement de lymphocytes B (CD20<sup>+</sup>) (**figure 7 A et F**) et plus rarement de

lymphocytes T (CD3<sup>+</sup>) (*figure 7 B et G*). D'autres infiltrats composés de **plasmocytes** (CD138<sup>+</sup>) sont retrouvés (*Figure 7 E, J et L*). Ces plasmocytes sont généralement localisés au niveau des **espaces périvasculaires** (*Figure 7 E et J*), des **espaces de Virchow-Robin** (*Figure 7 - K*) ainsi que dans les espaces interstitiels de l'encéphale (*Figure 7 - L*) (Martinez-Hernandez *et al.*, 2011). Un fait intéressant concerne la présence de **plasmocytes** au niveau des **méninges et des vaisseaux méningés** de l'encéphale. La présence de **plasmocytes** au niveau des méninges n'est pas anodine, puisque les immunoglobulines qu'ils sécrètent peuvent directement se retrouver dans le LCR. Ces données histologiques suggèrent l'implication des lymphocytes B et des plasmocytes, acteurs de la voie à médiation humorale dans la physiopathologie de la maladie (Dale *et al.*, 2012).



**Figure 7 : Biopsies cérébrales de deux patients atteints d'EAI à anticorps anti-NMDAR.** Immunomarquages révélant la présence de différents types cellulaires. Concernant le patient n°1 (A-J), les lymphocytes B sont visualisés avec un anticorps anti-CD20 (A et F). Ces photos révèlent la présence de nombreux lymphocytes B dans les régions périvasculaires. Notons également la présence de lymphocytes T caractérisés par un immunomarquage anti-CD3 (B

et G). Ces cellules sont également rencontrées dans les régions périvasculaires. La discrimination des sous populations de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> (C et H) et CD8<sup>+</sup> (D et I) montre une distribution périvasculaire comparable à celle des LTs totaux. (E et J). L'immunomarquage par un anticorps anti CD138 nous montre que les plasmocytes sont nombreux et présents dans les régions périvasculaires telles que les espaces de Virchow-Robin (K. patient 2). Des LBs sont également observés dans les espaces interstitiels (L. patient 2). (Barre d'échelle : 20  $\mu$ m). (D'après l'étude de Martinez-Hernandez et al., 2011).

### **I-6 : Thérapies disponibles ou traitements**

Les traitements mis en place ne seront pas les mêmes selon que l'encéphalite est d'origine paranéoplasique ou infectieuse.

Pour les formes **paranéoplasiques**, **l'exérèse du téréatome** est primordiale et reste le traitement de première intention dans cette forme (Dalmau et al., 2008 ; Leshner et al., 2010 ; Dalmau et al., 2011 ; Titulaer et al., 2013). Cette exérèse va spontanément améliorer les symptômes dans 75 % des cas (Dalmau et al., 2008 ; Dalmau et al., 2011).

Dans le cadre des formes infectieuses, il est préconisé d'utiliser en traitement de première ligne, de fortes doses de **corticostéroïdes** associées à **l'injection intraveineuse, d'immunoglobulines** (IVIg). Les IVIg sont obtenues à partir de plasmas de donneurs sains. A l'origine, les IVIg étaient utilisées dans le traitement de différents déficits immunitaires. L'immuno-modulation induite par les IVIg a pu être démontrée sur la base de travaux scientifiques mais également en clinique depuis une vingtaine d'années. Depuis lors, différentes études ont établi leur efficacité dans d'autres pathologies telle que le purpura idiopathique thrombocytopénique (Imbach et al., 1981). D'autres maladies auto-immunes comme le syndrome de Guillain-Barré, la polyneuropathie chronique démyélinisante ou encore la myasthénie gravis (Stangel M., 2008) sont en partie traitées par les IVIg. Plus récemment, il a été démontré que les IVIg entraînaient un état anergique pour les lymphocytes B, c'est-à-dire un état de non-réponse fonctionnelle à une stimulation antigénique (Séité et al., 2014). Toutes ces données tendent à montrer que les IVIg sont capables de moduler spécifiquement la réponse physiologique des lymphocytes B en diminuant leur caractère pro-

inflammatoire offrant ainsi à ce traitement, une place de choix dans l'arsenal thérapeutique de l'EAI à anticorps anti-NMDAR.

**La plasmaphérèse i.e, l'échange de plasma**, s'avère également être un traitement proposé et efficace (Dalmau *et al.*, 2011 ; Titulaer *et al.*, 2013 ; Venkatesan et Adatia., 2017).

**Un traitement de deuxième ligne** peut être utilisé pour les patients répondant mal au traitement de première ligne (corticostéroïdes et/ou IVIg) ou bien encore chez les patients en rechute que cela soit pour la forme paranéoplasique ou pour la forme infectieuse (Dalmau *et al.*, 2011 ; Venkatesan et Adatia., 2017). Dans ce cas, l'utilisation du **Rituximab (MabThera®)**, un anticorps monoclonal murin humanisé dirigé contre le cluster de différenciation CD20 permet la déplétion des lymphocytes B. A l'origine, il fût développé pour le traitement des lymphomes non-Hodgkiniens et la leucémie lymphoïde chronique. Le **MabThera®** est utilisé dans d'autres pathologies auto-immunes impliquant les lymphocytes B ciblant, ou non, le SNC (Bosly A., 2006 ; Binder *et al.*, 2006). La sclérose en plaques (SEP) en est un bel exemple. L'utilisation du **MabThera®** dans la SEP fut un succès en augmentant les phases de rémission tout en diminuant le développement de nouvelles lésions. Le Rituximab, dans ce traitement de deuxième ligne, peut être utilisé **seul** ou **combiné** au **Cyclophosphamide** (un agent alkylant de la famille des oxazaphosphorines) ; ce dernier est classiquement utilisé comme traitement immunosuppresseur. Il permet d'inhiber la prolifération lymphocytaire et limite le développement de la maladie auto-immune et de ses symptômes (Titulaer *et al.*, 2013 ; Leybold *et al.*, 2015 ; Ahlmann et Hempel., 2016).

## **II : Le récepteur NMDA et son implication dans la physiopathologie de l'encéphalite auto-immune à anticorps anti récepteur NMDA**

### **II.1 Généralité sur les récepteurs glutamatergiques**

Le **récepteur NMDA** fait partie de la grande famille des **récepteurs glutamatergiques**. Au sein de cette grande famille nous pouvons distinguer les récepteurs de type **ionotropiques** et les récepteurs de type **métabotropiques**. Les récepteurs **métabotropiques** comprennent **8 sous types de récepteurs** allant de **mGluR1** à **mGluR8**. Ces récepteurs sont classés dans la

catégorie des récepteurs à action **lente** car leur mode de fonctionnement passe par **l'activation d'une protéine G** et l'initiation de voies de signalisation intracellulaires à action lente (Benarroch., 2008). La deuxième famille de récepteurs est dite *ionotropique* ; elle présente une activation glutamatergique **rapide**. D'un point de vue conformationnel, ce sont des **récepteurs canaux** qui permettent un **passage sélectif** et **rapide** d'ions selon les lois régissant les gradients électrochimiques des ions impliqués (Attwell et Gibb 2005).

Ces récepteurs ionotropiques glutamatergiques comprennent 3 grandes sous-familles :

- les récepteurs de type ***N-méthyl-D-aspartate (NMDAR)***
- les récepteurs de type ***alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-isoxazolepropionate (AMPA)***
- les récepteurs de type ***kainate***

Compte tenu de son rôle majeur dans l'EAI à anticorps anti-NMDAR, les paragraphes suivants concernent une description plus précise du récepteur ionotropique de type NMDA. Pour cela nous allons nous focaliser sur la zone préférentiellement reconnue par les auto-anticorps et l'impact de ces derniers à la fois sur le récepteur NMDA mais aussi sur son adressage synaptique.

## *II-2 : Le NMDAR : structure, localisation et rôle en condition physiologique*

### *II-2-A : Généralité sur le récepteur NMDA*

Physiologiquement, les NMDARs sont des récepteurs ionotropiques transmembranaires activés par le glutamate et la glycine. D'un point de vue historique, la découverte des NMDARs a été rendue possible grâce à la synthèse de son agoniste pharmacologique, le N-méthyl-D-aspartate mais aussi d'antagonistes synthétisés par l'équipe de Jeff Watkins (Watkins., 1981). A la suite de ces études, et *via* le développement de nouveaux ligands, il a été possible de mettre en évidence l'implication des NMDARs à la fois dans la neurotransmission, la plasticité synaptique mais aussi dans les processus de mémorisation, d'apprentissage, d'excitotoxicité, dans l'épilepsie et, plus récemment, dans l'EAI à anticorps anti-NMDAR. Pour étayer ces effets sur la mémorisation ou le comportement, des antagonistes des NMDARs ont été largement utilisés par la communauté scientifique. Nous pouvons, à ce

titre, citer la *phencyclidine*, un antagoniste non compétitif des NMDAR pouvant perturber le développement de l'encéphale et induire des troubles neuropsychiatriques proches de ceux rencontrés dans certaines pathologies comme la schizophrénie (Citri et Malenka., 2008 ; Gunduz-Bruce H., 2009 ; Balu DT., 2016) Du fait de leur large diversité, les NMDAR sont caractérisés par des profils d'expression différents en fonction des différentes sous unités qu'ils peuvent présenter au cours du développement embryonnaire, selon les différentes régions cérébrales ou encore selon le processus neuronal initié (Cull-Candy et al.,2001 ; S. G. Cull-Candy et Leszkiewicz 2004 ; Groc *et al.* 2006).

#### *II-2-B : Localisation des récepteurs NMDA*

Il est courant de penser que les NMDAR sont exclusivement exprimés par les neurones. Néanmoins, ils sont aussi décrits au niveau d'astrocytes et d'oligodendrocytes du cervelet, du corps calleux ou encore du nerf optique (Káradóttir *et al.*, 2005 ; Salter et Fern., 2005 ; Hogan-Cann et Anderson., 2016). Ils sont également retrouvés au niveau des cellules endothéliales des vaisseaux cérébraux (Dzamba *et al.*, 2013 ; Macrez *et al.*, 2016 ; Saab *et al.*, 2016). Concernant leur expression périphérique, ils sont par exemple décrits au niveau du tractus gastro-intestinal ou sur certaines cellules immunitaires (Du *et al.*, 2016).

#### *II-2-C : Structure du récepteur NMDA : constitution en sous unités*

Les NMDAR sont des récepteurs ionotropiques très hétérogènes car ils peuvent être constitués à partir de trois grands types de sous unités (GluN) elles-mêmes subdivisées en différents sous-types (A-D) :

- ***GluN1***
- ***GluN2 A, B, C, et D***
- ***GluN3 A et B***

D'un point de vue structural, les NMDAR sont des hétéromères ***obligatoirement composés de la sous unité GluN1***. La sous-unité GluN1 est **indispensable** à la formation d'un récepteur **stable** sur le plan **conformationnel** et **pharmacologique**, elle est présente chez tous les récepteurs de types NMDA. Cette sous unité GluN1 porte le site de liaison de la glycine et de la D-sérine (Furukawa *et al.*, 2012), le site de fixation au glutamate étant, quant à lui, situé sur



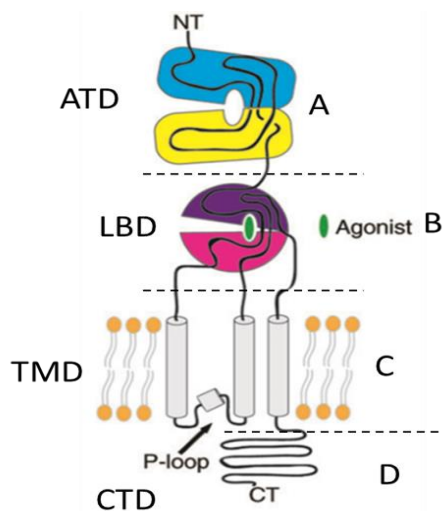
les sous-unités GluN2 et GluN3 (Ulbrich et Isacoff.,2008 ; Traynelis *et al.* 2010 ; Paoletti *et al.*, 2013).

Il existe une grande variété de NMDAR possible en fonction des sous unités exprimées par les cellules. Généralement, les récepteurs fonctionnels sont formés par l'assemblage de deux sous-unités GluN1 et de deux sous-unités GluN2 ou bien d'une association entre la sous-unité GluN2 et la sous-unité GluN3. Ces associations permettent d'obtenir, par exemple, des di-hétérodimères GluN1-GluN2 (2 sous-unités GluN1 et 2 sous-unités GluN2). On rencontre également des NMDAR constitués de deux sous-unités GluN1, d'une sous-unité GluN2 et d'une sous-unité GluN3. Il est également possible de retrouver des récepteurs composés, par exemple, de l'assemblage des sous-unités GluN1-GluN2A-GluN2B entre elles (Paoletti *et al.*, 2013 ; S. F. Traynelis *et al.* 2010 ; Ulbrich et Isacoff 2008). Ces récepteurs sont largement exprimés au niveau du SNC, notamment par des cellules de l'hippocampe et des cellules du cortex cérébral (Rauner et Köhr 2011), l'hippocampe étant, rappelons-le, la zone de fixation préférentielle des anticorps anti-NMDAR car cette structure est riche en NMDAR (Dalmau *et al.*, 2008).

Comme je l'ai mentionné, le NMDAR est composé par l'assemblage de différentes sous-unités entre elles. L'assemblage influence, entre autres, la stabilité (l'ancrage membranaire), la cinétique d'activation et le fonctionnement général du récepteur. Bien que les différentes sous unités diffèrent les unes des autres par leurs acides aminés et les propriétés qu'elles confèrent au récepteur final, il semble qu'elles possèdent toutes un même schéma structurel et qu'elles sont toutes constituées de 4 domaines distincts :

- *Un domaine amino-terminal (ATD)*
- *Un domaine de fixation du ligand (LBD)*
- *Un domaine transmembranaire (TMD)*
- *Un domaine Carboxyl Terminal (CTD)*

L'ensembles de ces domaines est présenté *figure 8*. Je **focaliserais mon propos** sur le **Domaine-Amino-Terminal** de la sous unité GluN1 qui est **ciblé par les auto-anticorps** dans la maladie.



**Figure 8 : Organisation schématique d'une sous-unité du NMDAR.**

Cette sous-unité est composée de différents domaines. Tout d'abord, il y a le domaine amino terminal (ATD) (en bleu et jaune) qui forme une coquille, le domaine de fixation du ligand (LBD) (en violet et rose), le domaine transmembranaire (TMD) et le domaine carboxyl terminal (CTD). (D'après l'étude de Furukawa H (Furukawa H., 2012).

**Le Domaine Amino-Terminal (ATD) (Figure 8.A) :** Cette zone est située au niveau **extracellulaire**. Elle est impliquée dans l'assemblage des différentes sous-unités entre elles et dans la régulation allostérique, **l'activation et l'ouverture du récepteur** (Gielen M., 2010). Elle forme, en structure tridimensionnelle, une **coquille** composée de **deux éléments globulaires** formant une **cavité** permettant notamment la liaison de modulateurs allostériques, comme le zinc (Traynelis *et al.*, 2010). L'ATD permet aussi la fixation d'autres protéines telles que le récepteur à l'éphrine B2 (EphB2R). L'ATD jouant un rôle essentiel dans **l'ancrage** et la **stabilité** du NMDAR au niveau de l'élément post synaptique (Traynelis *et al.*, 2010 ; Le Guen *et al.*, 2015 ; Jezequel *et al.*, 2017). L'ATD joue donc un **rôle primordial** dans la pathologie, du fait de sa **localisation extracellulaire** et étant donné le fait qu'il contient une zone particulière reconnue par les auto-anticorps dans la pathologie.

**Le Ligand Binding Site (LBD) (Figure 8.B) :** Il est composé des segments S1 et S2. C'est sur ce domaine que viennent se fixer le co-agoniste ou le glutamate (GluN2/3) (Traynelis *et al.*, 2010).

**Le domaine Transmembranaire (TMD) (Figure 8.C) :** Ce domaine est constitué de 4 segments transmembranaires allant de M1 à M4. Le TMD intervient dans la sélection de la perméabilité ionique du canal (Paoletti *et al.*, 2013).

**Le Domaine Carboxyl-Terminal (CTD) (Figure 8.D) :** C'est un élément intracellulaire, il joue un rôle primordial dans l'ancrage et le trafic du récepteur (Lau et Zukin., 2007).

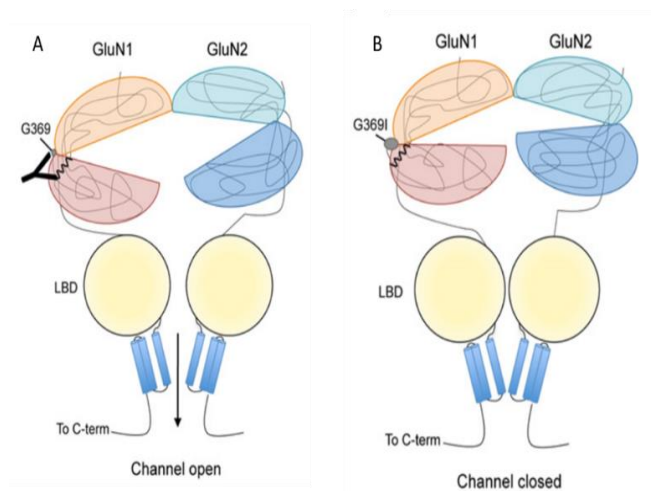
Ces quatre domaines, qui rentrent dans la composition de toutes les sous-unités formant le NMDAR, sont fondamentaux pour la physiologie du NMDAR. Néanmoins, une zone en



particulier, charnière dans la physiopathologie du fait de sa localisation et sa structure est mise en lumière, c'est l'ATD qui contient, sur la sous unité GluN1, une **zone clé, reconnue** par les **auto-anticorps** dans la pathologie.

### *II-2-D : Caractérisation de l'épitope reconnu par les anticorps anti-NMDAR et effets directs sur l'activité du NMDAR*

L'ATD est au centre de plusieurs recherches permettant de comprendre son implication et quelle zone en particulier est ciblée par les auto-anticorps. Afin de mieux caractériser l'épitope présent sur l'ATD de la sous unité GluN1, l'équipe de Gleichman et collaborateurs (Gleichman *et al.*, 2012) a mis en évidence que les **acides aminés asparagine (N) en position 368 et glycine (G) en position 369** participent majoritairement à cette **reconnaissance antigénique** dans la pathologie.



**Figure 9 : Schéma de l'ATD de la sous-unité GluN1 du NMDAR en condition sauvage ou mutée.**

L'ATD du NMDAR est schématisé, il forme deux lobes. Le lobe du haut en orange et celui du bas en rose. Ces deux lobes constituent une coquille et nous remarquons qu'au niveau de la charnière de cette coquille, l'anticorps vient altérer l'ouverture par un phénomène d'encombrement stérique (A). Ce phénomène de reconnaissance

antigénique est aboli quand la glycine (G) en position 369 est mutée en isoleucine (I) (B). (D'après Gleichman et collaborateurs (D'après l'étude de Gleichman *et al.*, 2012).

Il s'avère que ces **deux acides aminés (N et G) sont localisés** près de la **charnière** qui relie les deux lobes de la coquille formant l'ATD (Figure 9.A). Quand l'anticorps se fixe sur cette charnière, cela **altère l'ouverture du canal** (Figure 9.A) via un phénomène **d'encombrement stérique**. Dans ce cas précis, le canal ne peut plus correctement se fermer et son temps d'ouverture est rallongé ce qui influence et modifie les propriétés électrophysiologiques du NMDAR (Gleichman *et al.*, 2012). Ce **phénomène est aboli** quand la **glycine en position 369**

est mutée en isoleucine (G369I) (*Figure 9.B*). La reconnaissance antigénique n'est plus possible et le récepteur ne subit plus ce phénomène d'encombrement stérique et peut alors fonctionner de manière optimale ou physiologique (*Figure 9.B*).

Pour compléter ces travaux de mutagenèse dirigée et comprendre l'implication d'autres zones préférentiellement ciblées par les auto-anticorps, l'équipe de Gleichman et ses collaborateurs a réalisé d'autres délétions pour argumenter l'implication de l'ATD et des autres domaines du récepteur. Ces délétions sont présentées ci-dessous sous la forme de constructions comprenant la sous unité affectée ainsi que la zone délétée (nommée « DEL »).

**Construction GluN1<sup>ATD-DEL</sup>** : Dans cette construction, l'ATD de la sous unité GluN1 est totalement délété. La délétion se fait de l'acide aminé 26 à l'acide aminé 382. Avec cette importante délétion, il n'y a plus de reconnaissance antigène/anticorps quand les cellules sont incubées avec le LCR de patients atteints par la maladie. L'ATD est donc une composante majeure et primordiale dans cette reconnaissance antigénique.

**Construction GluN1<sup>ATD-TM4</sup>** : Dans cette construction, l'ATD est conservé. En revanche, les segments S1 et S2 du LBD sont délétés ainsi que les segments M1, M2, et M3 du TMD. Seul le segment M4 du TMD est conservé et est directement raccordé à l'ATD. Avec cette conformation il y a toujours une reconnaissance antigène/anticorps. Les zones délétées dans cette construction ne participent donc pas à la reconnaissance antigénique dans la maladie.

**Construction GluN1-GluN2<sup>ATD-DEL</sup>** : Dans cette construction, l'ATD de la sous unité GluN2 est entièrement délété et la sous unité GluN1 ne subit aucune variation. Avec cette construction la reconnaissance antigénique n'est pas affectée. L'ATD de la sous unité GluN2 n'intervient donc pas dans la reconnaissance antigène/anticorps.

Retenons de ces expériences de mutagenèse dirigée que la région de l'ATD présente au niveau de la sous unité **GluN1** du NMDAR est **nécessaire** et **suffisante** pour la reconnaissance antigénique (Gleichman *et al.*, 2012). Par la suite, la fixation de l'anticorps sur la zone N368/G369 va impacter le NMDAR à la fois d'un point de vue pharmacologique mais aussi d'un point de vue positionnel au niveau de la synapse.

La **mécanistique précise** dans l'EAI à anticorps anti-NMDAR n'est **pas complètement élucidée** mais les scientifiques s'accordent pour invoquer dans l'EAI à anticorps anti-NMDAR, une **baisse de la densité de ces récepteurs au niveau post-synaptique** et notamment au niveau de **l'hippocampe** car cette structure cérébrale est très riche en NMDAR. Cette baisse de la densité en NMDAR peut conduire en une **hypoactivité glutamatergique** (Lau *et al.*, 2007 ; Paoletti *et al.*, 2013 ; Zhou *et al.*, 2013). Ceci est important à retenir, car une baisse de la densité en récepteurs NMDAR synaptiques à la suite de la fixation des auto-anticorps anti NMDAR est parmi les hypothèses mécanistiques principalement avancées pour expliquer les symptômes observés dans l'encéphalite à anticorps anti-NMDAR. Cette hypothèse est par ailleurs cohérente avec une hypoactivité glutamatergique globale.

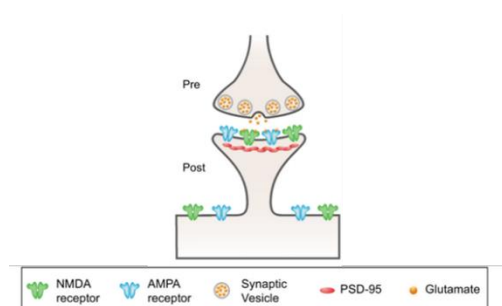
Nous allons, dans le point suivant, exposer les théories actuelles permettant d'expliquer au moins en partie les effets des auto-anticorps anti-NMDAR en insistant sur sa localisation synaptique.

#### *II-2-E : Effets des auto-anticorps anti-NMDAR sur l'adressage au niveau post synaptique du récepteur NMDA*

D'un point de vue physiologie, les NMDAR ne sont **pas statiques** au niveau de la synapse. Une fois adressés à la membrane plasmique, les NMDAR peuvent se distribuer entre les compartiments synaptique et extra synaptique par diffusion latérale (Groc *et al.* 2004 ; 2006). Il est aujourd'hui admis qu'au niveau moléculaire, les auto-anticorps de patients atteints par l'EAI à anticorps anti-NMDAR déplacent latéralement le NMDAR vers la zone extra synaptique, dans laquelle ils sont physiquement **réticulés** puis **internalisés**, conduisant à une régulation négative de la signalisation médiée par le NMDAR et une baisse progressive de leur densité et cela de manière **dépendante du titre en anticorps dans le sérum ou le LCR** (Hughes *et al.*, 2010 ; Mikasova *et al.*, 2012).

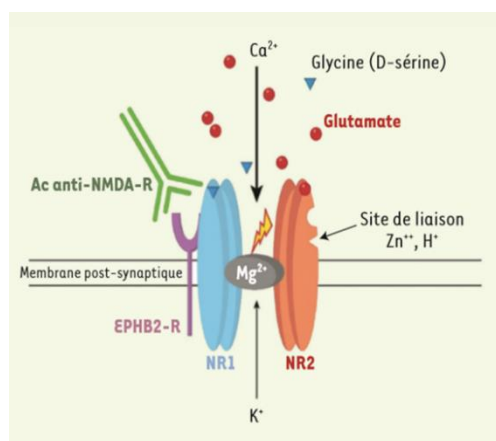
Le **NMDAR** est **ancré** au niveau **post synaptique** (*Figure 10*) grâce à son interaction avec le **EphB2R**, un récepteur à tyrosine kinase. EphB2R s'associe au NMDAR via l'ATD de ce dernier (*Figure 11*) (Dalva *et al.*, 2000). Le EphB2R permet un ancrage post synaptique fort et stable

du NMDAR permettant l'adressage du NMDAR au niveau membranaire et un fonctionnement optimal de la synapse (Le Guen *et al.*, 2015 ; Traynelis *et al.*, 2010).



**Figure 10 : Les récepteurs AMPA et NMDA sont physiologiquement localisés au niveau de l'élément post synaptique. (D'Après Moscato *et al.*, 2012).**

Des études ont montré que les **anticorps** des patients **perturbent l'interaction entre le NMDAR et le récepteur EphB2R**. Cette activation du EphB2R par son ligand (ephrinB2) empêcherait l'internalisation des récepteurs induite par les anticorps et de ce fait, pourrait prévenir les déficits comportementaux et mnésiques observés dans un modèle animal d'EAI à anticorps anti-NMDAR (Planagumà *et al.*, 2016). En outre, l'activation du récepteur EphB2R par son ligand empêche l'altération induite par les anticorps sur le trafic synaptique des NMDAR (Mikasova *et al.*, 2012).

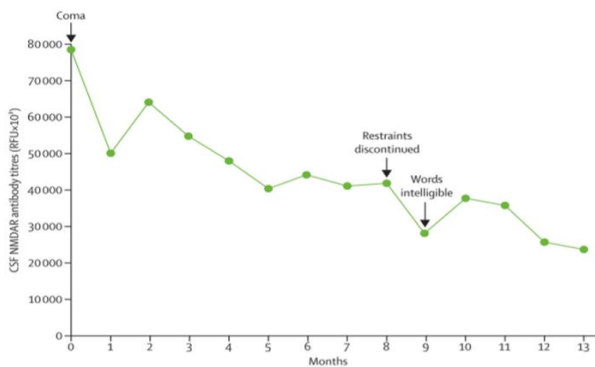


**Figure 11 : Interaction entre le récepteur NMDA et le récepteur éphrin-B2 (EPHB2-R) dans le cadre de l'EAI à anticorps anti-NMDAR.**

Le récepteur NMDA est composé des sous-unités NR1 (renommée GluN1, en bleu) et NR2 (renommée GluN2 en orange). Ces deux sous-unités participent au bon fonctionnement du récepteur. L'anticorps (en vert) se fixe sur la partie extracellulaire de la sous-unité GluN1 du NMDAR. Tant que l'anticorps n'est pas fixé sur le NMDAR, l'interaction entre le NMDAR et EPHB2R (en violet) est optimale permettant un ancrage solide de ces récepteurs au niveau post synaptique. (D'après l'étude de Le Guen *et al.*, 2015).

Une fois l'anticorps fixé sur son site spécifique au niveau de l'ATD, cela va perturber l'adressage du récepteur au niveau synaptique. Ce phénomène est dépendant de la quantité d'anticorps présents à la synapse. En effet, plus le titre en anticorps est important et plus la densité en NMDAR diminue expliquant le tableau clinique évolutif en lien avec une hypoactivité glutamatergique (**Figure 12**) (Dalmau *et al.*, 2008 ; Mikasova *et al.*, 2012 ; Le Guen *et al.*, 2015 ; Dowben *et al.*, 2015 ; Planagumà *et al.*, 2016 ; Venkatesan et Adatia., 2017).

**Figure 12 : Diagramme représentant l'évolution du titre en anticorps anti-NMDAR dans le LCR (CSF) d'un patient atteint d'une forme d'encéphalite de type infectieuse.**



Le test utilisé ici pour obtenir le titre en anticorps anti-NMDAR dans le LCR est un test Elisa. Afin d'obtenir une cinétique de titration, ce test a été réalisé sur une durée de 13 mois. Nous observons que plus le titre en auto-anticorps anti-NMDAR est élevé plus le patient présente un état général grave. Inversement, plus le titre en anticorps baisse et plus l'état général du patient s'améliore.

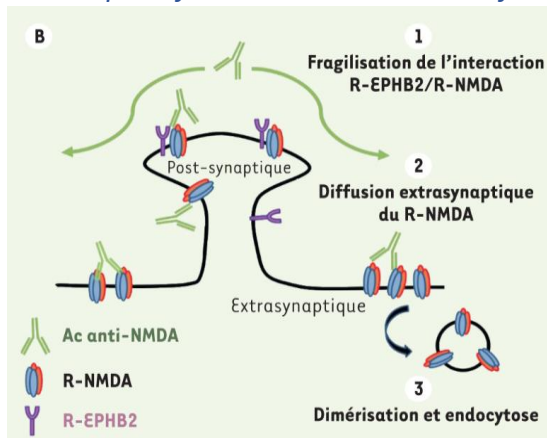
Légende du schéma : RFU : Relative

Fluorescence Units. (D'après l'étude de Dalmau et collaborateurs 2011).

Les immunoglobulines de types G vont se fixer au niveau de l'ATD du NMDAR (Tüzün *et al.*, 2009). Cela va avoir plusieurs conséquences au niveau du récepteur et de son interaction avec le EphB2R. La fixation de l'anticorps sur le NMDAR va, dans un premier temps, perturber l'interaction NMDAR/EphB2R en la fragilisant (**Figure 13-1**). Le NMDAR va alors perdre sa stabilité et migrer en extra-synaptique (**Figure 13-2**). Cette localisation du récepteur est anormale ce qui conduit à l'internalisation du NMDAR par la cellule (**Figure 13-3**) (Mikasova *et al.*, 2012). Ces mécanismes, induits par les auto-anticorps, vont principalement agir au niveau de l'hippocampe (Dalmau *et al.*, 2008 ; Mikasova *et al.*, 2012 ; Planagumà *et al.*, 2016) une structure particulièrement riche en récepteurs de type NMDA.

**Figure 13 : Mécanismes d'action des auto-anticorps anti-NMDAR au niveau synaptique.**

L'anticorps se fixe sur le NMDAR. Cette fixation fragilise l'interaction entre le NMDAR et le



EphB2R (**1**). Cette interaction provoque un glissement en extra-synaptique du NMDAR (**2**) conduisant ainsi à son internalisation par la cellule, puis son élimination, induisant progressivement une baisse de sa densité (**3**) (D'après l'étude de Le Guen *et al.*, 2015).

## *II-2-F : L'hippocampe : une structure préférentiellement touchée dans l'EAI à anticorps anti récepteur NMDA*

Malgré leur large distribution dans l'ensemble du SNC, c'est au sein de de l'hippocampe que l'on rencontre la plus grande densité de NMDAR. De ce fait, c'est une région particulièrement affectée par les auto-anticorps anti-NMDAR (Dalmau *et al.*, 2008). Il nous semble donc important de présenter brièvement cette structure en insistant sur ses nombreuses implications en relation avec les déficits neurologiques et psychiatriques rencontrés dans le cadre de l'EAI à auto-anticorps anti-NMDAR.

L'hippocampe est une structure phylogénétiquement bien conservée chez les mammifères tant du point de vue de son organisation anatomique, de sa constitution cellulaire ou encore de ses nombreuses afférences et efférences avec de nombreuses autres structures cérébrales. L'hippocampe est une structure bilatérale localisée dans le lobe temporal médian de l'encéphale chez l'humain. Chez les rongeurs, l'hippocampe occupe différentes régions dans les plans antéro-postérieurs. Antérieurement, il est situé en position dorsale et médiane et il s'étend latéralement et ventralement dans les régions postérieures. Cette structure a largement été étudié dans le domaine des neurosciences du fait qu'elle soit relativement bien conservée entre les différentes espèces telles que l'homme, le primate non humain ou encore le rongeur. Elle est, entre autres, impliquée dans la navigation spatiale ou les comportements émotionnels (Stella *et al.*, 2012). L'hippocampe ou, selon la nomenclature, la formation hippocampique est une structure complexe très étudiée en fonction de ses nombreuses implications neurophysiologiques. Cette formation hippocampique est classiquement et schématiquement subdivisée en trois parties :

- **Le gyrus denté**
- L'hippocampe proprement dit ou **cornes d'Ammon** composée des **aires CA1, CA2, CA3, CA4**
- **Le subiculum**. Par extension on décrit également **cette région au sein de l'hippocampe car il est en relation directe avec ce dernier.**

L'hippocampe constitue un carrefour complexe associé à de nombreuses fonctions

neurophysiologiques car ses neurones établissent de nombreuses interconnexions et ils sont en relation avec d'autres neurones de diverses structures cérébrales comme l'amygdale, l'hypothalamus, le cervelet ou encore ceux de différentes régions corticales (Andersen *et al.* 2007).

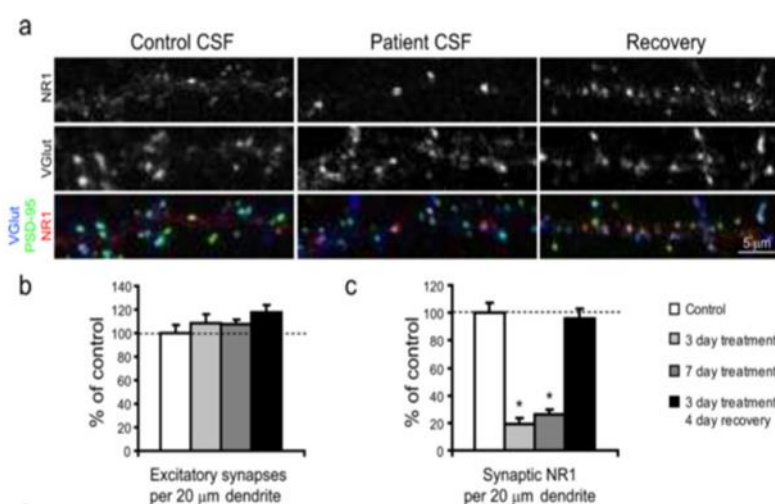
D'un point de vue fonctionnel, en plus de son rôle très bien documenté dans la mémoire, l'hippocampe est impliqué dans de nombreux autres comportements et fonctions, allant de la **cognition sociale**, **l'orientation spatiale** et la **régulation de processus endocriniens** comme la **réponse au stress**. De plus, l'hippocampe a également été impliqué dans la **dépression** et **l'anxiété**. Enfin, la neurogenèse hippocampique a un rôle majeur dans les processus cognitifs (Toda *et al.*, 2018).

Comme les récepteurs de type NMDA sont très largement exprimés au sein de l'hippocampe et qu'ils sont tous constitués de la sous unité GluN1 (ciblée par les auto-anticorps pathogènes anti-NMDAR) il semble normal que l'ensemble des fonctions neurophysiologiques qu'il contrôle puisse être potentiellement affecté par les auto-anticorps anti-NMDAR. Comprendre les effets des auto-anticorps anti-NMDAR est une préoccupation majeure dans l'étude de la pathologie pour tenter d'élucider la manière dont ces anticorps vont agir sur le NMDAR. Ainsi, nous avons préalablement décrit que les anticorps anti-NMDAR avaient des effets directs sur le récepteur en augmentant son temps d'ouverture et en perturbant ses propriétés pharmacologiques. Ces effets pourraient également affecter la densité des récepteurs exprimés à la synapse comme cela a été démontré au niveau hippocampique (**Figure 15**) (Hughes *et al.*, 2010).

Ainsi, en 2010, l'équipe de Hughes et collaborateurs a pu mettre évidence, *via* une technique *in vitro*, comment les anticorps pouvaient agir au niveau des synapses hippocampiques. Pour cela, des cultures de neurones hippocampiques de rat ont été traitées avec du LCR de patients atteints par l'EAI à anticorps anti-NMDAR ou de personnes saines. Les auteurs ont montré que les anticorps anti-NMDAR présents dans le LCR de patients pouvaient se fixer sur les NMDAR et causer une **baisse sélective de la densité en NMDAR au niveau post synaptique** après 3 ou 7 jours de traitement (**Figure 14 A et C**). Cette diminution de la densité en NMDAR n'a pu être



constatée dans le cadre des neurones traités avec le LCR de personnes saines (**Figure 14 A et C**). Cet effet était **réversible** dans la condition « recovery ». Après traitement, le milieu de culture des neurones était débarrassé durant 4 jours des anticorps anti-NMDAR, la densité des NMDAR revenait alors à un niveau comparable de celle des cultures contrôles (**Figure 14 A et C**). Nous pouvons souligner que les effets du traitement étaient spécifiquement associés aux NMDAR car ils n'affectaient pas d'autres protéines synaptiques comme la protéine pré-synaptique VGlut (**Figure 14 A en bleu**) ou encore la protéine post synaptique PSD95 (PSD – Post Synaptic Density Protein) (**Figure 14 A en vert**).



**Figure 14 : Les anticorps de patients atteints par l'encéphalite auto-immune à anticorps anti-NMDAR réduisent le nombre de récepteurs NMDA au niveau synaptique sans altérer le nombre de synapses.**

(a) Immunocytochimie de neurones hippocampiques de rat marqués avec la sous

unité *GluN1* du NMDAR (NR1, rouge), un marqueur post synaptique qui est la protéine PSD95 (vert) ainsi qu'un marqueur pré synaptique qui est la protéine VGlut (bleu). Ces neurones ont été traités avec du LCR de personnes saines ou bien de patients atteints de la maladie (barre de calibration : 10μm). (b) nous observons que le LCR de patients atteints par la maladie ne vient pas diminuer le nombre de synapses excitatrices. (c) En revanche, le nombre de cluster de *GluN1* (NR1) est, quant à lui, diminué de manière significative avec le LCR de patients incubé pendant 3 et 7 jours par rapport au groupe contrôle (blanc) ou au groupe « recovery ». (D'après Hughes et al., 2010).

Ces expériences nous montrent que les anticorps anti-NMDAR se **fixent de manière spécifique** sur l'ATD de la sous unité **GluN1** du NMDAR. Cette fixation engendre une **baisse de la densité** des récepteurs au niveau **post synaptique sans affecter le nombre de synapses** et ces effets restent **réversibles**.



### *III : Les modèles murins d'encéphalite auto-immune à anticorps anti récepteur NMDA*

La découverte récente de cette pathologie fait qu'il existe à l'heure actuelle peu de modèle d'étude pré-clinique chez animal. Les modèles existants s'articulent souvent autour des effets des auto-anticorps humains en **infusion**, en **injection intra cérébro-ventriculaire** (Planagumà *et al.*, 2015 ; Wright *et al.*, 2015) ou en **injection intraveineuse** (Malviviya *et al.*, 2017). Plus récemment, des techniques basées sur **l'immunisation active** ont été ajoutées à l'étude de ces modèles. D'abord avec un modèle consistant à immuniser des souris contre quatre peptides différents dont les séquences sont basées sur la partie extra-cellulaire du NMDAR (GluN1) (Pan *et al.*, 2017), ou via un modèle immunisant des souris avec la construction GluN1-GluN2B-NMDAR intégrée dans des liposomes (Jones *et al.*, 2019) ou encore avec la conception d'un peptide immunogène (Ding *et al.*, 2021). Ces modèles, qu'ils soient basés sur une infusion d'anticorps humains ou bien basés sur une immunisation active, permettent d'étudier les effets des anticorps pathogènes, de mieux comprendre la mise en place des déficits comportementaux, leur sévérité ainsi que leur cinétique et de corrélérer ces modifications avec la coopération du système immunitaire pour mieux comprendre son impact, notamment en termes d'inflammation et d'infiltration au sein du SNC. Nous allons, dans la suite de ce travail, exposer les principaux modèles murins disponibles.

#### *III-1 : Le modèle d'infusion intra cérébroventriculaire*

L'intérêt de ce modèle proposé dans l'étude de Planagumà et collaborateurs en 2015 est, dans un premier temps, d'étudier la pathogénicité des anticorps anti-NMDAR humains sur le comportement et la mémoire chez la souris. Pour cela, une infusion intra cérébro-ventriculaire d'IgG issues du LCR de patients atteints d'EAI à anticorps anti-NMDAR est réalisée. L'infusion se fait grâce à l'implantation de deux cathéters au sein des ventricules latéraux de la souris. Ces cathéters sont reliés à une pompe osmotique permettant d'infuser le LCR à raison de 0.25µl par heure pendant 14 jours. Les tests comportementaux sont pratiqués pendant l'infusion et après l'arrêt de l'infusion selon un protocole bien défini (*figure*

15). Ces tests comportementaux ont pour but de rechercher des déficits comparables à ceux rencontrés dans la pathologie humaine et seront présentés ci-après.

Dans un deuxième temps, après la mise à mort des animaux, des analyses histologiques sont réalisées. Ces analyses consistent à étudier l'effet de la durée de l'infusion sur la répartition et la fixation des IgG humaines au sein du cerveau des souris.

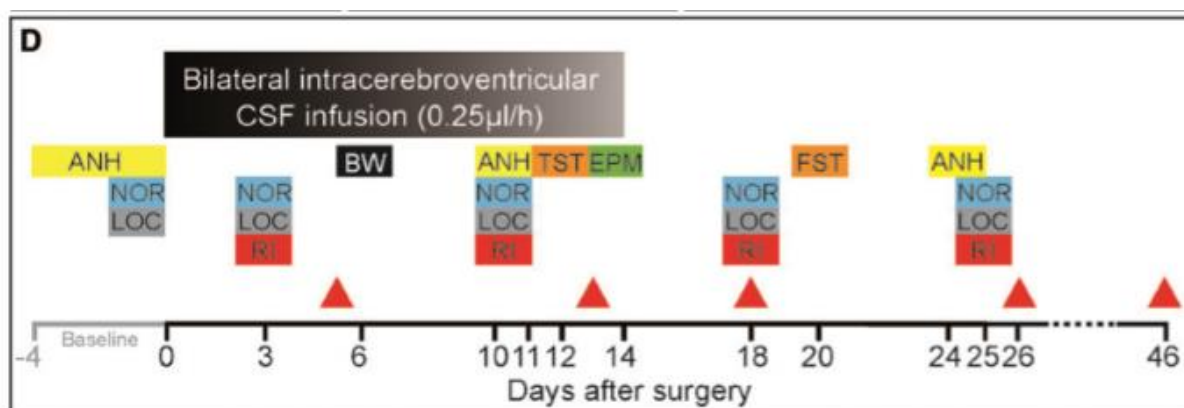


Figure 15 : Présentation schématique du protocole utilisé dans le modèle de Planagumà et collaborateurs.

Avant le jour 0, du jour - 4 au jour - 1, les animaux sont habitués aux différents tests utilisés. L'habituation concerne le test de reconnaissance de nouvel objet (NOR), le test d'anhédonie (ANH) et d'activité locomotrice (LOC). Cette phase permet d'obtenir des données basales avant tout traitement ou chirurgie. Au jour 0, la chirurgie pour placer la pompe osmotique est réalisée et l'infusion de LCR commence. L'infusion sera effective du jour 0 au jour 14. Différents tests comportementaux vont ensuite être effectués. A différents jours après le début de l'infusion, les animaux subissent les tests initiaux (NOR, ANH et LOC) et de nouveaux tests comme la suspension par la queue (TST), le test de nage forcée (FST), le test blanc et noir (BW) ainsi que celui du labyrinthe surélevé (EPM). De plus, les auteurs ont également utilisé un test d'agressivité basé sur l'introduction d'un nouvel individu dans la cage (RI). Les triangles rouges représentent le jour de mise à mort des différents groupes de souris. (D'après l'étude de Planagumà et collaborateurs., 2015).

### III-1-A : Présentation des tests comportementaux réalisés dans le modèle d'infusion intra cérébroventriculaire

Nous allons ici présenter le(s) déficit(s) comportementaux et/ou cognitif(s) révélés par les différents tests utilisés dans cette étude et expliquer brièvement les tests associés. Ces tests

ont tous pour objectif de mettre en évidence de manière qualitative et quantitative différents déficits cognitifs, mnésiques ou moteurs chez le rongeur.

**Mémorisation à long terme :** Les déficits mnésiques sont étudiés avec le test de reconnaissance de nouvel objet (**NOR-figure 15**). Le NOR est réalisé dans un dispositif champ ouvert ou *open field* ou dans un labyrinthe en V (*V-maze*).

**Comportement de type anhédonique :** L'anhédonie est définie comme la perte de la capacité à ressentir du plaisir (Gaillard *et al.*, 2013). Les déficits associés à l'anhédonie sont estimés avec le test de préférence au sucrose (**ANH-figure 15**). Les animaux sont isolés pendant plusieurs heures et disposent dans leur cage de deux bouteilles : une contenant de l'eau plate et l'autre contenant de l'eau sucrée. Ce test est basé sur l'appétence qu'a le rongeur envers le goût sucré. Un animal présentant un déficit de type anhédonique va moins consommer d'eau sucrée.

**Comportement de type dépressif :** avec les tests de nage forcée et de suspension par la queue (**FST et TST figure 15**). Un animal dépressif se débattrait moins pour échapper à la situation qu'un animal non dépressif et restera plus longtemps immobilisé.

**Comportement de type anxieux :** avec le test du labyrinthe en croix surélevé et le test « black and white » (**BW-Figure 15**). Le labyrinthe en croix surélevée est un dispositif constitué de deux bras ouverts (dits anxiogènes) et de deux bras fermés (dits anxiolytiques). L'animal va être partagé entre son désir d'explorer et sa peur du vide. Le test crée un conflit approche-évitement entre l'envie naturelle d'explorer du rongeur et sa peur des espaces ouverts (qui le protège des prédateurs). Un animal anxieux va avoir tendance à se réfugier dans les bras fermés plus rassurants pour lui. En mesurant le temps passé dans les différents bras, il est possible de définir un profil anxieux ou non par rapport aux animaux contrôles.

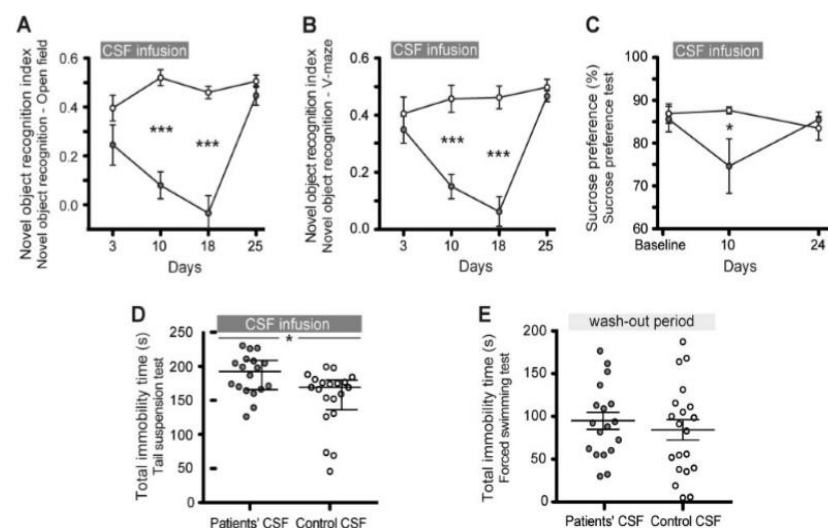
**Comportement de type agressif :** avec le test d'introduction d'un nouvel individu dans la cage (**RI figure 15**). Est-ce que ce nouvel individu, va oui ou non, induire un comportement agressif chez la souris, de quelle nature et de quelle intensité.

**Le contrôle de l'activité motrice :** avec le test d'actimétrie permettant de contrôler l'activité verticale et horizontale (**LOC figure 15**).

Plusieurs conclusions peuvent être dégagées de ces études comportementales :

Les auteurs montrent que les souris infusées avec des LCR de patients atteints d'EAI à anticorps anti-NMDAR développent un spectre de symptômes comprenant des déficits mnésiques, anhédoniques et de type dépressif (**Figure 16 A.B.C.D**). Ces déficits comportementaux sont absents chez les animaux infusés avec le LCR de sujets contrôles (Planagumà *et al.*, 2015) (**Figure 16 A.B.C.D**). Les troubles se mettent en place de manière progressive après le début de l'infusion entre le 3<sup>ème</sup> et le 10<sup>ème</sup> jour. Ils perdurent après l'arrêt de l'infusion (jour 14) atteignant un pic au jour 18 soit 4 jours après l'arrêt de l'infusion.

Pour les déficits mnésiques, nous observons une différence significative au jour 10 après l'infusion et le déficit maximal est observé au jour 18 que ce soit dans le cadre du NOR en openfield ou avec le test du labyrinthe en V (**Figure 16.A.B**). L'anhédonie a été testée avec le test de préférence au sucrose (**Figure 16.C**). Pour ce test, les souris infusées avec le LCR de patients développent progressivement un déficit de type anhédonique (les souris consomment moins d'eau sucrée) qui est significatif au jour 10, puis qui s'estompe progressivement avec l'arrêt de l'infusion de LCR (**Figure 16.C**). Concernant les tests de dépression, seul le test de suspension par la queue met en évidence un déficit de type dépressif chez les souris infusées avec le LCR de patients (**Figure 16.D**). Le test de nage forcée, quant à lui, n'a pas permis de révéler un déficit de type dépressif post infusion (*Wash-out period*) (**Figure 16.E**) (Planagumà *et al.*, 2015).

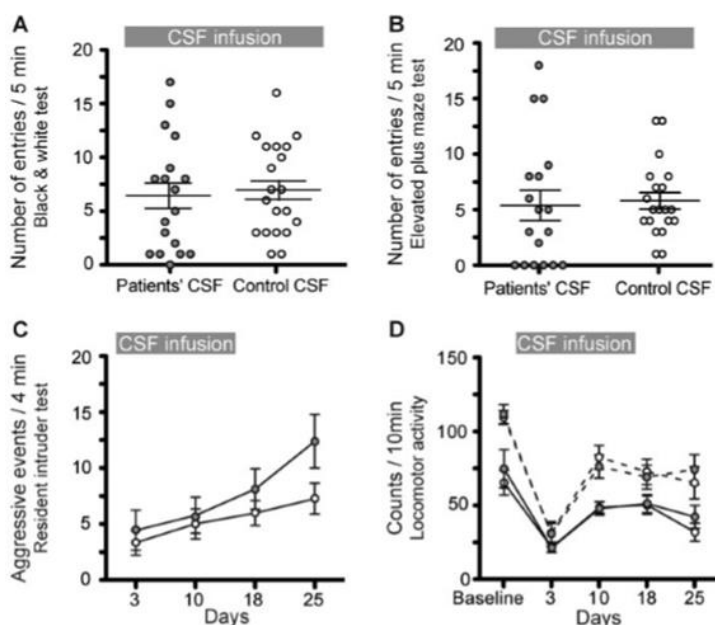


**Figure 16 : Déficiets mnésique, anhédonique et de type dépressif induits par l'infusion de LCR de patients atteints d'encéphalite à anticorps anti-NMDAR.**

Le test de reconnaissance de nouvel objet dans un champ ouvert (A) et le labyrinthe en V permettent de mettre en évidence des déficits mnésiques chez la

souris avec un maximum de déficits au jour 18 **(B)** Le test de préférence au sucrose permet de mettre en évidence un déficit de type anhédonique chez les animaux infusés avec le LCR de patients au jour 10 **(C)**. Enfin, en période d'infusion du LCR de patients, les animaux développent un comportement de type dépressif mis en évidence avec le test de suspension par la queue **(D)**. Le test de nage forcée n'a pas révélé de déficits dépressifs post infusion (Wash-out period) **(E)**. (D'après l'étude de Planagumà et al., 2015).

Enfin, aucun déficit n'a été rapporté concernant les tests d'anxiété **(Figure 17.A.B)**, d'agressivité **(Figure 17.C)** ou de locomotion **(Figure 17.D)** (Planagumà et al., 2015).



**Figure 17 : L'infusion de LCR issus de patients atteints d'EAI anti-NMDAR n'induit pas chez la souris de modifications significatives lors de tests permettant d'évaluer l'anxiété, l'agressivité ou la locomotion.**

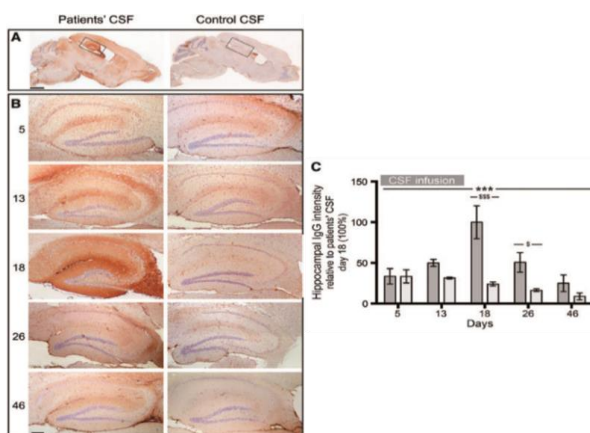
**(A)** Le test « Black and white » permettant de mettre en évidence un déficit de type anxieux. **(B)** le labyrinthe en croix surélevée permet de mettre en évidence des déficits de type anxieux. **(C)** Le test d'introduction d'un nouvel individu est un test qui permet de quantifier l'agressivité chez le rongeur. **(D)**

Enfin l'activité locomotrice globale comprenant l'activité verticale (redressements) et l'activité horizontale (vas et viens). (D'après l'étude de Planagumà et al., 2015).

### III-1-B Etudes immunohistologiques dans le modèle d'infusion intra cérébroventriculaire

Les cerveaux des animaux euthanasiés ont été prélevés à différents temps durant le protocole **(figure 15, triangles rouges)**. Les études histologiques permettent d'étudier la dissémination spatiale et temporelle des anticorps au sein de l'encéphale des animaux infusés. Les auteurs ont mis en évidence une fixation progressive des anticorps issus du LCR de patients au niveau de l'encéphale des souris. Cette fixation est corrélée au temps d'infusion. Plus l'infusion dure dans le temps et plus la quantité d'anticorps fixée est importante. La fixation

des anticorps est maximale au jour 18, soit 4 jours après l'arrêt de l'infusion (**Figure 18.B.C au jour 18**). Notons que c'est au jour 18 que les animaux présentaient les déficits mnésiques les plus importants. Les auteurs ont donc pu corréler la quantité d'anticorps fixés au sein du parenchyme cérébral avec la sévérité et la mise en place des déficits comportementaux, à l'instar de ce qui a été décrit dans la pathologie humaine. En effet, plus le titre en anticorps était important dans le LCR des patients plus leurs symptômes étaient sévères (Dalmau et al., 2011).



**Figure 18 : Visualisation (A et B) et quantification (C) de la fixation des anticorps humains dans le cerveau des souris infusées.**

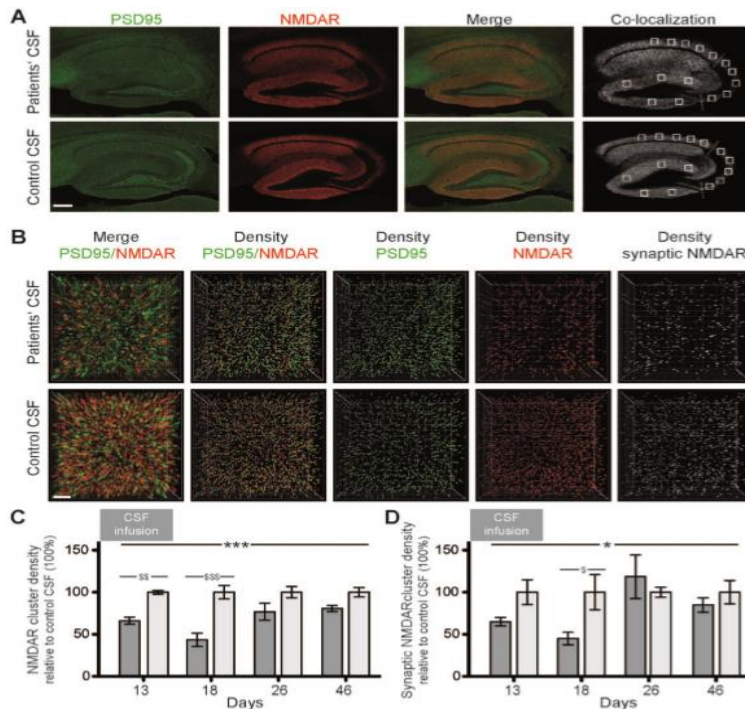
*Immunomarquages avec les anticorps anti-anticorps humains sur des coupes sagittales de cerveaux de souris (A) et, à plus fort grossissements, au niveau de l'hippocampe (B) pour le groupe infusé avec le LCR des patients et des individus sains en fonction du temps. Quantification de l'intensité des anticorps humains fixés pour les deux groupes expérimentaux en fonction des jours. (C) (barres d'échelles : A : 2mm ; B : 200µm) (D'après l'étude de Planagumà et collaborateurs).*

Un autre point important de cette étude concerne la localisation, la distribution des IgG humaines fixées sur les coupes de tissu. En effet, c'est au sein de l'hippocampe que la quantité d'IgG fixées était la plus importante. Ce résultat confirme des observations préalables (Dalmau et al., 2008 ; Hughes et al., 2010) et renforce l'idée que l'hippocampe est une structure présentant une grande vulnérabilité dans la pathologie (**Figure 18 A.B.C**). Ensuite, à partir du jour 26, la quantité d'anticorps fixée baisse progressivement (**Figure 18 A.B.C**) (Planagumà et al., 2015).

Un autre fait intéressant révélé par cette étude histologique concerne la baisse de la densité de NMDAR au niveau du cerveau des souris infusées avec le LCR de patients (**Figure 19**). La densité de NMDAR hippocampiques est diminuée chez les souris infusées avec le LCR de patients sans que cela n'ait d'effet sur la densité de PSD95 (PSD95 – Post Synaptic density



Proteine – 95) (Figure 19.A et B). La quantification des immunomarquages (Figure 19.C.D) nous indique que la quantité totale de cluster de NMDAR (Figure 19.C) et celle en cluster NMDAR au niveau post synaptique (i.e colocalisation avec la PSD95) (Figure 19. D) sont diminuées chez les animaux infusés avec le LCR de patients atteints par la maladie.

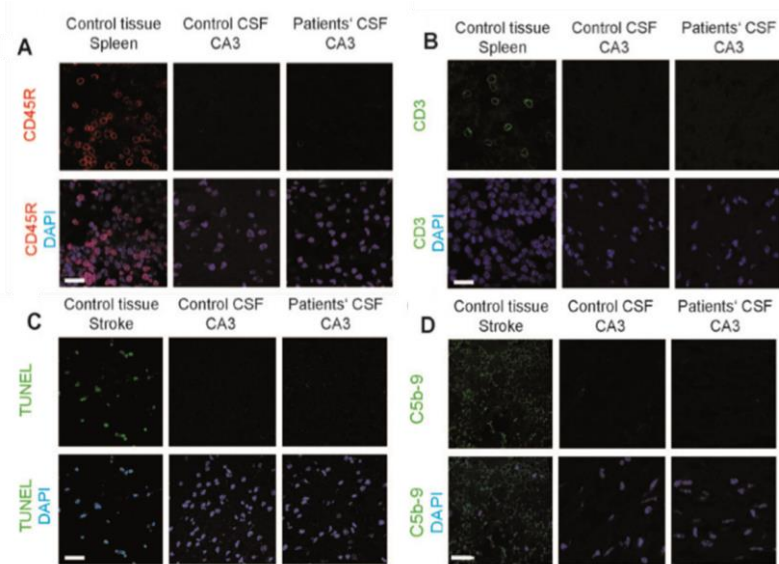


**Figure 19 :** Réduction spécifique de la densité de NMDAR totale et post synaptique au niveau de l'hippocampe des souris dans le protocole d'infusion intra cérébroventriculaire.

La densité des NMDAR au niveau de l'hippocampe des souris infusées avec le LCR de patients est diminuée par rapport aux souris contrôles sans altérer la densité en PSD95 (A). Une reconstruction en trois dimensions a été réalisée pour quantifier les caractéristiques vues en A

(B), ainsi que les quantifications correspondantes à la quantité totale de cluster de NMDAR (C) et les clusters synaptiques en NMDAR (D). (D'après l'étude de Planagumà et al., 2015).

Les auteurs ont également analysé l'infiltration leucocytaire, les dépôts de complément et la mort neuronale dans leur modèle et dans d'autres modèles expérimentaux. Contrairement à ce qu'ils ont pu observer sur des cerveaux d'animaux ischémiés (condition « Stroke ») (Figure 20.A.B.C.D), les auteurs ne rapportent pas d'infiltration de cellules immunitaires au niveau de l'encéphale des souris infusées. Plus particulièrement, ils n'ont pas observé d'infiltration de leucocytes (CD45R) (Figure 20.A), de lymphocytes T (CD3) (Figure 20.B), ni de dépôt du complément (Figure 20.D). De plus, aucune perte neuronale (Figure 20.C) n'a été mise en évidence au sein de l'hippocampe des animaux infusés avec le LCR de patients ou d'individus sains.



**Figure 20** : **Absence d'infiltration immunitaire et de mort de type apoptotique dans le modèle d'infusion intra cérébroventriculaire développé par Planagumà et collaborateurs.**

*Aucune infiltration de leucocytes (CD45R) (A), de lymphocytes T (CD3) (B) n'est révélée dans la région CA3 de l'hippocampe des souris infusées. De plus, l'infusion n'induit pas d'apoptose neuronale (C) ou de dépôt du complément (D) dans ce modèle. (D'après l'étude de Planagumà et collaborateurs).*

*(D'après l'étude de Planagumà et collaborateurs).*

En conclusion, ce modèle d'infusion intra cérébroventriculaire est intéressant car il met en évidence *in vivo* la **pathogénicité des anticorps anti-NMDAR humains chez la souris**. Il permet aussi de montrer que les souris infusées avec les anticorps-anti-NMDAR développent un **spectre de déficits comportementaux proches de ceux observés chez l'homme**. Enfin, il montre que les **anticorps humains se fixent bien sur les NMDAR murins**, surtout au niveau **hippocampique**, et que cette fixation est liée à une **diminution de la densité des NMDAR au niveau post-synaptique**. Cependant, cette étude ne tient **pas** compte de **l'implication du système immunitaire** en amont de la production d'anticorps qui est primordiale dans cette pathologie auto-immune et notamment de l'infiltration immunitaire décrite chez l'humain.

### *III-2 : Modèles murins d'EA à anticorps anti-NMDAR basés sur une immunisation active*

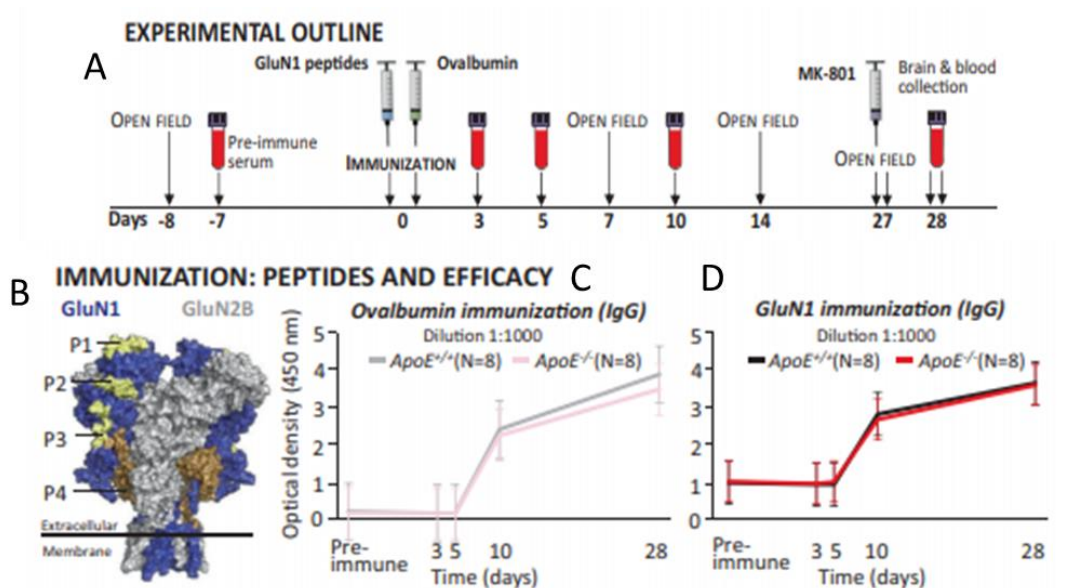
Dans ce groupe, il existe différents grands modèles, celui de l'équipe de Hannelore Ehrenreich mis en place en 2017 (Pan *et al.*, 2017), le modèle mis en place par Jones et



collaborateurs en 2019 (Jones *et al.*, 2019), enfin, le modèle de Ding et collaborateurs mis en place en 2021 (Ding *et al.*, 2021).

### *III-2-A : Modèle de Pan et collaborateurs en 2017*

Le modèle de l'équipe de H. Ehrenreich (Pan *et al.*, 2017) utilise une **immunisation active** basée sur l'injection concomitante de **quatre peptides** dont les **séquences** sont situées sur la partie **extracellulaire de la sous unité GluN1 du NMDAR**. D'un point de vue méthodologique, Pan et collaborateurs utilisent pour cette étude deux souches de souris : **ApoE<sup>-/-</sup> et ApoE<sup>+/+</sup>**. Les souris de souche **ApoE<sup>-/-</sup>** ont la particularité de présenter **une barrière hémato-encéphalique (BHE) perméable**, et leur utilisation permet de mieux comprendre l'implication de cette structure clé dans la mise en place des déficits comportementaux post immunisation. Le design de leur étude comprend deux groupes distincts. Un premier groupe composé des souches ApoE<sup>-/-</sup> et ApoE<sup>+/+</sup> immunisées avec quatre peptides sélectionnés tout le long de la sous unité GluN1 (peptides P1 à P4) (**Figure 21 – B**). Ces quatre peptides sont introduits dans un cocktail inflammatoire composé d'ovalbumine de poulet, d'adjuvant complet et incomplet de Freund permettant la stimulation du système immunitaire et la prise en charge des peptides par le système immunitaire induisant une réaction immunitaire ciblant les peptides. Pour obtenir une étude complète, un groupe de souris contrôle, également composé des souches ApoE<sup>-/-</sup> et ApoE<sup>+/+</sup>, est proposé. Les souris de ce groupe contrôle sont, quant à elles, seulement immunisées avec de l'ovalbumine en complément des adjuvants complet et incomplet de Freund mais sans ajout des quatre peptides (**Figure 21–A**).



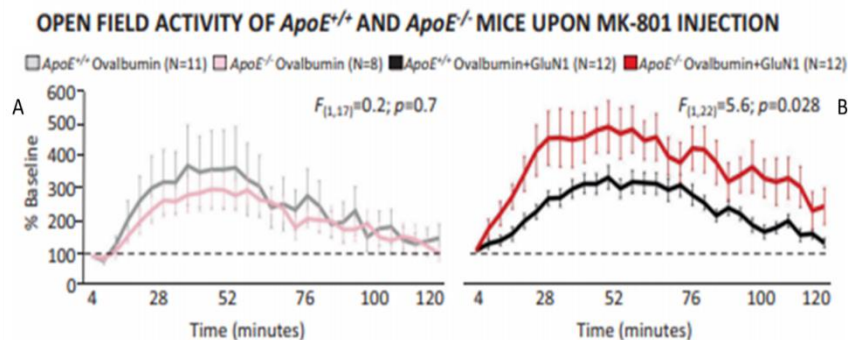
**Figure 21 : Image extraite de l'étude de Pan et collaborateurs illustrant le protocole utilisé lors de la mise en place du modèle murin d'EAI à anticorps anti NMDAR.**

La figure A illustre le protocole expérimental utilisé dans le modèle de Pan et collaborateurs et montre les jours d'immunisation, les différents groupes de souris et la répartition des tests comportementaux. La figure B est une représentation en cristallographie d'une partie du NMDAR montrant les quatre peptides utilisés pour l'immunisation. Les peptides sont nommés de P1 à P4 et leur localisation est indiquée sur le schéma. Les figures C-D représente le suivi de l'immunisation pour les groupes ovalbumine contrôle et le groupe des quatre peptides NMDAR-GluN1, pour les deux souches de souris ApoE<sup>-/-</sup> et ApoE<sup>+/+</sup> (D'après l'étude de Pan et al., 2017).

Une fois l'immunisation réalisée, les anticorps circulants (IgGs) anti-ovalbumine (Figure 21 – C) ou anti-NMDAR-GluN1 (Figure 21 – D) sont détectés entre le jour 5 et le jour 10 post immunisation, de manière équivalente, sans différence significative, entre les deux groupes expérimentaux ainsi qu'entre les deux souches murines (ApoE<sup>-/-</sup> et ApoE<sup>+/+</sup>) (Figure 21 – C-D).

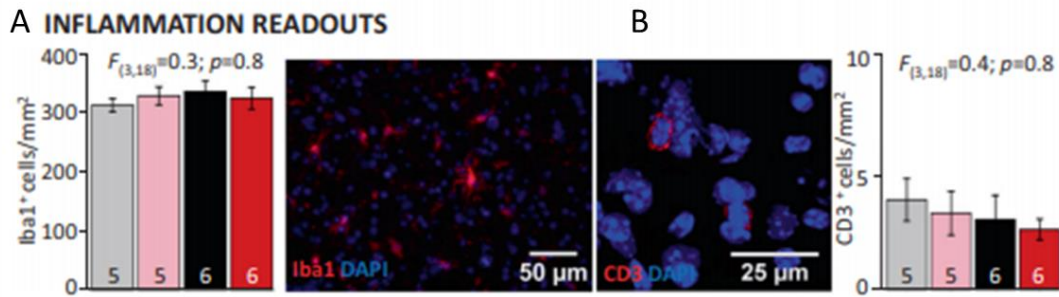
La suite de cette étude se propose de mettre en évidence l'impact de l'immunisation sur la mise en place de déficit comportementaux. Pour ce faire, les souris sont évaluées dans un test de type « champs ouvert » (Champs ouvert - *Open field*) aux jours 0, 7, 14 et 27 suivants l'immunisation (Figure 21-A). L'épreuve de champs ouvert permet de mettre évidence chez les rongeurs, et dans ce cadre, une hyperactivité motrice post immunisation. L'épreuve de champs ouvert du jour 27 est particulière puisqu'elle est précédée d'une injection de MK801 (Figure 21 - A ; Figure 22 A-B). Pour rappel, le MK801 est un antagoniste non compétitif du NMDAR. L'ajout de MK801 au jour 27 post immunisation n'apporte aucune différence au niveau de l'épreuve de champs ouvert pour le groupe de souris immunisées seulement avec l'ovalbumine

et cela de manière équivalente pour les deux souches de souris (**Figure 22 – A**). En revanche, il existe une différence dans le groupe de souris ApoE<sup>-/-</sup> après utilisation de MK801 (**Figure 22 – B**). De ce fait, une immunisation contre l’ovalbumine pour les deux souches de souris ou bien avec les quatre peptides GluN1 pour la souche Apo<sup>+/+</sup> n’induit aucune différence de comportement, même en présence de MK801. La condition pour laquelle la mise en place d’une hyperactivité est observable post immunisation et post injection de MK801 est retrouvée pour la souche de souris ApoE<sup>-/-</sup> et nécessite donc en plus une BHE altérée (**Figure 22 – B**).



**Figure 22 : Test du champs ouvert (open field) pratiqué chez les souris ApoE<sup>-/-</sup> et ApoE<sup>+/+</sup> 27 jours post-immunisation avec de l’ovalbumine seule ou bien avec les quatre peptides GluN1-NMDAR. (D’après l’étude de Pan et al., 2017).**

Pour poursuivre leur investigation, Pan et collaborateurs se sont intéressés à l’infiltration de cellules immunitaires au sein de l’hippocampe. Ils ont pour cela réalisé des IHC pour mettre en évidence les cellules Iba1<sup>+</sup> (**Figure 23-A**), cellules microgliales impliquées dans l’inflammation. Également, un marquage des cellules CD3<sup>+</sup> (**Figure 23-B**), c’est-à-dire le groupe comprenant à la fois les lymphocytes TCD4<sup>+</sup> et les lymphocytes T CD8<sup>+</sup>.



**Figure 23 : Immunohistochimie et quantification des cellules immunitaires Iba1<sup>+</sup> et CD3<sup>+</sup> infiltrées au sein de l'hippocampe post immunisation chez les souris APOE<sup>-/-</sup>. (D'après Pan et al., 2017).**

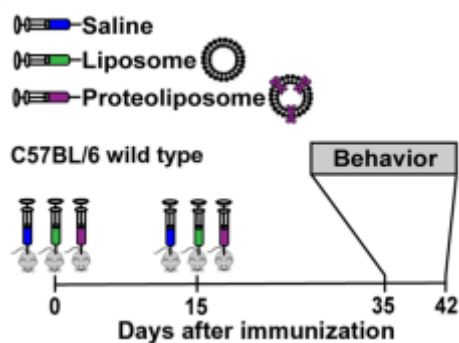
En (A), nous observons la quantification ainsi que la photographie des cellules Iba1 (Rouge) marquées. (DAPI : marquage nucléaire – bleu). (B) Cette quantification et sa photographie associée est également disponible pour les cellules CD3 (rouge) (DAPI : marquage bleu). (D'après l'étude de Pan et al., 2017).

Nous pouvons nous rendre compte avec ce marquage en IHC, qu'il n'y a pas de différence significative quant à l'infiltration de cellules inflammatoires, de quelque type que cela soit au sein de l'hippocampe des souris des différentes conditions et souches (ApoE<sup>-/-</sup> et ApoE<sup>+/+</sup>).

Ce modèle intéressant est le premier à avoir proposé l'étude du système immunitaire via une immunisation active. Néanmoins, nous pouvons nous interroger quant à la pertinence du protocole expérimental utilisant de nombreux paramètres (souches ApoE<sup>-/-</sup> et ApoE<sup>+/+</sup>, MK801, quatre peptides utilisés en simultanément) et pouvant être autant de biais dans l'interprétation des résultats finaux. Ce modèle ainsi que ses limites seront évoqués lors de la discussion.

### III-2-B : Modèle de Jones et collaborateurs en 2019

Dans ce modèle, les auteurs se proposent de réaliser une **immunisation active** avec un **assemblage** composé des sous unités **GluN1** et **GluN2B** du NMDAR, stabilisés au sein de **liposomes**. L'assemblage du liposome et de l'hétérodimère permet d'obtenir un **protéoliposome (Figure 24 – NMDARs de couleur violette)**. Ce protéoliposome est ensuite injecté en sous cutané chez des souris adultes de souche sauvage C57BL/6J. Cette technique utilise un rappel immunologique 15 jours après la primo-immunisation (Figure 24) et permet, quatre semaines post immunisation, la mise en place chez les souris de déficits comportementaux mais aussi la présence d'anticorps anti-NMDAR (Jones et al., 2019).



**Figure 24 : Schéma du protocole expérimental utilisé dans l'étude de Jones et collaborateurs en 2019.**

3 groupes sont proposés dans cette étude. Un groupe où les souris ne recevront que du liquide physiologique (Saline), un groupe où elles recevront des liposomes seuls et un dernier groupe où elles recevront des liposomes avec le NMDAR (protéoliposome). Les trois groupes de souris seront immunisés avec l'un de ces composés et un rappel immunologique sera effectué 15 jours après la primo-immunisation. Passé ces étapes, les tests comportementaux pourront être effectués. (D'après l'étude de Jones et al., 2019).

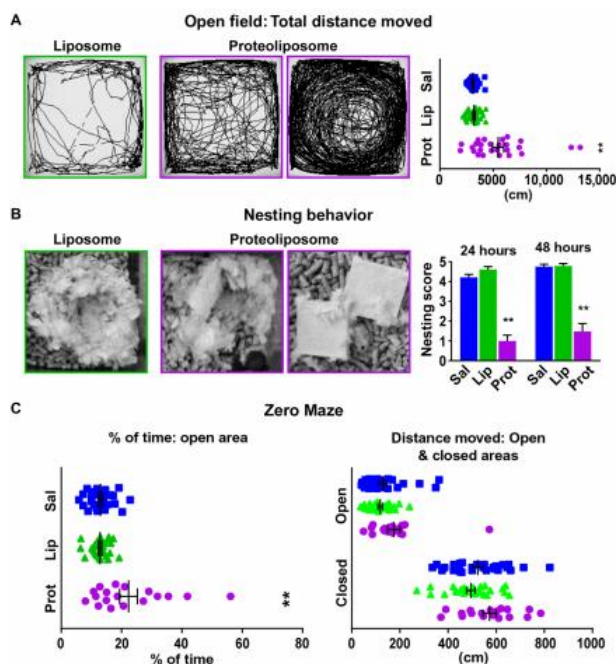
Les déficits comportementaux observés sont concordants avec ceux mis en évidence dans de précédents modèles et/ou reproduisant en partie les déficits comportementaux rencontrés dans la pathologie humaine (Dalmau *et al.*, 2008 ; Planagumà *et al.*, 2015 ; Wright *et al.*, 2015). Les troubles comportementaux observés incluent une hyperactivité motrice ou encore des épisodes de *circling* au sein de la cage.

De manière plus poussée, les déficits comportementaux observés, notamment moteurs, ont pu être mise en évidence via l'épreuve de champs ouvert (*open field*). Ce test analyse le comportement exploratoire du rongeur dans un espace clos et permet, entre autres, de mettre en évidence une hyper ou une hypoactivité motrice. Nous remarquons dans cette étude une distance parcourue de près du double chez les animaux immunisés avec les protéoliposomes comparé aux animaux du groupe contrôle liposome seul qui présente une activité locomotrice beaucoup moins importante (**Figure 25 - A**).

Également, il a pu être mis en évidence des comportements stéréotypés anormaux touchant la création du nid (*Nesting behaviour*) (**Figure 25 - B**). Le test du nid est simple à mettre en place, peu coûteux et très visuel. Un défaut dans la nidification peut, chez le rongeur, dénoter un déficit de type anhédonique, de motivation ou encore moteur. Sa quantification est facilement réalisable grâce à un score allant de 0 à 5 (**Figure 25 - B**). Nous remarquons chez les animaux immunisés avec les protéoliposomes, un défaut dans la création de leur nid avec des nids très peu structurés et non terminés (**Figure 25 - B – photographie de droite, couleur violette**), en comparaison des nids des animaux contrôles qui sont, quant à eux, plus

complexes et aboutis (*Figure 25 – B – photographie de gauche, couleur verte*).

Enfin, une épreuve de labyrinthe de O est réalisée chez les animaux. Cette épreuve permet de démontrer que les animaux immunisés avec le protoéoliposome ne présentent pas de déficits de type anxieux et ont un comportement très proche de celui observé chez les animaux contrôles (liquide physiologique – *saline* - et liposome) (*Figure 25 - C*).



*Figure 25 : Protocole comportemental utilisé dans le modèle de Jones et collaborateurs.*

*A : Tracés des souris dans le dispositif de champs ouvert pour les différentes conditions expérimentales ainsi que le diagramme de quantification pour la distance totale parcourue en cm.*

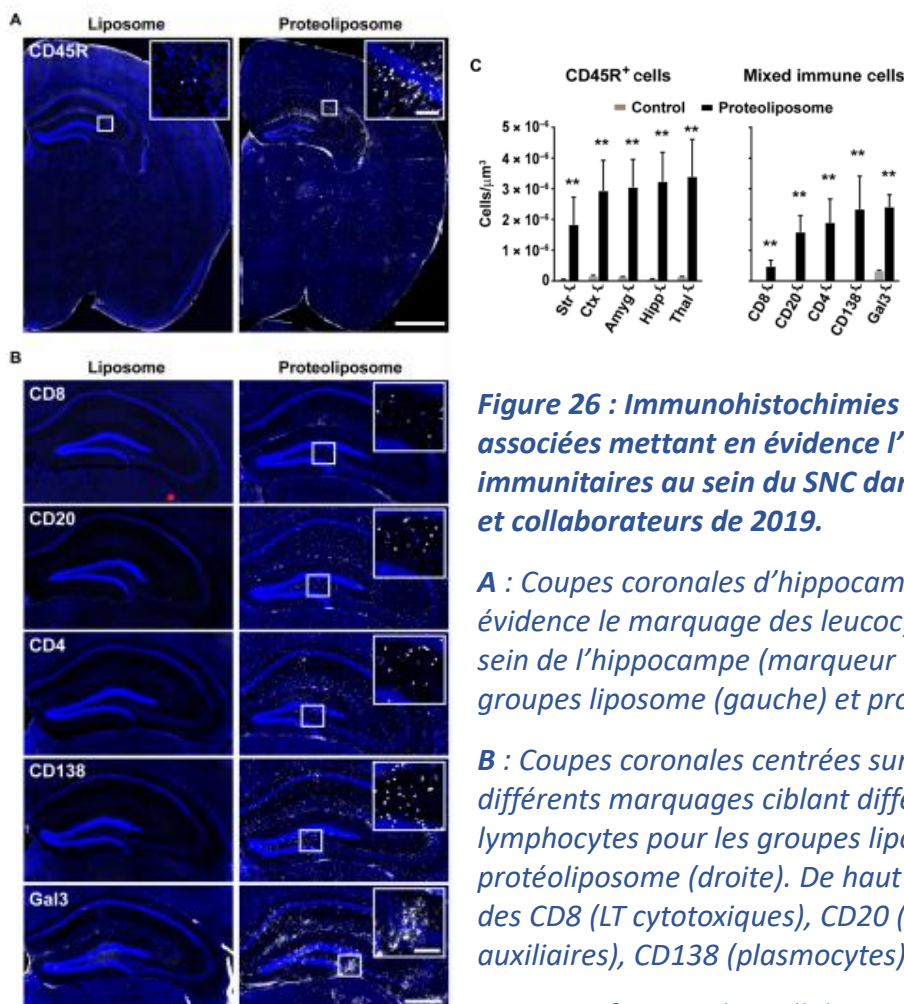
*B : Photographies des nids de souris issues des groupes expérimentaux permettant de mettre en place des comportements stéréotypés affectant la création du nid avec un score allant de 0 à 5. A droite, le diagramme permettant de quantifier les nids pour chaque condition expérimentale.*

*C : Diagramme quantifiant l'épreuve du labyrinthe en O avec le % de temps passé dans la zone ouverte (gauche) et la distance parcourue dans les bras ouverts et fermés (droite) pour chaque condition expérimentale. (D'après l'étude de Jones et al., 2019).*

Un autre point important mis en évidence dans ce modèle et crucial dans un modèle animal d'EAI à anticorps anti-NMDAR est l'infiltration de cellules immunitaires au sein du SNC. Cette infiltration de cellules immunitaires a pu être mise en évidence dans ce modèle, dans un premier temps de manière large par une coloration éosine-hématoxyline. Cette infiltration cellulaire prédomine au niveau des espaces périvasculaires du gyrus denté de l'hippocampe mais aussi au niveau du néocortex. La nature précise de ces infiltrats cellulaires a pu être mis en évidence via des marqueurs spécifiques (*Figure 26 A et B*). Ainsi, au sein de l'hippocampe, il est possible d'observer un infiltrat de cellules immunitaires (leucocytes) mis en évidence avec le marqueur général CD45R (*Figure 26 - A*). Cet infiltrat de leucocytes est composé de



lymphocytes T auxiliaires présentant le marqueur CD4<sup>+</sup>, de quelques lymphocytes T cytotoxiques présentant le marqueur CD8<sup>+</sup>, de lymphocytes B présentant le marqueur CD20<sup>+</sup>, ou encore de plasmocytes présentant le marqueur CD138<sup>+</sup> (**Figure 26 - B**). Tous ces sous types de cellules immunitaires ont pu être observés au sein même de l'hippocampe mais également au niveau de l'amygdale, du thalamus et du cortex (Jones *et al.*, 2019).



**Figure 26 : Immunohistochimies et leurs quantifications associées mettant en évidence l'infiltration de cellules immunitaires au sein du SNC dans le modèle de Jones et collaborateurs de 2019.**

**A :** Coupes coronales d'hippocampes mettant en évidence le marquage des leucocytes totaux infiltrés au sein de l'hippocampe (marqueur CD45R) pour les groupes liposome (gauche) et protéoliposome (droite).

**B :** Coupes coronales centrées sur l'hippocampe avec différents marquages ciblant différentes populations de lymphocytes pour les groupes liposome (gauche) et protéoliposome (droite). De haut en bas, le marquage des CD8 (LT cytotoxiques), CD20 (LB), CD4 (LT auxiliaires), CD138 (plasmocytes) et Gal3.

**C :** Quantification des cellules immunitaires leucocytaires totales (CD45R) (diagramme de gauche) au niveau du striatum, de l'hippocampe, du cortex, de l'amygdale, et du thalamus pour les groupes contrôle et protéoliposome (diagramme de gauche) et pour les sous-types cellulaires, le marquage des CD8 (LT cytotoxiques), CD20 (LB), CD4 (LT auxiliaires), CD138 (plasmocytes) et Gal3 (diagramme de droite) au niveau de ces mêmes zones anatomiques. (D'après l'étude de Jones *et al.*, 2019).

Pour comprendre l'implication des différents sous types de lymphocytes B et T, les auteurs de ce travail ont reproduit l'immunisation sur deux souches de souris transgéniques. Une souche ne présentant **pas de lymphocytes B : la souche *MuMt*** et l'autre ne présentant **pas de lymphocytes T matures** (CD4<sup>-</sup> et CD8<sup>-</sup> doubles négatifs) : **la souche *Tcrα***. Ces deux souches murines transgéniques sont bien connues et ont été largement utilisées dans d'autres travaux (Kitamura *et al.*, 1991 ; Mombaerts *et al.*, 1992). Avec la souche transgénique *MuMt*, il n'y a pas la possibilité d'obtenir d'anticorps puisque ces derniers sont produits par la maturation des lymphocytes B en plasmocytes. L'immunisation de ces souris avec les protéoliposomes ne permet pas la mise en place de déficits comportementaux parmi ceux observés ni à générer des infiltrats immunitaires comme ceux classiquement décrits plus haut avec la souche sauvage C57BL/6J, que cela soit 6 ou 12 semaines post immunisation. Cette même conclusion peut être faite pour la souche transgénique de souris *Tcrα* (Jones *et al.*, 2019). Les auteurs concluent donc en la nécessité d'une coopération entre les lymphocytes B et les lymphocytes T pour induire chez la souris une immunisation permettant de mimer une EAI à anticorps anti-NMDAR, bien que le lymphocytes B soient le type cellulaire central dans cette pathologie, une coopération entre le lymphocyte B et le lymphocyte T est souvent un élément clé dans les pathologies auto-immunes (Pilli *et al.*, 2017). Les lymphocytes T et particulièrement les lymphocytes T CD4 auxiliaires, pourraient promouvoir la neuro-inflammation et potentialiser les réponses des lymphocytes B et des plasmocytes, cela est notamment le cas au niveau de l'Homme avec des profils cytokiniques dans le LCR en faveur d'une implication des lymphocytes T CD4 auxiliaires (Ulusoy *et al.*, 2012 ; Kothur *et al.*, 2016 ; Liba *et al.*, 2016).

Pour terminer leur étude, les auteurs se sont proposés d'observer l'impact des différents sera sur la transmission glutamatergique. Ils ont constaté que le sérum de souris du groupe protéoliposome ne bloque pas de manière aiguë (incubation courte) la fonction des récepteurs NMDA, comme évalué sur culture de neurones hippocampiques. En revanche, une incubation de 24 heures avec le sérum de souris du groupe protéoliposome réduit l'activation synaptique des NMDAR en comparaison au groupe contrôle. Une incubation longue de 24 heures permet donc d'obtenir un effet sur la transmission glutamatergique alors qu'une incubation courte n'est pas en mesure d'induire cet effet sur les NMDAR.



### III-2-C : Modèle de Ding et collaborateurs en 2021

Le modèle proposé par Ding et collaborateurs est celui qui se rapproche le plus de celui que nous proposons dans ce travail de thèse et le dernier à être paru dans la littérature scientifique, à la suite de notre travail (Wagnon *et al.*, 2020). Les auteurs proposent également de réaliser une immunisation active mais cette fois-ci, contre un peptide contenant la partie reconnue par les anticorps anti-NMDAR (N368-G369). Ce peptide, dénommé GluN1<sub>356-385</sub> est injecté à des souris femelles âgées de dix semaines, de souche C57BL/6J. L'immunisation, en sous cutané, est composé du peptide, d'adjuvant complet de Freund et de *Mycobacterium tuberculosis*. S'en suit deux injections intra-péritonéales de toxine pertussique, le jour de l'immunisation et 48h après. La toxine pertussique facilite l'ouverture de la BHE dans ce contexte inflammatoire.

Un rappel immunologique à la semaine quatre est rajouté, puis, à la semaine huit suivant la primo-immunisation (Figure 27).

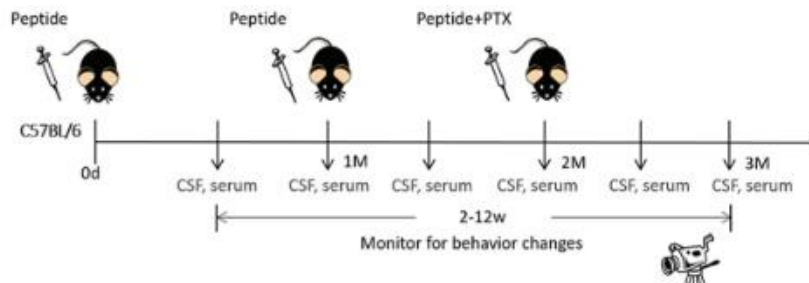
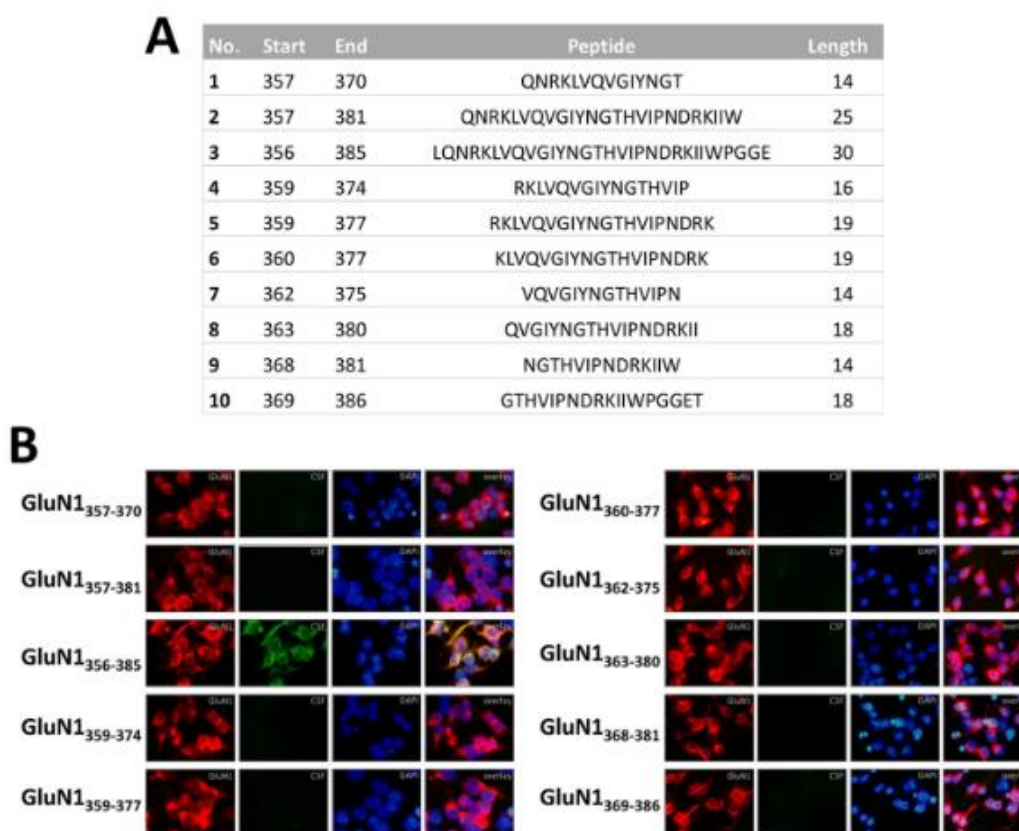


Figure 27 : Protocole expérimental utilisé dans le modèle de Ding et collaborateurs. (D'après l'étude de Ding et collaborateur, 2021).

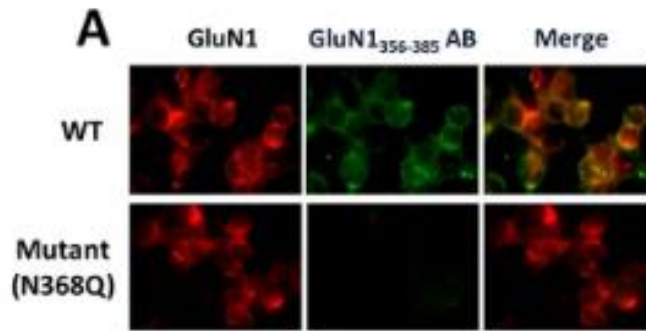
Plusieurs peptides ont pu être utilisés dans ce modèle, ils sont présents dans la figure 28 – A ci-dessous. Notons que seul le peptide GluN1<sub>356-385</sub> a été en mesure d'engendrer une production d'anticorps anti-NMDAR détectable via des HEK293 transfectées (Figure 28 – B).



**Figure 28 : A - Tableau récapitulatif des différents peptides conçus et utilisés pour les immunisations dans le modèle murin proposé par Ding et collaborateurs. B – Immunomarquage sur cellules HEK-293 transfectées et utilisation des LCR issus de souris immunisées contre les différents peptides proposés.**

**A** - Notons que le peptide retenu pour son efficacité dans ce tableau porte le numéro 3 : peptide GluN1<sub>356-385</sub>. **B** – Images d'IHC de cellules HEK-293 incubées avec les LCR de souris immunisées avec les différents peptides proposés dans le tableau **A**. **B** - Nous constatons que seul l'immunisation avec le peptide GluN1<sub>356-385</sub> permet une production d'anticorps qu'il est possible de détecter via des HEK-293 transfectées. (Rouge : anticorps anti-GluN1 commercial ; vert : LCR murin ; Bleu : marquage des noyaux au DAPI ; merge des trois marquages). (D'après Ding et collaborateurs., 2021).

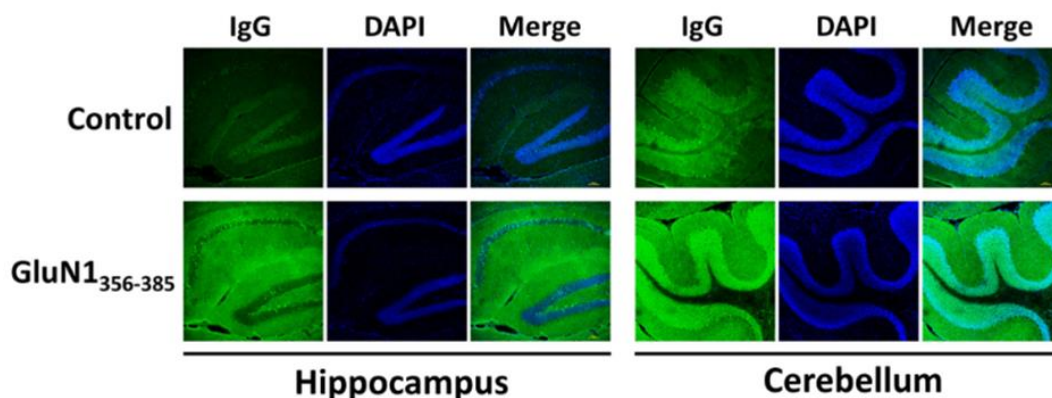
Pour confirmer le fait que le peptide utilisé GluN1<sub>356-385</sub> est bien efficace en termes d'immunogénicité, ce dernier a été **muté** sur l'**acide aminé 368** (Asparagine - N), en le remplaçant par une arginine (Q). Les souris sont à nouveau immunisées avec ce nouveau peptide nommé GluN1(N368Q) et nous constatons qu'il n'est **plus possible de détecter les anticorps** via les HEK-293 transfectées avec ce nouveau peptide muté (**Figure 29**).



**Figure 29 :** Images issues d'une technique d'IHC sur cellules HEK-293 transfectées utilisant le LCR issu de l'immunisation contre le peptide muté GluN1(N368Q) et un LCR contrôle.

Avec cette technique nous pouvons observer qu'il est possible de détecter les anticorps dirigés contre le peptide GluN1<sub>356-385</sub> (WT) mais que ces mêmes anticorps sont indétectables sur la version mutée de ce peptide (Mutant N368Q). Rouge : anticorps anti GluN1 commercial ; Vert : LCR murin ; Merge : superposition des images. (D'après l'étude de Ding et collaborateurs et al., 2021).

Pour aller plus en détail dans l'analyse de ces anticorps et notamment en ce qui concerne leur répartition spatiale, des IHC d'hippocampes et de cervelets ont été réalisés sur les encéphales des souris douze semaines post immunisation en ciblant les IgG totales de ces structures cérébrales. Nous notons un marquage plus intense au niveau de l'hippocampe et du cervelet des souris immunisées avec le peptide GluN1<sub>356-385</sub> (**Figure 30**) en comparaison avec le groupe contrôle (**Figure 30**).



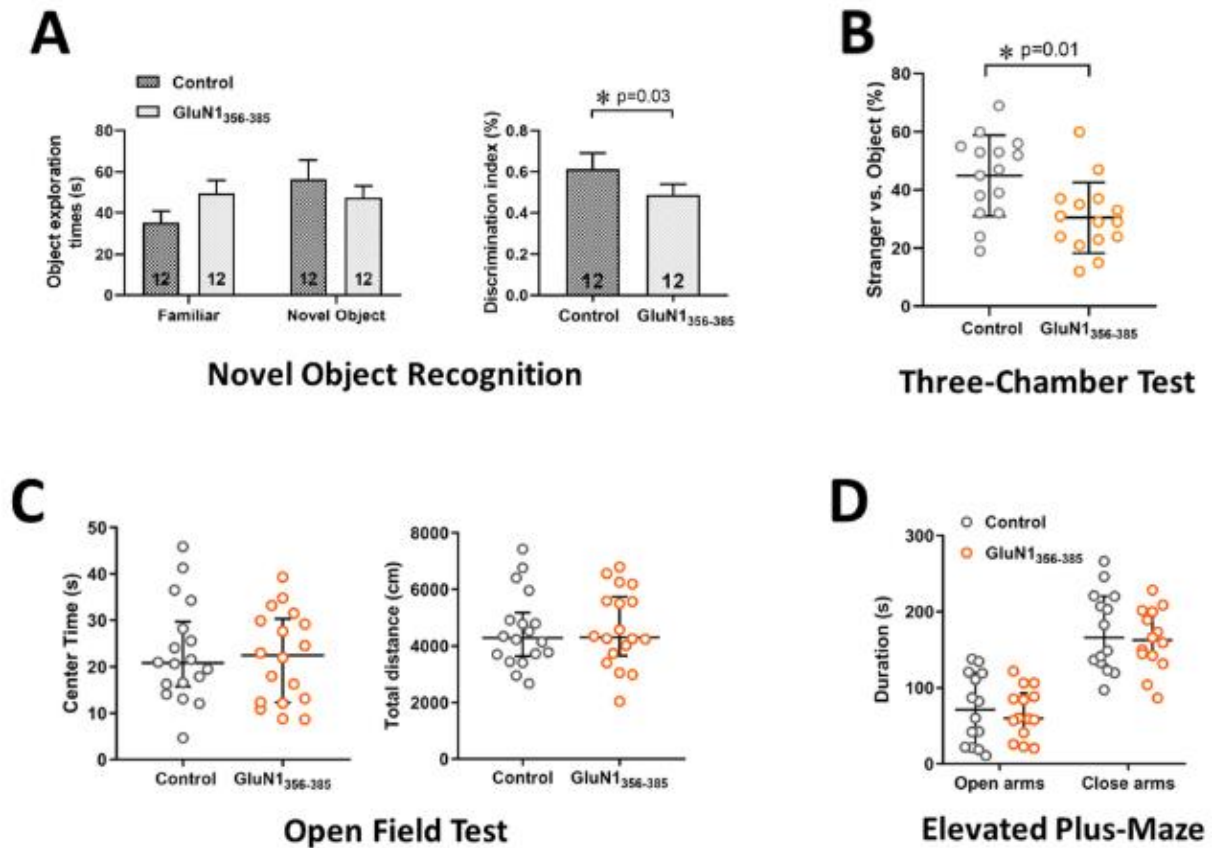
**Figure 30 :** Photographies d'IHC de coupe d'hippocampe et de cervelet de souris immunisées contre le peptide GluN1<sub>356-385</sub> et de souris du groupe contrôle le tout ciblé par un marquage anti-IgG.

Nous pouvons noter que les coupes d'hippocampe et de cervelet de souris immunisées contre le peptide GluN1<sub>356-385</sub> présentent un marquage anti-IgG beaucoup plus intense qu'au niveau de ces même structures chez les souris du groupe contrôle. (D'après Ding et al., 2021).

Pour finir cette étude, les auteurs proposent d'étudier le comportement des souris immunisées avec le peptide *GluN1<sub>356-385</sub>* en le comparant aux animaux du groupe contrôle. Les tests utilisés sont :

- **Test de reconnaissance d'un nouvel objet** (NORT - *Novel Object Recognition Test*) (**Figure 31 – A**).
- **Le Three-Chamber Test** (TCT) (**Figure 31 – B**). Le TCT évalue la cognition sous forme de sociabilité de manière générale et d'intérêt pour la nouveauté sociale qu'un rongeur peut présenter face à un environnement nouveau. Les rongeurs préfèrent normalement passer plus de temps avec un autre rongeur, c'est le caractère de sociabilité et enquêteront sur un nouvel intrus plus que sur un intrus qui leur est déjà familier, c'est la nouveauté sociale. Sur la base de ces deux paramètres, le TCT peut aider à identifier les rongeurs présentant des déficits de sociabilité et / ou de nouveauté sociale.
- **Un test de champs ouvert** (*Open Field*). (**Figure 31 – C**).

- *Un test en croix surélevée (Elevated Plus Maze Test). (Figure 31 – D).*



**Figure 31 : Diagrammes représentant les différents tests comportementaux réalisés par les souris immunisées contre le peptide GluN1<sub>356-385</sub> et les souris du groupe contrôle 12 semaines post-immunisation.**

Sur cette figure sont présents les résultats pour le test de reconnaissance de nouvel objet (A) ; du TCT (B) ; du test de champs ouvert (C) et du test de labyrinthe en croix surélevée (D) (Gris : groupe contrôle ; orange : groupe GluN1<sub>356-385</sub>) (D'après Ding et al., 2021).

Douze semaines post-immunisation, il est possible de détecter chez les souris immunisées contre le peptide GluN1<sub>356-385</sub> une baisse du temps d'exploration et un pourcentage de discrimination moins bon que les souris du groupe contrôle dans un test de reconnaissance de nouvel objet. En effet, les souris immunisées avec le peptide GluN1<sub>356-385</sub> passent significativement plus de temps à explorer l'objet qui leur est familier plutôt que le nouvel objet qui devrait en théorie plus les attirer (Figure 31 – A). Pour ce qui est du TCT nous

constatons que les souris immunisées contre le peptide vont visiter significativement moins les animaux inconnus que les animaux du groupe contrôle, ce qui dénote un déficit de nouveauté sociale chez ces souris (*Figure 31 – B*). En revanche, aucune différence significative n'a pu être mise en évidence pour le test du labyrinthe en croix surélevée ou encore dans le test du champ ouvert. Ces données suggèrent que les souris immunisées contre le peptide ne présentent pas de déficits de type anxieux (*Figure 31 C– D*).

Pour terminer leur étude, les auteurs se proposent d'étudier l'impact des anticorps issus de l'immunisation des souris avec leur peptide sur la LTP au niveau de coupes hippocampiques (collatérales de Schaeffer-CA1). Pour obtenir un point de repère fiable, ils utilisent en parallèle un LCR issu de patients atteints par l'EAI à anticorps anti-NMDAR, puis, le LCR d'animaux du groupe contrôle. Les coupes hippocampiques sont incubées dix minutes avec les différents LCRs. Après dix minutes d'incubation, une stimulation Théta est réalisée. Passé 30 minutes, l'ampleur de la LTP est diminuée à la fois dans le groupe LCR patients malades et dans le groupe LCR de souris immunisées contre le peptide. En revanche, la LTP n'est pas affectée avec le LCR des souris du groupe contrôle. En plus de cela, les auteurs mettent en évidence une diminution de l'influx calcique glutamatergique avec le LCR issus de patients malades ou avec celui de souris immunisées contre le peptide. En revanche, le LCR de souris issu du groupe contrôle n'affecte en rien l'influx calcique.

Ce modèle, le plus récent pour le moment, **partage de nombreuses similitudes avec le nôtre** (Wagnon *et al.*, 2020). Il est centré sur une **immunisation active** contre un **peptide unique** et permet, comme pour notre modèle, de venir **confirmer les effets des anticorps anti-NMDAR** murin sur la **production intrathécale d'anticorps anti-NMDAR au sein du LCR** et donc du SNC et de leurs **implications dans des déficits comportementaux et mnésiques**. Nous discuterons de ce modèle plus en détail lors de la discussion.

### *III-3 : Modèle d'injection intracérébroventriculaire de Wright et collaborateurs en 2015 : une adaptation du modèle d'infusion pour l'étude de l'épilepsie*

L'épilepsie est retrouvée à la fois durant la phase psychiatrique et neurologique de la pathologie. Dans ce modèle, les auteurs se sont particulièrement intéressés aux

manifestations de type épileptique. Ce modèle est une variante du modèle de Planagumà. Il permet d'étudier l'effet épileptogène des anticorps anti-NMDAR humains avec une injection unique d'IgG intracérébroventriculaire. Avant cette injection, un dispositif électroencéphalographique sans fil est placé sur l'animal ; il est relié à un boîtier télémétrique situé dans le flanc (**Figure 32**). Ce dispositif permet de recueillir en temps réel l'activité cérébrale de l'animal.



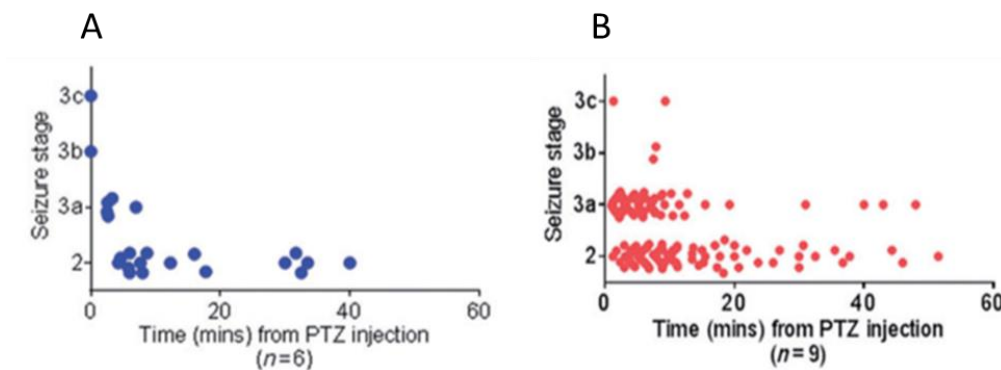
**Figure 32 : Dispositif d'implant EEG placé sur le crâne de la souris et relié à un boîtier d'enregistrement en sous cutané, au niveau dorsal.**

*(D'après l'étude de Wright et al., 2015).*

Pour étudier la susceptibilité à l'épilepsie de ces animaux, une injection d'une molécule pro-convulsivante, le **pentylétréazol** (PTZ) est réalisée. Le PTZ est un antagoniste non compétitif des récepteurs GABA de type A (Luttjohann *et al.*, 2009). Son injection s'est avérée nécessaire car les auteurs n'ont pas observé la survenue de crises spontanées à la suite de l'injection des IgG anti-NMDAR humaines. Afin de favoriser l'étude des événements épileptiques associés à la pathologie, les auteurs ont alors choisi d'injecter le PTZ. Une injection de ce type conduit à l'apparition rapide de convulsions chez la souris. Ces convulsions peuvent être catégorisées grâce à une échelle de score spécifique : **l'échelle de Racine** (RS - *Racin's scale*) (Luttjohann *et al.*, 2009). A l'aide de ce protocole, il est possible de voir si les animaux injectés avec des IgG de patients atteints par la maladie développent plus de convulsions et de quantifier la sévérité des crises induites. Ces données ont été comparées à celles obtenues chez les souris injectées avec les IgG contrôles. Ces expériences montrent que, chez les souris injectées avec les IgG de patients, le nombre de convulsions est toujours plus élevé et que la sévérité des crises est plus forte par rapport aux souris du groupe contrôle (**figure 33.A - B**). De plus, les auteurs rapportent qu'après l'injection de PTZ, la latence de



survenue des premières convulsions est plus courte chez les animaux injectés avec les IgG de patients en comparaison aux animaux contrôles (*figure 33.A - B*).



**Figure 33 : Sévérité et nombre de convulsions observés dans le modèle d'injection intracérébroventriculaire de LCR chez des sujets contrôles (A) ou des patients (B) après une injection unique de PTZ.**

**(A)** Nombre d'événement survenant à la suite d'une injection de PTZ chez les souris avec le LCR d'individus sains au cours des 60 minutes de test. **(B)** Nombre d'événements survenant à la suite d'une injection de PTZ chez les souris avec le LCR de patients au cours des 60 minutes de test. (Bleu : groupe contrôle ; rouge : groupe IgG anti-NMDAR) (D'après Wright et al., 2015).

Cette étude montre que les anticorps anti-NMDAR augmentent la sensibilité à l'épilepsie induite de manière pharmacologique. Quand ils sont injectés dans l'encéphale de la souris, les anticorps anti-NMDAR de patients augmentent le nombre d'événements convulsifs, leur latence d'apparition, ainsi que leur sévérité (*figure 33.A - B*).

Ce modèle a permis d'aborder l'épilepsie dans un modèle murin d'injection intracérébroventriculaire d'anticorps anti-NMDAR. Il complète le modèle d'infusion de Planagumà et collaborateurs dans la mesure où il associe un nouveau symptôme de la pathologie humaine dans un modèle animal mimant l'EAI à autoanticorps anti-NMDAR.

Une critique majeure de ce modèle est, à l'instar du modèle d'infusion, qu'il ne permet pas d'étudier les implications du système immunitaire dans la pathologie. L'étiologie de l'épilepsie dans l'EAI à anticorps anti-NMDAR reste encore aujourd'hui obscure, sa prise en charge



pendant et après la maladie, complexe. Il serait intéressant que les modèles murins d'EAI à anticorps anti-NMDAR s'y intéresse avec des modèles murins épileptiques plus poussés permettant de mieux comprendre comment elle se met en place et trouver des stratégies thérapeutiques la ciblant plus efficacement.

#### *IV : Les lymphocytes B : cellules centrales dans l'encéphalite auto-immune à anticorps anti-NMDAR*

La mise en place d'une réponse auto-immune peu correspondre à la dérégulation du système immunitaire contre, par exemple un composant du soi, dans le cas de l'EAI à anticorps anti-NMDAR, c'est une partie de l'ATD qui est visée. Cette réponse auto-immune est souvent due à des ruptures de contrôle dans les mécanismes régulant l'auto-immunité et cela à différents niveaux du développement des cellules immunitaires. En condition physiologique, il existe des mécanismes de régulation de l'auto-immunité dit centraux, qui ont lieu au sein de la moelle osseuse et des mécanismes dits périphériques, qui prennent place au niveau des organes lymphoïdes secondaires (rate et ganglions lymphatiques). Ces deux phénomènes sont regroupés sous le terme générique de tolérance et induisent, s'ils ne sont pas correctement effectués, des processus auto-immuns. Cette tolérance immunitaire est valable pour les lymphocytes B et les lymphocytes T. Comme nous avons pu le voir au début de cette introduction, le lymphocyte B est l'acteur clé dans la physiopathologie de l'EAI à anticorps anti-NMDAR. Pour cela, nous allons nous focaliser sur le développement du lymphocyte B dans les paragraphes suivants, puis, nous aborderons les mécanismes de tolérance immunitaire, centraux dans l'auto-immunité.

Dans l'EAI à anticorps anti-NMDAR, cette perte de régulation touche le lymphocyte B. Pour le moment, les mécanismes exacts impliquants cette dérégulation restent obscurs. L'hypothèse d'une réaction immunitaire dirigée contre le tératome ovarien est mise en avant, mais pour l'heure actuelle, la physiopathologie exacte immunitaire reste encore peu comprise. La régulation de l'auto-immunité est un processus très complexe qui intervient à différents moments du développement du lymphocyte B. Pour permettre une bonne compréhension de ces mécanismes dans leur globalité, nous nous proposons dans un premier temps, d'expliquer

le développement du lymphocyte B et comment sont générés les différentes populations lymphocytaires de cette lignée. Puis, dans un second temps, nous nous proposons d'expliquer les principaux mécanismes de régulation de l'auto-immunité dans la lignée des lymphocytes B.

#### *IV-1 : Introduction*

Chez la souris et les mammifères de manière générale, la génération des lymphocytes B (LB) dans la moelle osseuse est un processus complexe guidant les cellules souches hématopoïétiques multipotentes à travers différents stades de maturation et de différenciation. Deux phases peuvent être identifiées dans ce développement. **Une première phase indépendante de l'antigène** qui se déroule au sein de la **moelle osseuse** et une **phase dépendante de l'antigène** qui se déroule en périphérie au sein des **organes lymphoïdes secondaires**. Les organes lymphoïdes secondaires comprennent la rate et les ganglions lymphatiques. La première phase permet de générer un LB immature naïf exprimant à sa surface un récepteur de la cellule B (BCR – *B Cell Receptor*) représentant un large répertoire pré-immun. La *seconde phase*, quant à elle, va permettre à ce répertoire pré-immun de s'adapter à différents antigènes via des étapes secondaires de maturation permettant *in fine* la genèse de lymphocytes B mémoires et de plasmocytes. Nous allons, tout au long de ce chapitre, décrire les processus de différenciation et de maturation conduisant à la genèse des sous-populations de lymphocytes B qu'il est possible de rencontrer. Nous nous focaliserons par la suite d'avantage sur la réponse thymo-dépendante, plus en adéquation avec la pathologie étudiée dans ce travail de thèse. Puis, nous aborderons les points de contrôle permettant de réguler les phénomènes auto-immuns.

#### *IV-2 : La phase indépendante de l'antigène : les principaux acteurs cellulaires et moléculaires précoces*

Le développement précoce du LB au sein de la moelle osseuse dépend d'activités orchestrées entre différents facteurs de transcription et signaux extracellulaires. Ces acteurs agissent de concert pour stimuler l'expansion et la maturation des populations progénitrices de LB. Ces mécanismes impliquent des recombinaisons dans les gènes des immunoglobulines

ainsi que des étapes de sélection à la fois négative et positive pour garantir la réactivité et la fonctionnalité de la cellule B finale. Les réarrangements des segments des gènes des immunoglobulines permettent de générer un vaste répertoire reconnaissant en théorie plus de  $5 \times 10^{13}$  antigènes différents (Pieper *et al.*, 2013).

Nous allons, à travers cette partie, présenter de manière globale les différents mécanismes se déroulant indépendamment de la présence d'un antigène. Nous commencerons par exposer les différentes cellules souches et les principaux facteurs de transcription qui leur sont associés. Puis, nous décrirons le pré-récepteur de la cellule B (pré-BCR) et son implication dans le développement du lymphocyte B permettant d'aboutir à un lymphocyte B immature avant sa sortie de la moelle osseuse.

#### *IV-2-A : Développement précoce des cellules B au niveau embryonnaire et les principaux acteurs moléculaires associés*

Au cours du développement embryonnaire précoce, les cellules souches hématopoïétiques à longue durée de vie (LT-HSC – Cellules souches hématopoïétiques à longue durée de vie - *Long term Hematopoïtic stem cells*) migrent de façon transitoire dans le foie fœtal, où elles se développent et mûrissent en cellules B, puis vont peupler préférentiellement le tissu pulmonaire ainsi que les tissus lymphoïdes associés à l'intestin. L'embryon de souris est colonisé par différentes vagues de cellules souches hématopoïétiques. La première vague, appelée la vague de l'hématopoïèse primitive, commence au stade embryonnaire 7.5 (E7.5 jours) et tient place dans l'environnement extra-embryonnaire du sac vitellin. Très peu de choses sont connues au sujet de cet environnement, mais il est admis qu'il permet la genèse des érythrocytes, des mégacaryocytes et des plaquettes (Melchers *et al.*, 2015).

La deuxième et la troisième vague de l'hématopoïèse sont intra-embryonnaires et débutent au stade E10.5 dans la zone Aorte-Gonade-Mésonephros (AGM). Au niveau de cet axe AGM, les LT-HSC migrent via le sang embryonnaire pour regagner les rudiments en développement du foie fœtal, de l'omentum, du thymus et de la moelle osseuse. Les LT-HSC vont nouer des contacts étroits avec l'endothélium vasculaire de ces structures. Cet endothélium vasculaire

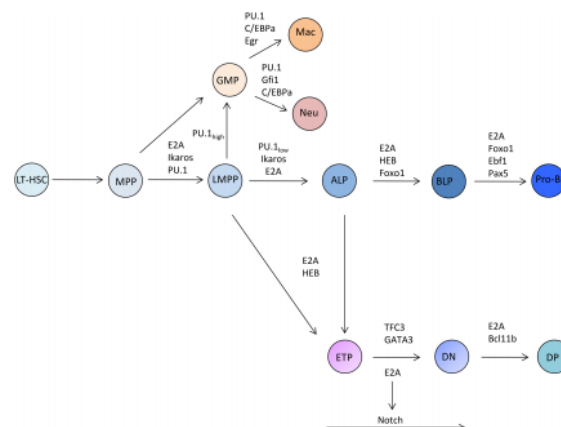
embryonnaire produit des facteurs trophiques comme le ligand c-kit (KIT-L), une cytokine essentielle dans le développement des LT-HSC. Cet endothélium produit également la CXCL10 (C-X-C-motif), une chimiokine qui, à partir du stade développemental E12.5, attire d'autres cellules hématopoïétiques et permet leur migration du sang vers les organes primaires en développement.

A partir du stade embryonnaire E17.5, la moelle osseuse devient le site privilégié de la troisième vague de l'hématopoïèse. Plusieurs caractéristiques permettent de différencier le développement au sein du foie fœtal du développement au sein de la moelle osseuse. En effet, contrairement au foie fœtal, la moelle osseuse soutient la génération de cellules B tout au long de la vie à partir des LT-HSC. Ces cellules trouvent des niches dans lesquelles elles peuvent résider sur de très longues périodes. En revanche, la lymphopoïèse des cellules B dans le foie fœtal est transitoire. Il n'y a pas dans cette structure de niches offrant des facteurs trophiques permettant une survie sur le long terme (Tokoyoda *et al.*, 2010).

La progression du développement des LT-HSC est initiée par l'amorçage du répertoire de gènes et de facteurs de transcription spécifiques de la lignée B. Lors de la différenciation des cellules B, les acteurs les plus fréquemment rencontrés sont EBF1 (EBF1 – *EBF transcription factor 1*), FOXO1 (FOXO1 – *Forkhead box protein O1*), Ikaros, E2A et PAX5 (PAX-5 – *Paired Box Protein 5*). EBF1 et E2A agissent de concert et permettent l'expression de gènes spécifiques de la lignée des LB tels que Rag 1 et Rag 2 (Rag - *Recombination Activating Gene 1 ou 2*), mb1 ou encore b29. Ces protéines sont, entre autres, impliquées dans la production et la signalisation du BCR mais aussi dans le réarrangement de gènes des Igs. De manière plus détaillée, les LT-HSC donnent naissance aux progéniteurs multipotents (MPP – *Multi-Potent Progenitors*) qui eux même mènent aux progéniteurs lymphoïdes multipotents (LMPP – *Lymphoid Multi-Potent Progenitors*) (*figure 34*) (Murre C., 2018). Les LMPP ont aussi la capacité de se différencier en progéniteurs de granulocytes/macrophages (GMP – *Granulocyte / Macrophage Progenitors*). A ce stade, et via des balances moléculaires de différents facteurs de transcriptions, les GMP peuvent se différencier soit en macrophage (MAC) soit en neutrophile (NEU) (*Figure 34*). La triade PU.1, C/EBPa et EGR aura plutôt tendance à donner des macrophages, tandis que le

groupe PU.1, Gfi1 et C/EBPa donnera plutôt des neutrophiles. Les acteurs PU-1, ikaros et E2A permettent le développement à partir des LMPP de tous les progéniteurs lymphoïdes (ALP – *All Lymphoïds Progenitors*), tandis que le couple E2A/HEB induit le développement des précurseurs précoces des cellules T (ETP – *Early T Precursors*). Les ETP peuvent se différencier en lymphocytes T CD4<sup>-</sup>/CD8<sup>-</sup> autrement nommés DN (pour Double Négatif) puis ces derniers poursuivent leur différenciation en lymphocytes T CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> ou DP (pour Double Positif). Notons également que les ETP peuvent être obtenus via les ALP toujours grâce au couple E2A/HEB. Cette différenciation se poursuit avec les ALP qui, sous la gouvernance des acteurs E2A/HEB et FOXO1 génèrent des BLP (BLP – *B-cell-biased Lymphoid Progenitors*). Ces BLP sous l’effet de E2A, FOXO1, EBF1 et Pax5 conduisent à la genèse de la cellule Pro-B (Murre C., 2018)

**(Figure 34).**



**Figure 34 : Schéma représentant le diagramme des principaux acteurs transcriptionnels et cellulaires au cours de l’hématopoïèse.**

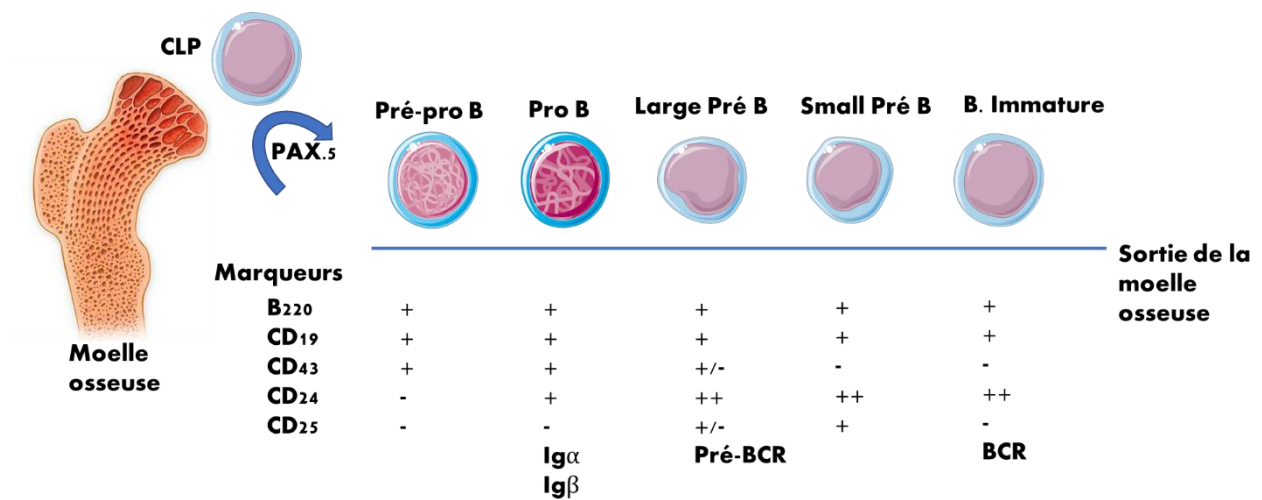
Sur ce schéma sont présentés les principaux acteurs cellulaires et moléculaires impliqués dans l’hématopoïèse. Elle début avec les LT-HSC qui donnent les MPP. Ces MPP sont en mesure via E2A, Ikaros et PU.1 de donner des LMPP (Progéniteurs Lymphoïdes Multipotents) ou bien des GMP (Progéniteurs de Macrophages/Granulocytes). Les GMP peuvent aussi être obtenus via les LMPP en présence de PU.1, Ikaros et E2A. Les GMP peuvent se diviser en deux sous populations : les neutrophiles (NEU) et les macrophages (MAC). A partir des GMP, les neutrophiles sont obtenus via PU.1, GR1 et C/EBP. Les macrophages, quant à eux, peuvent être obtenus avec l’expression de PU.1, C/EBPa et Egr. Les LMPP peuvent également se différencier en ALP (All Lymphoïds Progenitors) sous l’action de PU.1, Ikaros et E2A. Ces ALP sous l’effet de E2A, HEB et FOXO1 vont se différencier en BLP (B-Cell-Biased Lymphoid progenitors). Ces BLP sous l’effet de E2A, FOXO1, Ebf1 et Pax5 deviennent des cellules ProB. Enfin, les LMPP peuvent donner des précurseurs des cellules T (ETP). Ces ETP sous l’effet de différents acteurs

*moléculaires donneront les lymphocytes T DN (Double Négatif) (CD4<sup>-</sup>/CD8<sup>-</sup>) puis les LT DP (Double Positif) (CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>). (D'après l'étude de Murre C., 2018).*

L'un des premiers marqueurs associés aux progéniteurs des cellules B est le marqueur B220. Il est souvent utilisé pour caractériser l'engagement au sein de la lignée B chez la souris. C'est une forme fortement glycosylée de la protéine CD45 (CD45R).

#### *IV-2-B : Suite de la différenciation de la lignée B dans la moelle osseuse*

Dans la moelle osseuse, l'engagement dans la lignée lymphocytaire B va conduire à la production séquentielle d'un élément fondamental pour la future cellule B : le BCR. Les cellules B constituent une partie essentielle de la réponse immunitaire adaptative par l'intermédiaire de ce récepteur exprimé à leur surface. Chaque clone de cellule B exprime un BCR différent qui lui permet de reconnaître des modèles moléculaires très variés. La formation du BCR ainsi que ses différentes étapes intermédiaires de formation (Pré-BCR) sont autant de points de contrôle qui permettent une régulation fine des clones auto-réactifs. Lors de son développement, la cellule B va passer par différents stades de différenciation (**Figure 35**), allant du stade Pro-B jusqu'au stade de cellule B immature. Chaque stade cellulaire à son importance (Pro-B ; Pré-B et les stades intermédiaires – **Figure 35**) puisque qu'ils sont liés à des modifications dans les gènes des Igs et à la formation du Pré-BCR. Nous allons, lors des points suivants, suivre ces étapes cruciales dans la différenciation depuis le stade Pro-B jusqu'au stade de lymphocyte B immature.

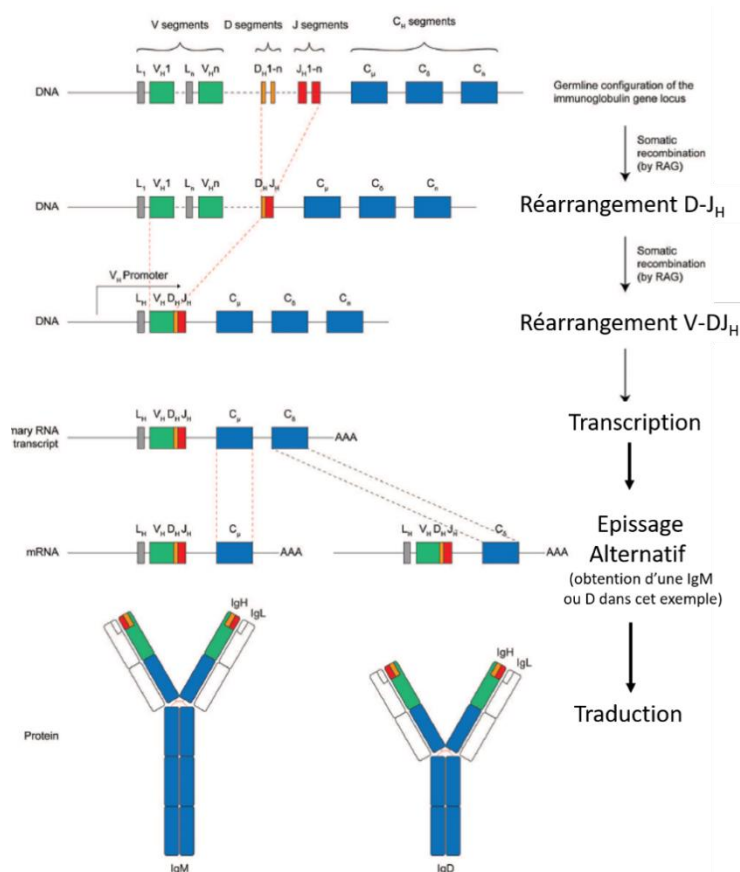


**Figure 35 : Schéma représentant les principales étapes de développement des lymphocytes B dans la moelle osseuse associées aux principaux marqueurs de surface murins puis la sortie du LB immature de la moelle osseuse vers la rate où il pourra poursuivre sa différenciation et sa maturation.**

Le développement précoce des cellules B a lieu dans la moelle osseuse. Après différentes étapes de différenciation, la suite du développement passe par des étapes de recombinaisons génétiques et la production d'un pré-BCR puis d'un BCR mature. Par la suite, ces cellules B immatures migrent vers la rate (spleen), où la maturation se poursuit. La formation d'un pré-BCR constitue le premier point de contrôle majeur limitant l'auto-immunité pendant le développement des cellules B. La production d'un BCR fonctionnel, constitue le second point de contrôle majeur.

Au cours de la trentaine d'années qui a suivi la découverte des recombinaisons VDJ par Susumu Tonegawa (Hozumin N et Tonegawa S., 1976), le séquençage moléculaire a été largement appliqué à l'étude des BCR afin de mieux comprendre leur processus de synthèse et l'extraordinaire diversité de leur paratope. Les réarrangements produits entre les différents segments VDJ étant générés de manière stochastique, ceci explique la grande diversité des Igs qu'il est possible d'obtenir. Ce processus est en partie dû aux phénomènes de diversité combinatoire et jonctionnelle (Melchers *et al.*, 2015). Les séquences des BCR sont créées grâce aux recombinaisons de segments de gènes qui permettent, dans les stades précoces de

différenciation, la constitution initiale des deux chaînes lourdes (Recombinaisons VDJ<sub>H</sub>) puis l'association avec une chaîne légère de substitution. La première étape de construction débute avec la recombinaison de segments de gènes codant les chaînes lourdes. Cette étape a lieu au stade Pro-B. Les segments des gènes du locus des chaînes lourdes sont constitués de différents segments. Il y a le segment V pour variable, le D pour diversité, le J pour jonction et le C pour Constant. Les *figures 36 et 37* ci-dessous résument les premiers réarrangements qui s'opèrent aux stades Pro-B précoce et Pro-B tardif. Les mécanismes complexes de la recombinaison et des réarrangements sont rendus possibles grâce à l'organisation et la structure particulière des segments de gènes mais aussi grâce à la présence d'enzymes spécifiques telles que Rag 1 et Rag 2 (*figure 37 - C*) ainsi que le système NHEJ (NHEJ – *Non Homologous End-joining*) (*figure 37 - C*) qui permet d'assurer la cohésion des segments sélectionnés (Kim *et al.*, 2015, Backhaus O., 2018). Il faut souligner que ces mécanismes de recombinaison se font grâce à l'insertion aléatoire de nucléotides qui permettent d'augmenter la diversité des séquences géniques qui seront ensuite traduites pour obtenir une Ig fonctionnelle (*Figure 36*).

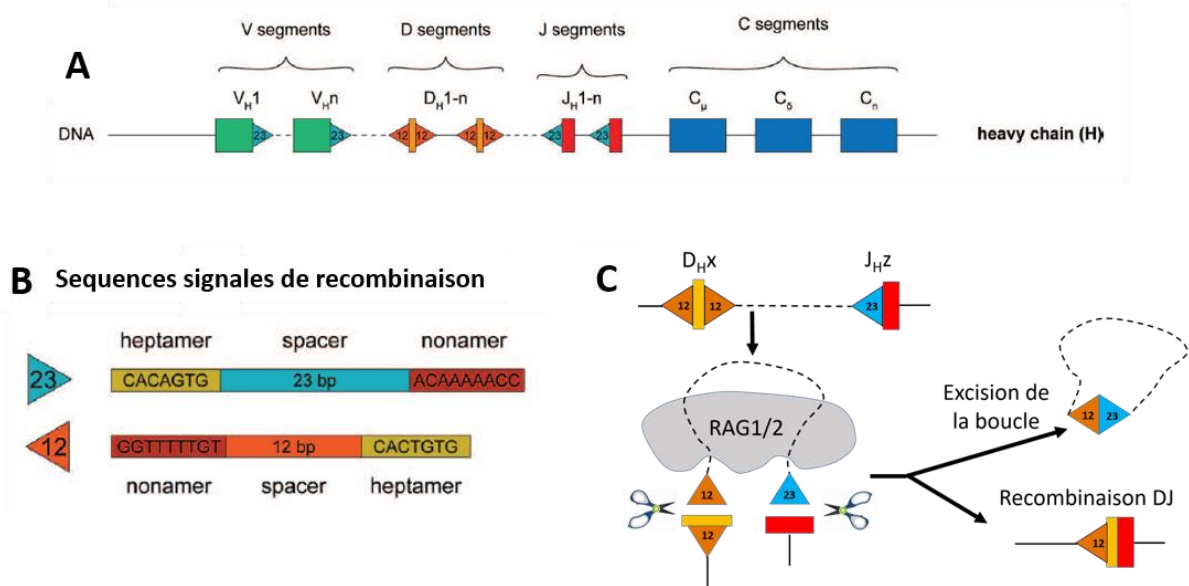


**Figure 36 : Représentation schématique de la recombinaison V(D)J de la chaîne lourde (IgH) à partir de segments de gènes de la lignée germinale.**

Le locus de cette chaîne d'immunoglobuline est organisé en segments de gènes : segment de gène variable (V), de diversité (D), de jonction (J) et de gènes constant (C). La région variable (V) comprenant les segments des gènes V, D et J est générée par la recombinaison aléatoire de ces séquences. (Figure modifiée et adaptée d'après l'étude de Backhaus O., 2018).



De part et d'autre des exons V, D et J, existe des séquences uniques appelées les séquences signal de recombinaison ou RSS (RSS – *Recombination Signal Sequence*), qui fonctionnent par recombinaison. Chaque séquence RSS est constitué d'un nonamère ou d'un heptamère conservé qui sont séparés par 12 ou 23 paires de bases (pb) comme illustré dans la **figure 37 B**. Ces phénomènes de recombinaison sont catalysés par les enzymes Rag-1/Rag-2 (Backhaus O., 2018).



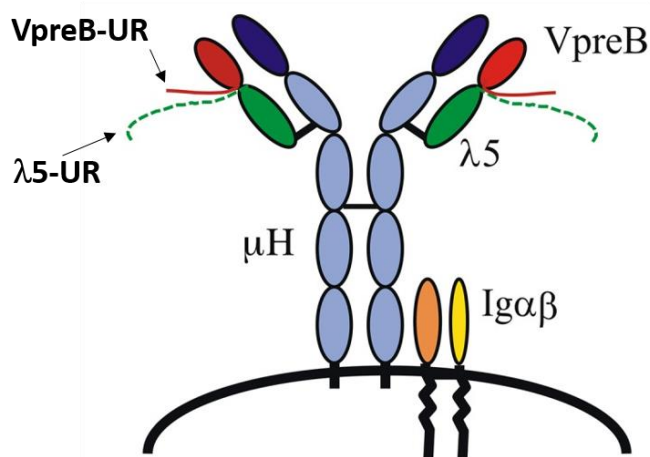
**Figure 37 : représentation schématique des positions et structures des séquences de signal de recombinaison (RSS – *Recombinase Signal Sequence*) au niveau des segments des gènes V, D et J et des séquences C des chaînes lourdes.**

**(A).** Représentation schématique de la position et de l'orientation des différentes recombinaisons des segments V (variable), D (diversité) et J (jonction) du gène de la chaîne lourde (HC). **(B)** Séquences nucléotidiques conservées entre deux séquences de RSS. Chaque séquence RSS est composée d'un heptamère et d'un nonamère conservés et englobant une séquence espaceur. Il existe deux RSS différents, qui ont soit un espaceur de 12 paires de bases, soit un espaceur de 23 paires de bases. **(C)** Le gène activant la recombinaison (Rag1/Rag2) de la région V (ici illustré avec le domaine variable de la chaîne lourde) est médiée de manière guidée par des séquences de signaux recombinés (RSS). Le complexe Rag1/Rag2 lie toujours un espaceur RSS de 23 pb à un espaceur RSS de 12 pb et assure ensuite la médiation du clivage de l'ADN. La séquence entre les gènes choisis est excisée et éliminée. Le processus décrit s'appelle la jonction par délétion et se produit lorsque les deux segments de gènes à fusionner sont dans la même orientation transcriptionnelle. (Figure modifiée et adaptée d'après l'étude de Backhaus O., 2018).

Ensuite, les réarrangements D-J<sub>H</sub> ont lieu presque simultanément sur les deux allèles du gène au stade Pro-B précoce et les réarrangements V-DJ<sub>H</sub> apparaissent au stade Pro-B tardif. Contrairement aux réarrangement DJ<sub>H</sub>, les réarrangements V-DJ<sub>H</sub> ne se font pas simultanément mais de façon séquentielle. Ils vont d'abord commencer sur un allèle, puis, si le réarrangement n'est pas productif, il se fera sur l'autre allèle : c'est le principe de l'exclusion allélique (Corcoran., *et al* 2005). Si aucun des deux réarrangements opérés sur les deux allèles n'aboutit, la cellule est alors éliminée par apoptose. Ces réarrangements séquentiels permettent à la cellule d'exprimer une chaîne lourde monospécifique et participe à l'élimination des cellules non conformes. Ce principe d'exclusion allélique est aussi valable dans le remaniement des chaînes légères que nous discuterons plus tard dans cette introduction. L'expression de la chaîne lourde  $\mu$  est concomitante avec l'engagement de la cellule dans le stade Pré-B grande cellule (*Large Pre-B cell*). Le stade Pré-B grande cellule permet la mise en place du pré-BCR.

#### *IV-2-C : Suite du développement : l'acquisition du pré-récepteur de la cellule B (Pre-BCR)*

D'un point de vue structural, le pré-BCR est composé de deux chaînes lourdes Ig $\mu$  et de deux pseudo-chaînes légères (SLC – *Surrogate Light Chain*). Contrairement aux chaînes légères classiques, la pseudo-chaîne légère est un hétérodimère composé des éléments  $\lambda 5$  et VpréB1 ou 2. Le segment VpréB mime un domaine variable, tandis que  $\lambda 5$  mime un domaine constant. L'assemblage de ces chaînes légères avec la chaîne lourde permet son adressage à la surface cellulaire et son association avec l'hétérodimère Ig $\alpha$  (CD79a)/Ig $\beta$ (CD79) préalablement synthétisé (**Figure 38**). C'est cet ensemble intégré à la membrane qui constitue le Pré-BCR fonctionnel (Mårtensson *et al.*, 2007 ; Herzog *et al.*, 2009 ; Nemazee *et al.*, 2017., Winkler et Mårtensson., 2018).



**Figure 38 : Schéma représentant la structure moléculaire du pré-BCR.**

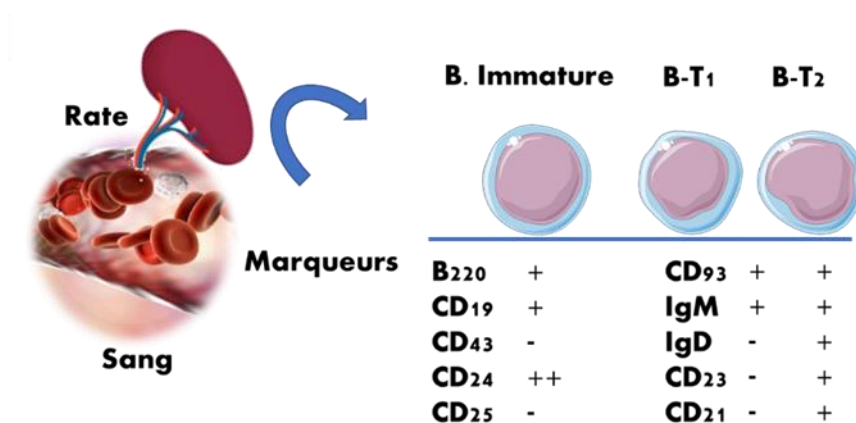
Le pré-BCR est assemblé à partir de la chaîne  $\mu H$  et des chaînes légères de substitution ainsi que les molécules de signalisation  $Ig\alpha$  et  $Ig\beta$ . La SLC (Surrogate Light chain) est composée des éléments  $VpreB$  (1 ou 2) et  $\lambda 5$ . Des régions particulières et uniques ( $VpreB-UR$  et  $\lambda 5-UR$ ) constituées d'acides aminés chargés confèrent à la SLC

des propriétés particulières. Le pré-BCR est un élément clé dans le développement du lymphocyte B. (D'après l'étude de Winkler et Mårtensson, 2018).

Les gènes  $VpreB$  et  $\lambda 5$  codent pour la chaîne SLC et forment un complexe avec les chaînes  $\mu H$ . Si la cellule pré-B génère un pré-BCR fonctionnel, ce dernier va permettre la prolifération et le réarrangement des  $Ig\lambda$  ou  $\kappa$  des chaînes légères. La signalisation du pré-BCR conduit ensuite progressivement à une baisse de l'expression des gènes codant pour  $\lambda 5$ . De ce fait, un rétrocontrôle négatif est exercé par le pré-BCR sur sa propre expression. Au fur et à mesure, le pré-BCR ne pourra plus être exprimé et cessera sa signalisation permettant alors aux cellules pré-B de réexprimer leurs enzymes Rag-1 et Rag-2 (sous régulées par la signalisation du Pré-BCR) permettant ainsi d'initier le réarrangement des chaînes légères définitives (Winkler et Mårtensson, 2018). La construction des chaînes légères débute au stade « petite cellule B ou « *Small pre-B Cell* ». Chez la souris, les réarrangements des chaînes légères commencent en général par le locus *kappa* (Mårtensson et al., 2010). Les enzymes Rag1 et Rag 2 réactivées avec l'éluion du Pré-BCR vont permettent ces réarrangements. A l'instar de ce que nous avons décrit pour les chaînes lourdes, le réarrangement a d'abord lieu sur un allèle puis sur le second allèle si jamais le réarrangement sur le premier allèle ne s'avère pas productif. Si les deux réarrangements s'avèrent non productifs, le locus lambda des chaînes légères est alors sollicité. Dans le cas où aucun des réarrangements évoqués ci-dessus (*kappa* et *lambda*) n'est efficace, la cellule B meurt par apoptose, permettant une nouvelle régulation (Herzog et al., 2009., Nemazee et al., 2017). La suite du processus dans la moelle osseuse permet la genèse d'un lymphocyte B immature présentant à sa surface un BCR.

### IV-3 : Lymphocytes B transitionnels : passage vers les organes lymphoïdes secondaires

Le stade de lymphocyte B immature atteint, la cellule va quitter la moelle osseuse et acquérir de nouvelles caractéristiques. Pendant leur migration vers la périphérie, les cellules immatures vont passer par un stade dit « transitionnel ». Le lymphocyte B transitionnel est central dans le processus de maturation des lymphocytes B puisque c'est durant ce stade qu'il va perdre sa sensibilité pour la sélection négative de son BCR et qu'il va acquérir sa sensibilité par rapport aux lymphocytes T et à leurs signaux (Chung *et al.*, 2003). Il existe trois sous types de lymphocytes B transitionnels : le type 1, le type 2 et le type 3, le type 3 étant beaucoup moins décrit dans la littérature, nous n'en parlerons pas ici (**Figure 39**).



**Figure 39 : Cellules B immatures transitionnelles murines : de la sortie de la moelle osseuse à la rate associées à leurs marqueurs de surface.**

*Au départ de son développement, le lymphocyte B passe par les stades Pro-B et pré-B puis devient un lymphocyte B immature. A la suite de cela, il va quitter la moelle osseuse pour regagner les organes lymphoïdes périphériques (rate). Lors de cette migration, il passe dans la circulation sanguine.*

Nous allons ici présenter les principaux types (T1 et T2) pour lesquels leurs caractérisation et implication physiologiques semblent univoques. Chez la souris, le stade T1 est décrit dès que le LB immature quitte la moelle osseuse et se retrouve dans le compartiment sanguin avant d'atteindre la rate (Borhis et Richard., 2015).

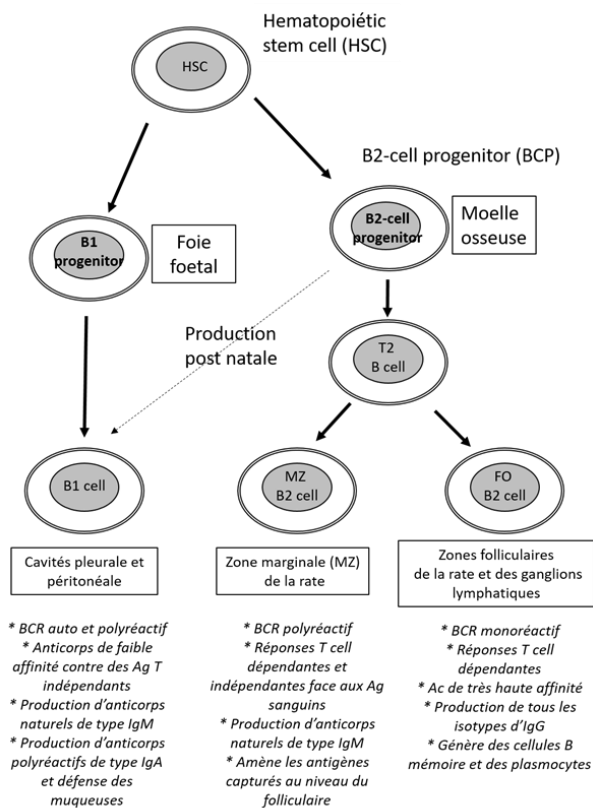
#### Les cellules transitionnelles T1 et T2

Les cellules transitionnelles représentent 10 à 15 % des cellules spléniques murines.

Leur durée de vie s'étend de 3 à 4 jours, le temps nécessaire pour qu'elles atteignent leur maturation en cellule naïve (Su *et al.*, 2004). Une fois arrivé dans la rate, le lymphocyte B transitionnel est de type 1. Il peut être identifié via les marqueurs de surface CD93<sup>+</sup>, IgM<sup>high</sup>, IgD<sup>low</sup>, CD21<sup>low</sup>, CD23<sup>-</sup> (Chung *et al.*, 2003). Ils sont localisés au niveau de la zone marginale (MZ), située entre la zone périfolliculaire et la zone du manteau, composant toutes trois la zone des lymphocytes B (Borhis et Richard., 2015). Ces cellules vont subir une forte sélection. En effet, si elles reconnaissent des antigènes du soi, elles seront directement éliminées par apoptose (su *et al.*, 2004 ; Limnander *et al.*, 2014). Ce n'est qu'une fois cette étape cruciale de sélection passée que ces lymphocytes T1 vont migrer du sang vers la zone marginale de la rate et passer au stade T2 (Borhis et Richard., 2015). Le LT2 est identifiable via les marqueurs de surface CD93<sup>+</sup>, IgM<sup>high</sup>, IgD<sup>high</sup>, CD21<sup>low</sup>, CD23<sup>high</sup> (Chung *et al.*, 2003).

#### *IV-4 : Différenciation et maturation des cellules B : les sous types B1 et B2*

Deux grandes sous populations de lymphocytes B peuvent être distinguées : la population B1 et la population B2. Les Lymphocytes B1 sont dits « non conventionnels » tandis que les B2 sont dits « conventionnels. Après les étapes de maturation dans la moelle osseuse, trois principales classes de lymphocytes B peuvent être identifiées chez la souris et l'humain. Leur caractérisation est réalisée selon des critères développementaux et sur la base de leur localisation anatomique voire de leurs fonctions. Ainsi, selon Hoffman et ses collaborateurs en 2016, les LB peuvent être schématiquement subdivisés en lymphocytes B1, lymphocytes B2 de la ZM et en lymphocytes de la FO (**Figure 40**).



**Figure 40 : Schéma représentant les lignées (B1 et B2) et leurs fonctions associées.**

Tous les lymphocytes B sont issus des cellules souches hématopoïétiques (HSC). La plupart des lymphocytes B B1 se développent à partir de progéniteurs B1 au sein du foie foetal avec un faible apport de la moelle osseuse au-delà de la période périnatale (flèche pointillée). Les lymphocytes B B2 se développent à partir de cellules B transitionnelles de type 2 (T2) dérivées de progéniteurs de cellules B issus de la moelle osseuse, avec une différenciation ultérieure en cellules de la zone marginale (MZ) et en cellule de la zone folliculaire (FO) ; ces phénomènes se produisant dans la rate. (Schéma modifié et adapté de la publication de Hoffman et al., 2016).

#### IV-4-A : Les lymphocytes B1

La population des cellules B1 est subdivisée en deux types : le type B1-a et le type B1-b. La cellule B1-a est caractérisée par l'expression du marqueur CD5<sup>+</sup> contrairement à la cellule B1-b qui ne l'exprime pas (CD5<sup>-</sup>). Chez les mammifères, les lymphocytes B1 sont retrouvés principalement dans les cavités pleurale et péritonéale, mais aussi dans les organes lymphoïdes secondaires (Cunningham *et al.*, 2013). Contrairement aux autres types de lymphocytes B dits « conventionnels » (B2), ils ne sont pas uniquement issus de la moelle osseuse mais proviennent aussi et en grande majorité du foie foetal (Wong *et al.*, 2019 ; Cunningham *et al.*, 2013). Les deux sous types de lymphocytes B1 présentent des différences à la fois au niveau de leurs marqueurs de surface mais également au niveau de leur propriétés (Sagaert and De Wolf-Peeters., 2003 ; Ghosn *et al.*, 2011). Ainsi, chez la souris, les lymphocytes B1 peuvent être distingués par les marqueurs B220<sup>low</sup>, IgM<sup>high</sup>, IgD<sup>low</sup>, CD23<sup>neg</sup> (Cunningham *et al.*, 2014). Les cellules B1 possèdent différentes fonctions comme la phagocytose, la présentation d'antigène, la sécrétion de cytokines modulant la réponse immunitaire ou encore

l'implication dans des réponses de type thymo-indépendante (Gao *et al.*, 2012). La principale caractéristique des lymphocytes B-1 a et b est leur capacité à produire des anticorps dits poly-réactifs naturels (NAbs : *Natural Antibodies*) qui sont de faible affinité pour un antigène (Avrameas S., 1991 ; Baumgart N., 2017 ; Yam-Puc *et al.*, 2018). Les NAbs jouent un rôle crucial dans l'immunité innée et leur absence augmentent la susceptibilité aux infections microbiennes (Ochsenbein *et al.*, 1999 ; Sagaert et De Wolf-Peeters., 2003 ; Yam-Puc *et al.*, 2018). Il est important de souligner que des augmentations anormales des taux de cellules B1 sont rapportés dans des modèles murins de désordres auto-immuns et chez les patients souffrant de maladies auto-immunes tel que le Lupus érythémateux systémique (Hoffman *et al.*, 2016). De plus, contrairement aux cellules B2 et aux cellules T pour lesquelles l'auto-réactivité est neutralisée par la sélection positive et/ou négative, les cellules B1 sont sélectionnées pour leur auto-réactivité (Wang *et al.*, 2019).

#### *IV-4-A-a : Les lymphocytes B1-a*

Les cellules B1a-CD5<sup>+</sup>, sont des cellules B présentant une longue durée de vie. Ces cellules représentent une petite fraction des cellules sanguines à l'âge adulte. Leur fréquence est réduite à mesure que les souris vieillissent (de 30% dans la rate 5 jours après la naissance à environ 1 à 2% 8 semaines post natal). Les cellules B-1a étant présentes très précocement lors du développement, elles vont agir comme première ligne de défense contre divers pathogènes bactériens ou viraux.

#### *IV-4-A-b : Les lymphocytes B1-b*

Ces cellules peuvent être identifiées par l'absence du marqueur de surface CD5. Tout comme les cellules B1-a, elles sont en mesure de sécréter des anticorps contre des antigènes du soi. Néanmoins, elles présentent des différences avec les cellules B1-a, par l'intermédiaire d'une plus grande diversité jonctionnelle qui leur confère la propriété de reconnaître un plus large répertoire d'antigène (Vale *et al.*, 2010). Au niveau antigénique, les cellules B1-b reconnaissent des antigènes de type bactérien et sont centrales dans les processus d'immunisation, notamment vaccinal. Les exemples d'antigènes reconnus par les cellules B1b incluent le polysaccharide pneumococcique et l'antigène Vi de Salmonella Typhi. Ces deux antigènes étant régulièrement utilisés dans les protocoles de vaccination. Les antigènes reconnus par les



cellules B1b peuvent être de nature protéique ou non protéique. A l'instar des B1a, ils agissent de manière thymo-indépendante (Cunningham *et al.*, 2014).

#### *IV-4-B : Les lymphocytes B2*

Les lymphocytes B2 se regroupent en deux sous populations : les cellules B de la zone marginale (ZM) et ceux de la zone folliculaire (FO).

##### *IV-4-B-a : Les lymphocytes B2 de la zone marginale*

Cette population représente 5 à 10 % des cellules B spléniques. Elles colonisent la ZM de la rate à l'interface entre les deux pulpes (Yam-Puc *et al.*, 2018 ; Zouali et Richard., 2011).

Les lymphocytes B murins de la ZM possèdent les marqueurs de surface CD21<sup>high</sup>, IgD<sup>low</sup>, CD1d<sup>high</sup>, CD23<sup>low</sup> et le marqueur CD35 (Hoffman *et al.*, 2016). Leurs BCR présentent une polyréactivité leur conférant la possibilité de reconnaître un large éventail d'antigènes de types 1 et 2 (Martin et Kearney., 2002 ; Pillai *et al.*, 2005 ; Borhis et Richard. 2015 ; Hoffman *et al.*, 2016). Ces cellules sont impliquées dans des réponses Thymo-Indépendantes de type 1 (TI-1) et 2 (TI-2). Les antigènes TI-1 sont plus hétérogènes que ceux de type 2. Les antigènes TI-1 incluent des lipopolysaccharides, des lipopeptides, des ARN viraux ou bien encore certaines protéines composant l'enveloppe virale. Les antigènes TI-1 vont activer le lymphocyte B de la ZM via son BCR et ses TLRs (*Toll-Like Receptor*) de manière synergique conduisant en une rapide différenciation en plasmocytes (Borhis et Richard., 2015 ; Hoffman *et al.*, 2016). Les antigènes de TI-2 sont constitués de polysaccharides de capsules bactériennes tels que ceux retrouvés chez *S. pneumoniae*, *S. meningitidis* ou encore *H. influenza*. Ces antigènes peuvent aussi constituer certains motifs répétés retrouvés au niveau des capsides virales. La prise en charge de ces antigènes par les cellules B ZM va rapidement conduire à une différenciation en plasmocytes à courte durée de vie, extra-folliculaires, produisant principalement des Igs de type M (Martin *et al.*, 2001 ; Cerutti *et al.*, 2013). Ces cellules ont la capacité de répondre plus rapidement que les cellules B folliculaires à la présence d'antigènes étrangers leur conférant une efficacité dans la mise en place de réponses immunitaires précoces (Zouali *et al.*, 2009 ; Zouali et Richard., 2011).

#### *IV-4-B-b : Les lymphocytes B2 de la zone folliculaire*

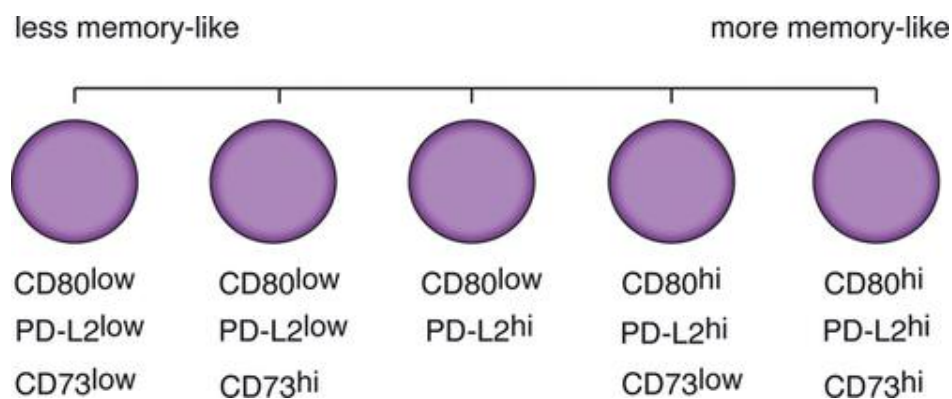
Les lymphocytes B folliculaires (B FO) sont principalement retrouvés au sein des follicules primaires spléniques mais également dans le sang, les autres organes lymphoïdes secondaires tels que les ganglions lymphatiques (Vale et al., 2015 ; Yam-Puc *et al.*, 2018). Ces cellules peuvent être distinguées chez la souris grâce aux marqueurs  $IgD^{hi} IgM^{+} CD27^{-} CD21^{int}$ ,  $B220^{+}$ ,  $CD23^{high}$  (Pillai et Cariappa., 2009). Ces cellules sont spécialisées dans des réponses adaptatives et reconnaissent majoritairement des motifs protéiques au sein de la MZ (Borhis et Richard. 2015). Les cellules B FO, acteurs de l'immunité adaptative, sont principalement impliquées dans les interactions avec les lymphocytes T  $CD4^{+}$  qui permettent d'initier les réponses de type thymo-dépendante (TD). Cette réponse TD va permettre de générer deux types de cellules à partir du lymphocyte FO naïf que sont les cellules B mémoires et les plasmocytes dits « longue vie » producteurs d'IgG de très haute affinité. Cette activation va nécessiter en amont pour la cellule B FO, une activation. Grâce à différents gradients cytokiniques, les lymphocytes B FO vont pouvoir migrer par chemo-attraction des zones folliculaires jusqu'au niveau de la bordure lymphocyte T/lymphocyte B et commencer l'élaboration d'une structure clé dans la réponse immunitaire adaptative : le centre germinatif. La cellule B activée par un antigène dans le cadre d'une réponse thymo-dépendante va rentrer en prolifération et permettre la formation d'un CG. Le but du CG va d'être d'augmenter le nombre de lymphocytes B spécifiques pour un antigène donné pour, *in fine*, ne garder que les cellules les plus affines (Borhis et Richard., 2015 ; Yam-Puc *et al.*, 2018). A la suite des étapes initiées dans ce CG, deux grandes populations de l'immunité à médiation humorale vont être générées : les lymphocytes B et les plasmocytes, toutes deux cruciales dans la mise en place de pathologie auto-immune.

#### *IV-5 : Lymphocytes B mémoire et plasmocyte*

##### *IV-5-A : Les lymphocytes B mémoires*

Cette population, chez l'humain, peut être mise en évidence via le cluster de différenciation  $CD27^{+}$ . Chez la souris, la seule caractérisation du LB mémoire ne peut se restreindre à l'expression du marqueur  $CD27$ . Le manque de marqueur précis pour l'étude de la lignée B mémoire murine est un obstacle à la compréhension claire de ce type cellulaire

ainsi que de ses implications. Certains auteurs se proposent de ne pas distinguer un type unique de cellule B mémoire murine, mais plusieurs sous types, présentant chacun des marqueurs et des affinité différentes. L'équipe de Tomayko et collaborateurs propose de distinguer cinq sous types de cellules B mémoires murins via les marqueurs PD-L2 (CD273), CD80 et CD73. Ces marqueurs permettent de définir cinq sous-ensembles phénotypiquement différents de cellules B mémoires issues d'un lymphocyte B naïf activé dans le cadre d'une réponse de type TD (Tomayko *et al.*, 2010). Les sous-ensembles de LB mémoires définis par les marqueurs PD-L2, CD80 et CD73 sont biologiquement distincts les uns des autres. Ils diffèrent entre eux car ils n'ont pas subi des étapes de développement et de sélection similaires. Ce spectre de cellules mémoires comprend des cellules caractérisées par un « faible » potentiel de cellule B mémoire et d'autre par un « fort » potentiel de cellule B mémoire (*figure 41*). D'autres marqueurs chez la souris sont aussi mis en jeu, tel que les marqueurs CD86, CD95, CD62L, FcRH4 (Tomayko et Allman., 2020).



**Figure 41 : Les cinq sous types de cellules B mémoires murines**

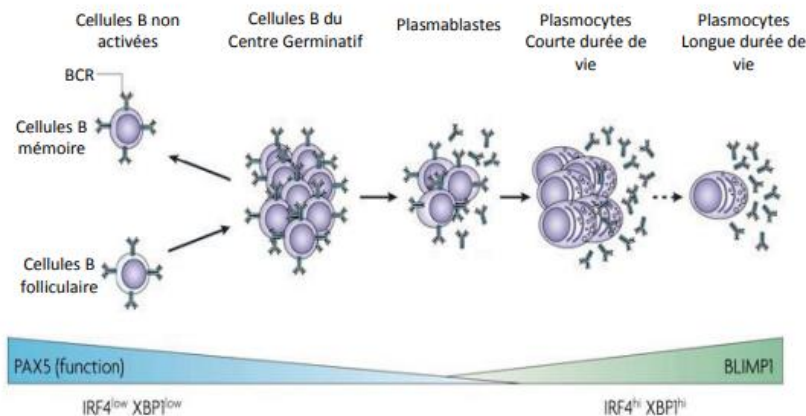
*Cinq sous-ensembles de cellules mémoires B. Ceux-ci sont définis par les marqueurs CD80, PD-L2 et CD73. Ces marqueurs, en fonction de leur niveau d'expression, permettent de définir cinq sous types de lymphocytes B mémoires, allant du « fort potentiel mémoire » (à droite du schéma – « more memory like ») au « faible potentiel mémoire » (à gauche du schéma - less memory-like) (D'après l'étude de Bergmann *et al.*, 2013).*

#### *IV-5-B : Les plasmocytes*

Le plasmocyte représente le stade ultime de la différenciation des lymphocytes B. Ce type cellulaire a été décrit pour la première fois par l'anatomiste allemand HH von Hartz-Waldeyer en 1875 (O'Connell *et al.*, 2004 ; Ribatti D., 2017). Chez la souris, les plasmocytes longue durée de vie peuvent être distingués via les marqueurs de surface CD138 (Syndecan-1), CD93, CD44, VLA-4, IL6-R, BCMA et CXCR4. Parmi ceux-ci, le marqueur CD138 est classiquement utilisé pour distinguer les plasmocytes à longue durée de vie des autres cellules de la lignée B présentes au sein de la moelle osseuse (Brynjolfsson *et al.*, 2018).

#### *IV-5-B-a : Les acteurs moléculaires au cœur de la formation du plasmocyte*

Lors de sa formation, le plasmocyte va progressivement perdre les caractéristiques du lymphocyte B pour devenir un type cellulaire à part entière. Il n'exprime par exemple plus les marqueurs de surface tels que le CD19 ou encore le B220. Cette perte d'expression progressive est causée par un changement dans la balance transcriptionnelle en faveur d'une baisse progressive du FT Pax5, et une augmentation du FT Blimp-1, ces deux facteurs s'excluant mutuellement. En parallèle de cela, l'induction et l'augmentation du FT Blimp1 permet un engagement stable et robuste dans la lignée plasmocytaire. Blimp1 est considéré comme « LE » FT clé du plasmocyte. Blimp-1 est sous la dominance de différents FT tels que IRF4, XBP1 ou encore, pour ne citer qu'elles, les IL2 ; IL6 et IL21 (**Figure 42**) (Shaffer *et al.*, 2000 ; Tunyaplin *et al.*, 2004 ; Cattoretti *et al.*, 2006 ; Klein *et al.*, 2006 ; D'Souza L, Deepta DR.,2019). La présence de Blimp1 est essentielle pour l'établissement du plasmocyte mature et pour la sécrétion d'Ig qui lui est associée (Shapiro-Shelef *et al.*, 2005).



**Figure 42 : Les différents stades cellulaires allant du lymphocyte B au plasmocyte.**

Les cellules B folliculaires activées vont permettre la formation des centres germinatifs. A la suite des différentes étapes établies par le LB dans CG, ce dernier va pouvoir se différencier en LB mémoire ou bien en plasmablaste. Le plasmablaste se différencie en plasmocyte à courte durée de vie, ou bien à longue durée de vie. Tout au long de cette différenciation, l'expression du FT Pax5 diminue, avec en parallèle une augmentation des acteurs XBP1 et Blimp1 (D'après l'étude de Kallies et al., 2007).

Cette capacité du plasmocyte à générer un type de plasmocyte courte vie ou longue vie va notamment être influencée par la nature de l'antigène, l'environnement et les sous populations de lymphocytes B. En effet, les plasmocytes peuvent dériver des lymphocytes B folliculaires (FO), des lymphocytes de la zone marginale (ZM) ou encore des lymphocytes B1 (Nutt et al., 2015). Le plasmocyte est la cellule clé de l'immunité à médiation humorale. Qu'elle présente une vie courte ou longue, elle va, via la sécrétion d'Ig spécifique, être au centre des mécanismes de défense contre un pathogène.

#### IV-5-B-b : Les différentes populations plasmocytaires

Dans le cadre des réponses médiées ou non par les lymphocytes T, les plasmocytes issus de ces réactions ne vont pas présenter les mêmes caractéristiques. Deux grandes populations de plasmocytes sont classiquement décrites et leurs différences est principalement basées sur le caractère thymo-dépendant ou thymo-indépendant de leur formation. Une réponse de type thymo-indépendante permettra la genèse de plasmocyte à courte durée de vie, tandis qu'une réponse thymo-dépendante permettra l'apparition de plasmocyte à longue durée de vie. Un autre critère de distinction important est l'affinité des Igs que ces différents sous type de plasmocyte vont sécréter. Les plasmocytes à courte durée

de vie sécrètent des Igs de moindre affinité que les plasmocytes à longue durée de vie mais aussi de classes différentes.

#### *IV-5-B-b-1 : Les plasmocytes à courte durée de vie*

Les plasmocytes à courte durée de vie sont le produit de l'activation du BCR d'un LB par un Ag ou bien par l'activation du récepteur PRR (PRR - Pattern Recognition Signal) d'un LB qui aura reconnu des motifs ultra-conservés issus de certains pathogènes (Lanzavecchia et Sallusto, 2007). Ces différents processus vont induire une activation du LB qui va rapidement proliférer et se différencier ensuite en plasmocyte à courte durée de vie. Cette population de plasmocyte est retrouvée dans les cavités séreuses telles que la cavité péritonéale mais elle peut aussi se retrouver au niveau de la pulpe rouge de la rate. Elle est issue d'une réponse thymo-indépendante. Cependant, ces plasmocytes peuvent aussi être le résultat d'une réponse thymo-dépendante. En effet, comme nous avons pu le voir lors du chapitre sur le centre germinatif, la genèse de plasmocyte à longue durée de vie est un processus nécessitant un certain délai. Durant ce laps de temps, des plasmocytes à courte durée de vie peuvent être générés de sorte à pallier le manque de plasmocytes à longue durée de vie durant l'intervalle de temps nécessaire à leur formation. Ces plasmocytes de renfort ne sont pas retrouvés au sein des CG mais sont localisés dans les zones extra folliculaires des organes lymphoïdes secondaires et peuvent sécréter des Igs de type M (Smith *et al.*, 1996).

A la suite d'une infection, les plasmocytes à courte durée de vie vont pouvoir migrer *in situ* sur le site inflammatoire notamment grâce à l'action de certaines molécules chemo-attractantes telles que l'IFN gamma qui induisent chez le plasmocyte la production de CXCR3. Au niveau des organes lymphoïdes tertiaires associés aux muqueuses (MALTs) sont surtout retrouvés des plasmocytes à courte durée de vie sécrétant des Igs de type A (Cerutti et Rescigno, 2008).

#### *IV-5-B-b-2 : Les plasmocytes à longue durée de vie*

La seconde grande population de plasmocyte générée est celle présentant une longue durée de vie. Ils sont le fruit d'une réponse thymo-dépendante et sont le produit terminal du centre germinatif. Ils produisent des Igs de très haute affinité pour un Ag donné et vont, à la suite de leur formation, regagner la moelle osseuse dans laquelle ils vont rester quiescents en

attendant une seconde rencontre avec l'antigène (Brynjolfsson *et al.*, 2018). La moelle osseuse et ses niches offrent aux plasmocytes un micro-environnement trophique de choix permettant à ces cellules de survivre sur de longue période (Tangye, 2011). Devant la pluralité de facteurs permettant la survie de ces cellules, nous pouvons citer APRIL ou l'IL-6. Ces deux acteurs sont sécrétés par les cellules stromales de la moelle osseuse mais également par des cellules de la lignée hématopoïétique telles que les éosinophiles ou les mégacaryocytes pour ne citer qu'elles (Winter *et al.*, 2010 ; Chu *et al.*, 2011 ; Chu and Berek, 2012) et offrent aux plasmocytes tous les éléments nécessaires au maintien de leur survie.

## *V - Les points de contrôle de régulation de la cellule B : prévention de l'auto-immunité*

### *V-1 Introduction*

Une condition préalable à la génération de réponses immunitaires efficaces est la diversité et la spécificité du répertoire des anticorps. Cette diversité, préalablement née dans la moelle osseuse, est générée par les recombinaisons aléatoires des segments de gènes des Igs. En outre, la spécificité des anticorps est améliorée en périphérie par les phénomènes d'hypermutations somatiques qui augmentent l'affinité d'un anticorps face à son antigène. Étant donné que la recombinaison V(D)J et les processus d'hypermutations somatiques sont des mécanismes aléatoires, le répertoire d'Ig qui en résulte peut inclure la genèse de cellules B présentant à leur surface un BCR pouvant reconnaître des antigènes du soi. Pour contrer ces erreurs, il existe différents mécanismes permettant une élimination des clones auto-réactifs tout au long du développement du LB.

### *V-1-A La tolérance centrale et périphérique*

C'est au stade immature que les LB vont subir leur premier point de contrôle vis-à-vis de l'auto-réactivité. Cette tolérance centrale des LB permet d'établir une sélection négative, c'est-à-dire que les LB immatures qui réagissent avec des molécules du soi sont éliminés. De ce fait, ils ne peuvent regagner la périphérie et donc poursuivre leur maturation. Cependant, une faible fraction de ces cellules B immatures échappe à ce point de contrôle et arrive à sortir



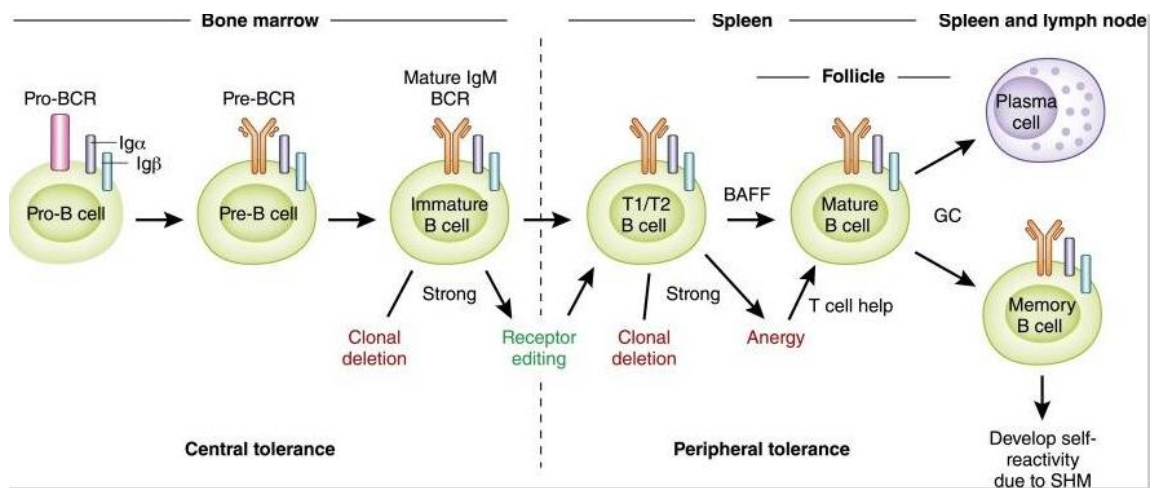
de la moelle pour s'engager vers le stade transitionnel. Chez l'humain, 75% des cellules B immatures sont jugées autoréactives (Wardemann *et al.*, 2003). Les mécanismes de tolérance centrale permettent en théorie d'éliminer, chez l'humain, entre 20 et 50 % de clones auto-réactifs (Cambier *et al.*, 2007). La reconnaissance de l'auto-antigène par le BCR au sein de la moelle osseuse et le seuil des signaux générés, notamment l'avidité avec lesquels les Ags sont reconnus, déterminent la sélection des cellules B immatures pour passer à l'étape supérieure : la cellule B transitoire via une sélection positive de clones ayant des signaux BCR à faible niveau (également appelés « toniques »). Les autres clones, anormaux, avec par exemple, de faibles signaux BCR, ne survivent pas ; et les clones avec des signaux forts signaux sont ciblés pour l'apoptose. Dans la moelle osseuse, deux principaux mécanismes vont être mise en jeu, il s'agit de la délétion clonale (**Figure 43**), aussi connu sous le terme de sélection négative, qui conduit à une élimination par apoptose du clone auto-réactif (Szaflarska *et al.*, 2015 ; Rose *et al.*, 2017 ; Nemazee *et al.*, 2017).

Le deuxième mécanisme, connu sous le nom d'édition de nouveau récepteur (*receptor editing*) est un mécanisme qui offre à la cellule la possibilité d'exprimer un nouveau récepteur non autoréactif (**Figure 43**). L'édition de nouveau récepteur implique des réarrangements secondaires au niveau de gènes des Igs permettant la genèse d'un nouveau récepteur ne reconnaissant pas des Ags du soi. Ces réarrangements secondaires impliquent les mêmes mécanismes que ceux évoqués pour la recombinaison des segments (V(D)J) et sont, de ce fait, sous la dépense des enzymes Rag 1 et Rag 2 (Nemazee D., 2000). Ces réarrangements ont majoritairement lieu sur les locus *kappa* des chaînes légères ( $Ig_{kappa}$ ) via des réarrangements secondaires impliquent les segments V- $J_{kappa}$ . Ces réarrangements V- $J_{kappa}$  peuvent aboutir à un changement productif ou bien non productif (Halverson *et al.*, 2004 ; Rose NR., 2015 ; Hoffman *et al.*, 2016).

Par la suite, des mécanismes de sélection supplémentaires se produisent le long du trajet conduisant vers les organes lymphoïdes secondaires (**Figure 43**). Les cellules B transitoires avec des signaux BCR forts subissent aussi les phénomènes de suppression clonale ou bien des mécanismes induisant chez la cellule un état « d'hypo-réponse », aussi appelé

anergie, en lien avec une survie cellulaire raccourcie (1–5 jours) (Hoffman *et al.*, 2016). Toutefois, ces mécanismes de tolérance peuvent être contournés via, par exemple, des niveaux élevés de BAFF ou bien via l'intervention des lymphocytes T. L'échappement à la tolérance périphérique permet alors à la cellule B autoréactive de regagner le pool de cellules B matures (Meffre et Wardemann., 2008). Les lymphocytes B autoréactifs qui échappent à la suppression clonale, à l'édition des récepteurs ou à l'anergie pourront tout de même être éliminés notamment grâce à la coopération des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> via les interactions Fas récepteur/Fas ligand et les interactions CD40/CD40L. Les cellules autoréactives peuvent en plus être inhibées par les cellules T et les cellules B ayant des propriétés régulatrices (Tregs et Bregs, respectivement) (Rathmell., 1996 ; Hervé et al., 2007). Plus tardivement, durant le développement de la cellule B, les modifications produites au sein des organes lymphoïdes secondaires par les processus d'hypermutations somatiques peuvent eux aussi conduire à la genèse de cellules anormales ; n'oublions pas que les processus d'hypermutations somatiques ont aussi une base stochastique et qu'il existe de ce fait, une probabilité que les réarrangements générés aboutissent à la formation de clones autoréactifs, y compris à ce niveau de différenciation. Ainsi, il est possible que quelques cellules matures issue du CG soient activées contre des Ag du soi : des cellules B mémoires IgG auto-réactives périphériques qui, en cas de seconde stimulation, peuvent aboutir à la production d'AC dirigés contre des ACs du soi (Hoffman *et al.*, 2016).

L'échec dans un de ces points de contrôle, qu'ils soient centraux ou périphérie, peut en partie expliquer la mise en place d'un processus auto-immun (Meffre et Wardemann., 2008).

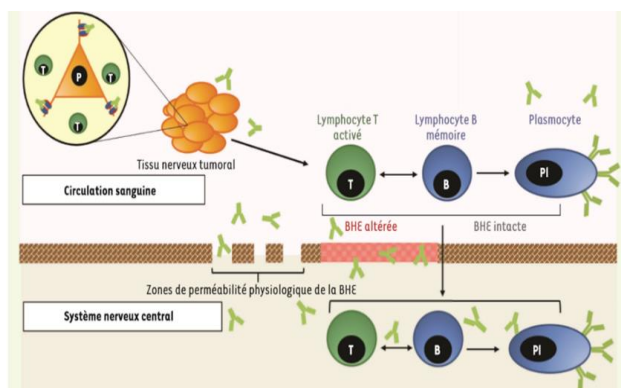


**Figure 43 : Développement des cellules B au sein de la moelle osseuse et mécanismes de tolérance centrale et périphérique.**

Le développement des cellules B dans la moelle osseuse progresse séquentiellement à travers les stades pro-B, pré-B et cellule B immature concomitante avec l'expression de l'IgM de surface, le récepteur mature des cellules B (BCR). Les cellules B immatures présentant une forte réactivité face à un auto-antigène subissent le phénomène de suppression clonale ou alors l'édition de nouveau récepteur. Ces deux mécanismes permettent d'éliminer l'auto-réactivité et permet l'entrée dans le pool transitoire de cellules B. Les cellules B transitoires dépendent du facteur d'activation des cellules B (BAFF) pour survivre et se différencier en cellules B matures dans la rate. Ces cellules B transitoires 1 et 2 (T1/T2) présentant une forte auto-réactivité face à des Ags du soi subissent la suppression clonale ou restent en dehors des follicules spléniques comme cellules B anergiques. Elles peuvent néanmoins être sauvées après avoir reçu l'aide de lymphocyte T pour entrer dans le pool de cellules B matures. Les cellules B matures qui sont activées par l'antigène étranger et entrent dans les réactions du centre germinal (GC) donnent lieu à des cellules B mémoire et des cellules plasmiques. Au cours du processus d'hypermutations somatiques (SHM), quelques cellules B mémoire acquièrent une auto-réactivité due à des réarrangements aléatoires des gènes des immunoglobuline et persistent en tant que clones auto-réactifs d'IgG+ dans la périphérie. (D'après l'étude d'Hoffman et al., 2016).

### V-2 : L'immunité dans l'encéphalite auto-immune à anticorps anti NMDAR : l'hypothèse paranéoplasique

L'histologie des tératomes révèle la présence de tissus neurogliaux ectopiques. L'hypothèse avancée soutient le fait que le tératome, dans la forme paranéoplasique, initie la réponse immunitaire périphérique (Sansing et al., 2007 ; Dalmau et al., 2007 ; Tüzün et al., 2009 ; Moscato et al., 2010) (Figure 44).



**Figure 44 : Physiopathologie et réponse immunitaire de la forme paranéoplasique.**

*La présence d'un tératome va induire une réaction immunitaire contre le tissu nerveux composant la tumeur. Les acteurs immunitaires impliqués dans cette réponse immunitaire vont être de plusieurs types et les principaux sont les lymphocytes T (T), les lymphocytes B (B) qui peuvent coopérer dans la mise en place de la réponse. Puis, une fois les lymphocytes B activés, ils vont pouvoir se différencier en plasmocytes (Pl), qui vont pouvoir sécréter des IgG spécifiques contre le NMDAR et initier la mise en place de la pathologie. Les immunoglobulines produites en périphérie peuvent traverser la barrière hémato-encéphalique à travers des zones de cette dernière qui sont physiologiquement perméable ou bien passer au niveau de zone rompue de manière pathologique (Schéma adapté de le Guen et al., 2015).*

Du fait de la présence de la sous unité GluN1 du NMDAR au sein du tissu nerveux ectopique et de la rapide guérison des patients suivant l'exérèse tumorale, l'hypothèse a été émise que la tumeur pouvait être la cible d'une réaction auto-immune croisée chez ces patients (Dalmau et al., 2007 ; Dalmau et al., 2008 ; Dalmau et al., 2011). Day et collaborateurs en 2014 se sont proposés de caractériser l'organisation des tissus neuronaux issus des patients atteints par la maladie (groupe patients EAI) et de les comparer à des tératomes isolés n'induisant aucun trouble neurologique auto-immun (groupe contrôle). Les auteurs ont ainsi pu mettre en évidence la présence de tissus nerveux dans quatre tératomes sur cinq issus de patientes atteintes par l'EAI à anticorps anti-NMDAR et dans 20 tératomes sur 39 issus de patientes non atteintes par la maladie. Dans le premier groupe, composé des tératomes chez des patientes atteintes par l'EAI, il a été mis en évidence la présence de neurones anormaux, incluant des neurones en prolifération et dysplasiques. Ces neurones anormaux n'ont en revanche pas été détectés au sein des tératomes du groupe contrôle suggérant alors une organisation différente et propre des tissus tumoraux issus des patientes atteintes d'EAI. De plus, les infiltrats inflammatoires mise en évidence dans les deux groupes de tératome EAI et contrôle, montrent une proportion plus importante d'infiltrats inflammatoires au sein des tératomes EAI qu'au sein des tératomes du groupe contrôle. Les auteurs concluent cela par le

fait que ces neurones anormaux peuvent être à l'origine de la mise en place d'un désordre auto-immun en les ciblant préférentiellement (Day *et al.*, 2014).

Une autre étude de Chefdeville et collaborateurs en 2019, a montré que sur 26 cas de tératomes associés à une EAI à anticorps anti-NMDAR, tous les tératomes présentaient un infiltrat de lymphocytes T (CD3<sup>+</sup>), de lymphocytes B (CD20<sup>+</sup>) et formait des organes lymphoïdes tertiaires disséminés dans le tissu neuroglial tumoral (Tüzün *et al.*, 2009). Seulement 2 cas similaires ont été retrouvés sur 15 patients présentant un tératome mais n'ayant pas développé l'EAI à anticorps anti-NMDAR. De plus, dans le tissu neuroglial des tératomes associés à une EAI à anticorps anti-NMDAR, les auteurs rapportent la présence de plasmocytes (CD138<sup>+</sup>). Ces plasmocytes sont directement en contact avec le tissu neuroglial. Au sein de cet ensemble plasmocyte/tissu neuroglial, des dépôts d'IgG et d'IgA ont pu être identifiés (Tüzün *et al.*, 2009 ; Chefdeville *et al.*, 2019).

Une étude de Makuch et collaborateurs en 2018 a pu révéler que les lymphocytes B matures spécifiques de l'antigène GluN1 pouvait être différenciés *in vitro* en plasmocytes et qu'ils pouvaient sécréter des IgGs anti-GluN1 (Makuch *et al.*, 2018). Ces données suggèrent que le tératome jouerait un rôle clef dans la mise en place de la réaction immunitaire via une réaction croisée antitumorale.

D'autres cas cliniques nous donne un aperçu de toute la complexité de la mise en place de cette maladie. Un cas original relate l'induction d'une EAI à la suite d'une primo-infection par le virus de l'herpès simplex. Ces patients présentaient initialement une encéphalite à HSV causée par une infection via ce pathogène au sein du SNC. Les échantillons de LCR de ces patients étaient positifs pour le HSV. Après une période de rémission, ces patients ont rechuté en présentant un tableau clinique proche de celui d'une encéphalopathie avec mouvements anormaux. Cependant, ces patients n'étaient plus positifs pour le HSV à ce stade de rechute mais étaient en revanche tous positifs pour les autoanticorps anti NMDAR ou anti-D2R. Ces cas sont intéressants du fait de la primo-infection à HSV qui conduit par la suite à une EAI à anticorps anti-NMDAR. Bien qu'un mimétisme moléculaire ait pu être évoqué dans la mise en place de l'EAI à anticorps anti-NMDAR, il n'y a pas de partage d'épitope entre l'HSV ou le

NMDAR et plus précisément la sous unité GluN1 du NMDAR. Ainsi, une autre hypothèse est proposée où le virus HSV agirait comme un « spectateur ». Cette situation particulière pourrait induire une lyse neuronale permettant la libération de nombreux débris neuronaux et d'antigènes induisant progressivement une inflammation massive au sein du SNC (Oldstone., 1998 ; Sinmaz *et al.*, 2015).

## Objectifs de la thèse

L'encéphalite auto-immune à anticorps anti-NMDAR est une pathologie ciblant le SNC. Elle est caractérisée par une production d'anticorps dirigés contre l'ATD de la sous unité GluN1 du NMDAR. Sa récente découverte, en 2007, par l'équipe du Pr. Josef Dalmau fait qu'il existe à l'heure actuelle peu de modèles d'études précliniques de cette pathologie. Depuis la découverte de la pathologie, différents modèles ont été progressivement mis en place. D'abord avec un modèle basé sur une infusion d'anticorps permettant de valider leur pathogénicité dans un modèle murin (Planagumà *et al.*, 2015), puis, l'introduction progressive de modèles basés sur une immunisation active (Pan *et al.*, 2017 ; Jones *et al.*, 2019). L'utilisation d'une immunisation active est une avancée dans le développement de ces nouveaux modèles murins d'EAI à anticorps anti-NMDAR en ce sens qu'ils vont tendre à se rapprocher de la physiopathologie humaine grâce à une partie du NMDAR injectée et envers laquelle une réponse immunitaire est engagée. Néanmoins, comme nous avons pu le voir dans l'introduction, ces modèles, même s'ils évoluent favorablement dans la compréhension de la physiopathologie de la maladie, ne sont pas optimaux. En effet, les protocoles d'immunisation utilisés, que cela soit celui du modèle de Pan et collaborateurs (Pan *et al.*, 2017) ou bien celui du modèle de Jones et collaborateurs (Jones *et al.*, 2019), ne permettent pas de mettre en avant l'immunogénicité précise de la séquence peptique contenue au niveau de l'ATD de la sous unité GluN1 du NMDAR et ciblée par les auto-anticorps (Gleichman *et al.*, 2012). De ce fait, l'intérêt d'une séquence unique, immunogène, permettant l'engagement d'une lignée lymphocytaire précise n'est pas possible dans ces modèles. Dans le modèle de Pan et collaborateurs, les déficits comportementaux induits par cette immunisation reste discutables et se limitent à une hyperactivité locomotrice avec utilisation concomitante d'une souche transgénique (ApoE<sup>-/-</sup>) et l'utilisation d'un antagoniste du NMDAR, le MK801. L'infiltration leucocytaire est peu étudiée et n'est pas ciblée vers la voie des LB pourtant centrale dans la pathologie. Ces paramètres sont autant de biais expérimentaux qui ne permettent pas de se rapprocher des mécanismes physiopathologiques constatés chez l'humain et donc de



comprendre comment la maladie se met en place et pourquoi. D'autres modèles tentent en partie de pallier ces biais, avec, par exemple, l'introduction du modèle de Jones et collaborateur (Jones *et al.*, 2019) basé sur une immunisation utilisant des constructions contenant le NMDAR. Les déficits comportementaux observés sont plus complets que ceux observés dans le modèle de Pan et collaborateurs et se rapprochent de ceux obtenus dans le premier modèle basé sur une infusion (Planagumà *et al.*, 2015). Également, l'introduction d'une étude sérologique du LCR est une avancée et met bien en évidence une production d'anticorps au sein du SNC, mais sans étude cytologique du LCR, ce qui pourrait être un avantage pour comprendre quelle cellule immunitaire est engagée dans ce modèle, qui selon, les auteurs est plus en faveur d'une coopération entre les lymphocytes T et les lymphocytes B mais qui reste à être pleinement prouvé chez l'homme étant donné que les lymphocytes B reste le type cellulaire central de cette pathologie (Dalmau *et al.*, 2011 ; Martinez-Hernandez *et al.*, 2011 ; Dale *et al.*, 2012).

L'absence de modèles animaux basés sur une immunisation active et impliquant de manière claire les lymphocytes B et les plasmocytes restent absents. Également, les investigations complètes sur le LCR restent peu concluantes et ne permettent pas de caractériser l'infiltration leucocytaire post-immunisation ou infusion. En tenant compte des modèles existants basés sur une immunisation active et en incluant un peptide immunogène unique, contenant la séquence du NMDAR reconnues par les autos-anticorps, nous nous proposons de mettre en place un nouveau modèle murin d'EAI à anticorps anti-NMDAR. Ce modèle permet à la fois d'obtenir une réponse immunitaire médiée par les lymphocytes B mais aussi la mise en place de déficits comportementaux robustes et proches de ceux observés dans le modèle de Planagumà et collaborateurs, eux même en accord avec les déficits comportementaux observés chez l'homme. Nous avons émis l'hypothèse que la sélection d'un peptide immunogène contenant la séquence antigénique impliquée dans la pathologie humaine (N368/G369) pourrait, dans le cadre d'une immunisation active, initier une réponse immunitaire et déclencher une pathologie chez l'animal qui reproduirait une partie des symptômes comportementaux de la maladie humaine et les processus auto-immuns à l'origine de ces symptômes.

**Objectif 1 :** *La première étape de notre étude consiste à concevoir un peptide immunogène prédictif d'une réponse immunitaire médiée par les lymphocytes B et permettant d'induire, dans le cadre d'une immunisation active, un modèle pertinent d'EAI à anticorps anti-NMDAR. La pertinence de ce modèle devant être objectivée par une production endogène d'anticorps anti-NMDAR induisant des déficits comportementaux. Les déficits comportementaux que nous observons doivent être proches de ceux observés chez l'homme. De plus, nous avons souhaité introduire l'étude de l'épilepsie dans ce nouveau modèle, cette pathologie faisant partie intégrante des symptômes complexes rencontrés dans la maladie.*

**Objectif 2 :** *Après avoir validé la phase comportementale du modèle, nous entamerons l'étude des mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans le cadre de l'immunisation active en les confrontant aux observations physiopathologiques rapportées chez l'Homme. Nous avons pu voir que l'infiltration de lymphocytes B et de plasmocytes à la fois dans l'encéphale et le LCR participent majoritairement à la pathologie humaine. Ces aspects doivent être investigués et validés dans notre modèle pour prétendre offrir un nouveau modèle murin se rapprochant le plus fidèlement possible de la physiopathologie.*

**Objectif 3 :** *après avoir mis en évidence que notre modèle impliquait une infiltration de lymphocytes B et de plasmocytes au sein du SNC, nous tenterons de prouver le rôle majeur joué par les lymphocytes B. Pour ce faire, nous pratiquerons une déplétion des lymphocytes B à la manière de ce qui est réalisé en clinique avec le Rixumab<sup>®</sup>, un anticorps monoclonal ciblant le CD20 humain. Cette déplétion devra être objectivée avec les tests comportementaux pratiqués lors des protocoles de validation du modèle, puis, la baisse des lymphocytes B et des plasmocytes devra être démontrée grâce à la technique de cytométrie en flux.*

## VI: Résultats

### VI-A: Article 1: Autoimmune encephalitis mediated by B-cell response against NMDAR in the mouse.

Title: Autoimmune encephalitis mediated by B-cell response against NMDA receptor in the mouse.

Titre : Encéphalite auto-immune dirigée contre le récepteur NMDA médiée par les lymphocytes B.

Article publié dans le journal « Brain » pour lequel je suis première auteure.

#### **Contexte bibliographique de l'étude :**

L'encéphalite auto-immune à anticorps anti récepteur N-Méthyl-D-Aspartate (NMDAR) est une pathologie neuropsychiatrique affectant 5 à 10 patients pour 1,5 millions de personnes chaque année. La symptomatologie de la maladie varie en fonction des patients et inclue des troubles psychiatriques (hallucinations, confusion, psychose), des déficits cognitifs (dans les fonctions exécutives et la mémoire), des crises d'épilepsie et des perturbations du sommeil. La maladie est due à la présence d'auto-anticorps dirigés contre le domaine amino-terminal (ATD) de la sous unité GluN1 du NMDAR. Le système immunitaire est largement impliqué dans cette maladie, principalement les lymphocytes B et les plasmocytes qui sont détectés chez l'homme à la fois dans l'encéphale et le LCR. Ces plasmocytes sont notamment responsables de la synthèse intrathécale d'anticorps anti-NMDAR induisant une hypoactivité glutamatergique.

Le EphB2R est un récepteur qui permet l'ancrage du NMDAR à la synapse. Quand l'anticorps se fixe sur le NMDAR, cela rompt la liaison du couple NMDAR/EPHB2R conduisant à un glissement en extra-synaptique du NMDAR et *in fine*, en une baisse progressive de la densité en NMDAR post-synaptique. Les auto-anticorps reconnaissent une zone de l'ATD du NMDAR comprise au niveau l'asparagine et la glycine en position 368/369.

Différents modèles murins existent, basés sur une infusion intracérébroventriculaire d'anticorps anti-NMDAR humains ou bien basés sur des immunisations actives. Certains d'entre eux mettent en évidence des déficits comportementaux proches de ceux observés chez l'homme mais ils ne prennent pas en compte le système immunitaire dans sa globalité.

**Objectif de l'étude :** Dans cette étude, nous induisons une immunisation active contre un peptide contenant la partie reconnue par les auto-anticorps dans la maladie (NG 368-369). A la suite de cela, nous analysons l'impact de l'immunisation sur les aspects comportementaux, cellulaires et moléculaires en les comparants à la physiopathologie humaine.

**Principaux résultats :** L'immunisation contre le peptide GluN1<sub>359-378</sub> mène à la production d'anticorps anti-NMDAR à la fois dans la circulation sanguine et dans le LCR. Les animaux, post immunisation vont développer des déficits anxieux, dépressifs et de mémorisation à long

terme. Des lymphocytes B sont retrouvés dans le LCR ainsi que des plasmocytes. La production d'anticorps anti-NMDAR au sein du LCR est due aux plasmocytes, capable de sécréter des anticorps. La déplétion des lymphocytes B permet une nette réduction des symptômes observés chez les animaux du groupe isotype, soulignant bien le caractère central des lymphocytes B.

## Autoimmune encephalitis mediated by B-cell response against *N*-methyl-D-aspartate receptor

Isabelle Wagnon,<sup>1</sup> Pauline Hélie,<sup>1</sup> Isabelle Bardou,<sup>1</sup> Caroline Regnaud,<sup>1</sup> Léonie Lesec,<sup>1</sup> Jérôme Leprince,<sup>2</sup> Mikaël Naveau,<sup>3</sup> Barbara Delaunay,<sup>1</sup> Olivier Toutirais,<sup>1,4</sup> Brigitte Lemauff,<sup>1,4</sup> Olivier Etard,<sup>5,6</sup> Denis Vivien,<sup>1,7</sup> Véronique Agin,<sup>1</sup> Richard Macrez,<sup>1,8</sup> Eric Maubert<sup>1</sup> and Fabian Docagne<sup>1</sup>

Anti-*N*-methyl-D-aspartate receptor (NMDAR) encephalitis is a neuropsychiatric disease characterized by an antibody-mediated autoimmune response against NMDAR. Recent studies have shown that anti-NMDAR antibodies are involved in the pathophysiology of the disease. However, the upstream immune and inflammatory processes responsible for this pathogenic response are still poorly understood. Here, we immunized mice against the region of NMDA receptor containing the N368/G369 amino acids, previously implicated in a pathogenic response. This paradigm induced encephalopathy characterized by blood–brain barrier opening, periventricular T<sub>2</sub>-MRI hyperintensities and IgG deposits into the brain parenchyma. Two weeks after immunization, mice developed clinical symptoms reminiscent of encephalitis: anxiety- and depressive-like behaviours, spatial memory impairment (without motor disorders) and increased sensitivity to seizures. This response occurred independently of overt T-cell recruitment. However, it was associated with B220<sup>+</sup> (B cell) infiltration towards the ventricles, where they differentiated into CD138<sup>+</sup> cells (plasmocytes). Interestingly, these B cells originated from peripheral lymphoid organs (spleen and cervical lymphoid nodes). Finally, blocking the B-cell response using a depleting cocktail of antibodies reduced the severity of symptoms in encephalitis mice. This study demonstrates that the B-cell response can lead to an autoimmune reaction against NMDAR that drives encephalitis-like behavioural impairments. It also provides a relevant platform for dissecting encephalitogenic mechanisms in an animal model, and enables the testing of therapeutic strategies targeting the immune system in anti-NMDAR encephalitis.

- 1 Normandie Univ, UNICAEN, INSERM, U1237, PhIND “Physiopathology and Imaging of Neurological Disorders”, Institut Blood and Brain at Caen-Normandie, Cyceron, Caen, France
- 2 Normandie Univ, UNIROUEN, INSERM, U1239, Neuronal and Neuroendocrine Differentiation and Communication, Rouen, France
- 3 Normandie Univ, UNICAEN, CNRS UMS 3408, Cyceron, Caen, France
- 4 Department of Immunology, Caen University Hospital, CHU Caen, Caen, France
- 5 Normandie Univ, UNICAEN, ISTS, EA 7466, Cyceron, Caen, France
- 6 Service des explorations fonctionnelles du système nerveux, CHU de Caen, Caen, France
- 7 Department of Clinical Research, Caen University Hospital, CHU Caen, Caen, France
- 8 Emergency Department, Caen University Hospital, CHU Caen, Caen France

Correspondence to: Fabian Docagne, PhD  
 Inserm U1237, PhIND, Institut BB@C, Centre Cyceron, BP5229, 14074 Caen Cedex, France  
 Email: docagne@cyceron.fr

**Keywords:** autoimmune encephalitis; glutamate; neuropsychiatry; paraneoplastic; limbic

**Abbreviation:** NMDAR = *N*-methyl-d-aspartate receptor

Received July 29, 2019. Revised May 6, 2020. Accepted June 29, 2020.

© The Author(s) (2020). Published by Oxford University Press on behalf of the Guarantors of Brain. All rights reserved.  
 For permissions, please email: journals.permissions@oup.com



## Introduction

Anti-N-methyl-D-aspartate receptor (NMDAR) encephalitis is a neuropsychiatric disorder first characterized by Josep Dalmau's group (Dalmau *et al.*, 2008). Tumours (mostly ovarian teratomas) (Dalmau *et al.*, 2008) and herpes simplex encephalitis (Nosadini *et al.*, 2017) are the two main triggers of the disease. It affects 1.5 per million individuals every year. Its presentation is variable among patients and includes psychiatric disturbances (hallucination, confusion, and psychosis), cognitive impairments (deficits in executive functions and memory (Finke *et al.*, 2012), epileptic seizures (Dalmau *et al.*, 2008; Vincent and Bien, 2008; Irani *et al.*, 2010; Geis *et al.*, 2019) or sleep disturbance (DeSena *et al.*, 2014). The associated encephalopathy can lead to movement disorder, autonomic dysfunction, hypoventilation and, in some cases, coma (Dalmau *et al.*, 2008; Irani *et al.*, 2010).

This disease is closely associated with the presence of autoreactive antibodies against NMDAR in the CSF and serum of patients (Gresa-Arribas *et al.*, 2014; Hara *et al.*, 2018), although they may not be the only antibodies to be causative. The autoimmune nature of this disease is supported by the detection of inflammatory infiltrates, including B cells and CD138<sup>+</sup> antibody-secreting cells (CD138<sup>+</sup>), in perivascular, interstitial, and Virchow-Robin spaces of post-mortem patient brains (Martinez-Hernandez *et al.*, 2011). These infiltrates are considered responsible for the intrathecal production of autoreactive antibodies.

Further studies have shown that these antibodies disrupt the interaction of NMDAR with partner transmembrane proteins, such as Ephrin B2 receptors, which govern their presence at the synapse (Mikasova *et al.*, 2012). When this interaction is lost, NMDAR are internalized and their synaptic density drops. This leads to perturbation of synaptic transmission and surface dynamics of NMDAR (Jézéquel *et al.*, 2017) and may explain the observed symptoms. To promote these effects, the autoreactive anti-NMDAR antibodies recognize a portion of the amino-terminal domain of NMDAR that comprises the critical amino acids asparagine and glycine at position 368/369 of the protein (Gleichman *et al.*, 2012).

This crucial role of NMDAR antibodies in the pathogenesis of the disease was recently highlighted in an animal model where pooled CSFs from anti-NMDAR encephalitis patients were injected directly into the CSF of mice (Planagumà *et al.*, 2015). Behavioural deficits were observed, reminiscent of the human disease: spatial memory deficits, anhedonia and depressive-like behaviour. An increased sensitivity to pharmacologically-induced seizures, relevant to the epileptic phenotype of the human disease, was also reported (Wright *et al.*, 2015). Given the nature of this experimental paradigm, the autoimmune processes responsible for the production of autoreactive anti-NMDAR antibodies were not addressed in these previous studies.

In the present study, we induced in mice an active immunization against the portion of NMDAR involved in the

human pathology. This led to the production of autoreactive anti-NMDAR antibodies in the circulation and the CSF. We report a pathological frame providing an immune-mediated model of anti-NMDAR encephalitis in which behavioural and cognitive impairments arose in combination with encephalopathy. Importantly, these pathological events occurred in a context of autoimmune, B-cell-mediated response triggering the CNS.

## Materials and methods

### Animals

Eight-week-old male C57BL/6J (25–30 g) (Janvier labs) were housed in our central animal house (CURB: centre universitaire de ressources biologiques, Caen University) at a controlled temperature ( $21 \pm 1^\circ\text{C}$ ) and humidity ( $55 \pm 10\%$ ) in 12-h inverted light cycle (light period: 7 pm to 7 am) with food and water *ad libitum*. Animals were weighed daily during the protocols. Health status was controlled and provided by the CURB. All experiments were performed during the dark phase. Animals were habituated to the experimental room for 30 min before each experiment. All procedures were performed according to official guidelines under approval of institutional ethics committee (Comité Normand d'éthique en matière d'expérimentation animale, CeNomExA. Project licence number #11904) in accordance with the European directive N° 2010/63/UE. The experiments were performed and reported in accordance to the ARRIVE guideline.

### Experimental group allocation

Animals were randomly allocated to experimental group: each cage was given a letter by an individual not associated with the experiments. The experimenter was blinded to experimental groups until the end of the protocol. For ethical considerations, each cage contained animals from the same group in order to avoid mixing potentially sick animals with animals in which the disease is milder or absent and exposing them to harmful conditions (fights, competition for dominance, access to food etc. with animals in a better health condition). The order in which the animals in the different experimental groups were treated and assessed was also determined in a random way at the beginning of the protocol. Correspondence between letters and experimental groups was revealed to the experimenter after all analyses were performed.

### Statistical analyses

Results are presented as the mean  $\pm$  standard deviation (SD). Sample size are indicated in the text for each group and protocol. Normality test were performed on all sample with a Shapiro-Wilk test. If normality was assumed, we used Student's *t*-test. When normality could not be assumed, we used a non-parametric test (Wilcoxon for paired sample compared; Mann-Whitney U-test to compare two independent samples). All analyses were performed with Statistica PRO<sup>®</sup> software

version 13.3 and StatView<sup>®</sup>. *P* values are given in the text (results) for each individual experiment.

## Peptide design

Previous reports (Gleichman *et al.*, 2012) have determined that the N368 and G369 amino acids on GluN1 are crucial for binding and subsequent effects of encephalitis antibodies on NMDAR. Our approach was to design a peptide that would recognize this region. To assess the theoretical immunogenicity of peptides included in GluN1, we used the BepiPred linear epitope prediction method (Immune Epitope Data Base and Analysis Resource, [www.iedb.org](http://www.iedb.org)). This algorithm predicts the immunogenicity of peptide based on the properties of its amino acids: presence/absence of an aromatic cycle, amino acid weight, chemical proprieties (acidic or basic), and length of the peptide. A score was given to each peptide from 0 (lowest immunogenicity) to 1 (highest immunogenicity). A negative score indicates theoretical non-immunogenicity.

## Active immunization

Autoimmune response was induced on 8-week-old male C57BL/6J mice (Janvier lab) via subcutaneous injection of 200 µg of selected peptide (GluN1<sub>359-378</sub> peptide or GluN1<sub>168-187</sub> control peptide) in an emulsion mixture (volume ratio 1:1) of complete Freund's adjuvant (Sigma Aldrich Laboratories) containing 600 µg of heat-killed *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra (Difco). For sham animals, the immunogenic peptide was replaced with 200 µl of saline. The emulsion was administered in four injections of 50 µl: two at shoulders and two at limbs. All animals were intraperitoneally injected with 200 ng of *Bordetella pertussis* toxin (Sigma Aldrich) in 200 µl of saline at the time of immunization, and at 48 h after immunization.

## Experimental design

After immunization with the GluN1<sub>359-378</sub> or the GluN1<sub>168-187</sub> control peptide, mice were subjected to one different behavioural test every day in the following order: actimetry, Y-maze, O-Maze, swimming test, starting 1 or 2 weeks after immunization, depending on the experiment. Tissue and fluids were collected on the last day of the series of behavioural tests.

## Detection of anti-NMDAR antibodies

Presence of NMDAR antibodies in serum was determined at the end of the first or second week post-immunization (as indicated in corresponding figure legends) by using HEK293 cell-based assay expressing GluN1a and GluN2b subunits. HEK293 were transfected with a mixture of pcDNA3-GluN1a and pcDNA3-GluN2b plasmids (2 µg of each) using the lipofection method (Lipofectamine<sup>®</sup>, Life Technologies). Cells were fixed with 4% paraformaldehyde (20 min, room temperature), permeabilized with PBS 0.1M-0.3% Triton<sup>™</sup> X-100 (Sigma Aldrich) and blocked with bovine serum albumin 4% (Sigma Aldrich) (1 h, room temperature). HEK293 were incubated with sera extracted from immunized mice at different dilutions (1:10; 1:40; 1:100; 1:1000; 1:2000; 1:3000) (overnight, 4°C). Rabbit anti-GluN1 antibody (ab9058; 1:800; Abcam) was used as positive

transfection control. The next day, cells were washed and incubated with F(ab')<sub>2</sub> fragments of donkey anti-mouse IgG (H + L), or anti-rabbit (1:800; Jackson ImmunoResearch) (1 h 30 min, room temperature).

## Behavioural tasks

All behavioural tests were assessed by researcher blinded to experimental condition using standardized tests. Behavioural tests were aimed to assess spatial memory (Y-maze), anxiety-like behaviour (O-maze), depressive-like behaviour (swim forced test) and spontaneous locomotor activity (horizontal and vertical assessment).

### O-maze

Anxious-like phenotype of mice was assessed by the elevated zero-maze (O-maze) (Cryan and Holmes, 2005). Behaviour in the O-maze reflects a conflict ('approach-avoidance') between the rodent's preference for protected areas and their innate motivation to explore novel environments. The apparatus (BMP Chaudronnerie) was a black circular PVC corridor (61 cm in diameter, 10 cm path width, 70 cm above floor level), which was equally divided into two opposite open quadrants and two opposite enclosed ones (15-cm high side walls). Each mouse was placed in the centre of a randomly chosen closed quadrant, and was then allowed to explore freely the maze during a 5-min period. Anxiety-like behaviour was assessed by the quantification of the time spent in the open quadrants.

### Y-maze

To assess cognitive functions, we used a two-trial place recognition task previously developed to study spatial cognition processes in rats and mice (Kraeuter *et al.*, 2019). The standard Y-maze used in this study consisted of white plastic with three identical arms (BMP Chaudronnerie). Extra-maze distal cues were suspended on the black curtains of the room walls at 123 cm from the maze (from the top of the cues to the centre of the maze). The behavioural procedure consisted in two trials separated by a 2.5-h intertrial interval. During the acquisition phase (trial 1), one randomly-chosen arm of the Y-maze was closed with a guillotine door. Each mouse was then placed in the start arm (arm 1), the head facing away from the centre of the maze, and allowed to freely visit the accessible parts of the maze (arm 1/arm 2) for 5 min. At the end of the trial, the labelled mouse was then replaced in its home cage. To exclude possible anxiety-related states towards the apparatus, we verified that the total number of visits in arms 1 and 2 of the Y-maze was similar between GluN1 immunized mice and sham mice, and that both groups visited arm 1 as often as arm 2. During the test phase (trial 2), animals had free access to all three arms (arm 1/arm 2/new arm) for 1 min. Spatial performance was assessed through the comparison of the number of visits made in each arm.

### Forced swim test

The forced swim test was used to assess depressive-like behaviour (Slattery and Cryan, 2012). Mice were individually placed into a glass cylinder containing warm water (25°C), deep enough to force the mouse to swim. The total trial time was 6 min and immobilization time measurement began from the second minute. Immobilization time was defined as the time that



animal stop swimming and start floating with its head above the water. This test is considered to reflect behavioural despair.

### Actimetry

Spontaneous locomotor activity was quantified by using a rack of eight activity cages equipped with horizontal infrared beams located across the long axis of the cage (Imetronic®). Mice were placed in individual acrylic chambers (30 × 20 × 20 cm) for 30 min. The number of horizontal movements was determined by breaks in movement-sensitive photo-beams that were then converted into locomotor activity counts. This test evaluates the hypo- or hyperactivity.

### Pharmacologically-induced seizures

These experiments were performed following a previously described method (Wright *et al.*, 2015). Briefly, a subthreshold injection (40 mg/kg) of pentylenetetrazol (PTZ) (Sigma Aldrich) diluted in 200 µl of saline was intraperitoneally injected in mice 2 weeks after immunization. After injection, mice were individually placed in their experimental cage and recorded for 60 min with a camera. The PTZ's scale (Lüttjohann *et al.*, 2009) was used to assess seizure stage (see PTZ scale in the [Supplementary material](#)). Investigator was blinded to experimental groups. Animals were terminated at the end of the experiment for ethical considerations.

### MRI

Microparticles of iron oxide (MPIOs) coupled to anti-P-Selectin antibodies were prepared as previously described (Fournier *et al.*, 2017). For MPIO imaging, we used 3D respiration-gated T<sub>2</sub>\*-weighted gradient with echo imaging with flow compensation (GEFC; spatial resolution of 150 µm × 75 µm × 75 µm interpolated to an isotropic resolution of 75 µm with echo time/repetition time: 8.6/200 ms and a flip angle of 25° (acquisition time = 10 min). Settings for 2D-T<sub>2</sub>-high-resolution-weighted multi spin multi echo (MSME) imaging were: echo time/repetition time, 62.57/2351.68; flip angle 90°; acquisition time 7 min 31 s, slice thickness: 0.5; slice separation: 0.5. Settings for 2D-T<sub>2</sub>-high resolution FLAIR imaging were: echo time/repetition time: 62.57/4000; flip angle, 90°; acquisition time: 38.24 min; slice thickness, 4.5 mm; slice separation, 4.5.

### In vivo vascular permeability

Mice received an intravenous injection of 200 µl of 2% Evan's blue solution in saline and were left awake in their cage for 4 h. Brains were extracted after perfusion and placed in optical imaging (Biospace™), and Evan's blue fluorescence was measured (excitation 650 nm and emission filter 700 nm). Fluorescence was quantified with M3 Vision software (Biospace).

### CSF protein dosage

Total protein concentration was measured in CSF samples (2 µl) by measuring their absorbance at 280 nm on a Nanodrop™ spectrophotometer (Thermo Scientific).

### Tissue processing

Mice were deeply anaesthetized and perfused with cold heparinized saline until total blood removal. For histology, mice were then perfused with a 150 ml solution of 2% paraformaldehyde and 0.2% picric acid. Next, brain, spleen and cervical lymph node were extracted and cryoprotected in four successive 20% sucrose baths for 24 h at 4°C. Organs were included in Tissue-Tek (Miles scientific) and conserved at -80°C. Cryomicrotome-cut axial slice (8–10 µm) were collected on poly-lysine slides (Thermo scientific) and stored at -80°C before processing.

### Immunostaining

Sections were co-incubated overnight at room temperature with the following antibodies: Rabbit anti-laminin or chicken anti-laminin (1:1500; Abcam), rat anti-CD4 (1:25; eBiosciences), rat anti-CD8 (1:25; eBiosciences), sheep anti-fibrinogen serum, rat anti CD45R/B220 (RA3-6B2) (1:800; Invitrogen), rabbit anti-syndecan-1 (1:800; Abcam) or sheep anti-TTR (ab9015) (Abcam; 1:1000). Primary antibodies were revealed by using AffiniPure F(ab')<sub>2</sub> fragment IgGs conjugated to Alexa<sup>488</sup>, Cy3 or Alexa<sup>647</sup> at 1:800 (Jackson ImmunoResearch). Next, sections were coverslipped with antifade medium containing DAPI. Assessment of neurodegeneration was performed by Fluoro-Jade® C staining (Schmued *et al.*, 2005).

### Microscopy

Images were digitally captured on a Leica DM6000 microscope coupled to Coolsnap camera, visualized with Metavue software (Version 5.0; Molecular Devices), and further processed by using ImageJ software (Version 1.49e; NIH). All analyses were performed blinded to the experimental groups.

### Dot blot

A recombinant peptide corresponding to the N-Terminal part of GluN1 was blotted on a nitrocellulose membrane for 1 h at room temperature until the blots were dry. The membrane was then blocked with 2% bovine serum albumin in TTBS (50 mM Tris, 0.5 M NaCl, 0.05% Tween-20, pH 7.4) for 1 h at room temperature. The membrane was then incubated for 1 h at room temperature in TTBS with CSF from sham or GluN1<sup>359-378</sup> mice, or with Glunomab® (Lesept *et al.*, 2016) an anti-GluN1 antibody as a positive control. The membrane was washed three times (10 min each) in TTBS on rocker before incubation with anti-mouse IgG secondary antibody for 1 h at room temperature in TTBS. Membrane was washed again three times (10 min each) in TTBS on rocker. Blots were enhanced for analysis and detection by chemiluminescence agent Thermo Scientific Pierce ECL Plus substrate and data was obtained by ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare Life Sciences).

### Calcium video microscopy

Neuron cultures were prepared from embryonic Day 14.5 Swiss mice as previously described (Nicole *et al.*, 2001). Cortices were dissected and dissociated in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM), and cultured in DMEM supplemented with 5% foetal bovine serum, 5% horse serum and 2 mM glutamine on 35 mm dishes with poly-lysine (0.1 mg/ml)/laminin (0.02 mg/ml)



coating at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>. Calcium video-microscopy was performed as previously described (Lesept *et al.*, 2016). Briefly, after 12 days *in vitro*, cultures were transferred into a serum-free HEPES-buffered saline solution and Fura-2-AM (10 µM) was loaded into the cells by incubation at 37°C for 45 min. Cells were then placed at room temperature, on the stage of a Leica DMI6000B inverted microscope equipped with a 150 W Xenon high stability lamp and a Leica 40×, 1.3 numerical aperture epifluorescence oil immersion objective (Wetzlar). Neurons received two consecutive stimulations with NMDA (50 µM, 30 s each) using a peristaltic pump. Neurons were then incubated for 45 min with sera from sham or GluN1<sub>359-378</sub> and two additional stimulations were performed (50 µM, 30 s each) in order to compare the response to what observed with the first stimulation. Fura-2 ratio images (excitation: 340, 380 nm, emission: 510 nm) were acquired with a Digital CMOS camera (Hamamatsu, ORCA-Flash2.8 C11440-10C) and digitized (2048 × 2048 pixels) using MetaFluor 6.1 software (Universal Imaging Corporation). For each cell, we calculated the area under the curve (AUC) of intracellular calcium influx before (AUC<sub>b</sub>) and after treatment (AUC<sub>a</sub>) so that each cell is its own control. Results are given as per cent of responsiveness  $\{ = [(AUC_a)/(AUC_b)] \times 100 \}$ , which gives a measure of the effect of the treatment with the different sera.

## Flow cytometry

Immunophenotyping of leucocytes was performed by flow cytometry from brain, spleen, lymph node and CSF. Cells were isolated using a cell strainer (Ø 40 µm, Falcon). Brain cells were centrifuged through by Percoll gradient (Sigma Aldrich) to remove myelin. Spleen cells were incubated with ammonium chloride to lyse red cell. Then, all sample were incubated with 1 µl of Fc-CD16-32 (BD Pharmingen) for 15 min at 4°C to block non-antigen-specific binding of immunoglobulins. The antibodies used for flow cytometry (all provided by BD Pharmingen and used at 0.2 mg/ml) were: BV421-Rat Anti-Mouse CD11b, APC-Rat Anti-Mouse CD4, PE-Cy7 Rat Anti-Mouse CD8a, FITC Rat Anti-Mouse CD45, PE-Cy7 Rat Anti-Mouse Ly-6G, APC Hamster Anti-Mouse CD11c, 0.2 mg/ml, BV421-Rat Anti-Mouse CD45/B220, APC-Rat Anti-Mouse CD138, APC Rat IgG2a K Isotype Control, PE-Cy7 Hamster Anti-Mouse CD3e, PE-Cy7 Hamster IgG1, k Isotype Control, FITC Rat Anti-Mouse CD45, BV421 Rat Anti-Mouse CD45R/B220 (BD Horizon 0.2 mg/ml). Experiments were performed on a FACSVerser™ (BD) and analysis was done using with FlowJo™ (7.6.5 version).

## B-cell depletion

B cells were depleted following a previously described method (Carmi *et al.*, 2015) by the injection of anti-mouse B220 (clone RA3.3A1/6.1, InVivoMab) and anti-mouse CD19 (clone 1D3, InVivoMab). Each antibody was injected intraperitoneally at a dose of 300 µg per injection, once a week for 4 weeks, starting 1 week before active immunization. Control animals were injected in the same manner with 600 µg of an isotype antibody (anti-trinitrophenol IgG2a isotype, clone 2A3, InVivoMab).

## Data availability

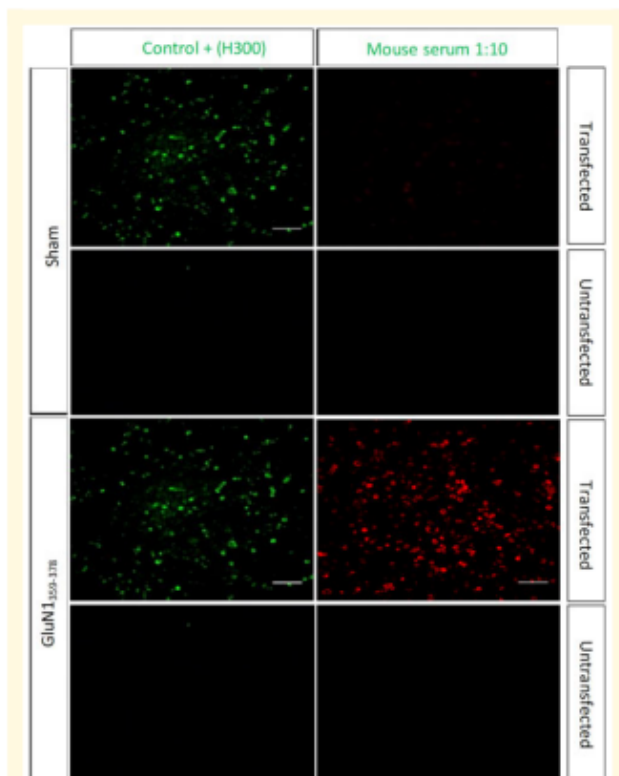
All data are available upon request by a qualified researcher.

## Results

### Autoimmune response against GluN1 induces spatial memory impairment and anxiety-like behaviour

The primary objective of this study was to design an animal model reproducing the immune processes occurring in NMDAR encephalitis. To this end, we designed a protocol of active immunization against the region of GluN1 previously implicated in this disease (Gleichman *et al.*, 2012). Our first step was to design an immunogenic peptide including the N368/G369 region of GluN1, crucial for the development of immunoreactivity (Gleichman *et al.*, 2012). We used the BepiPred linear epitope prediction method ([www.iiedb.org](http://www.iiedb.org)) to assess the theoretical immunogenicity of several peptides encompassing this region of GluN1 (Supplementary Table 1). The criteria for design was that the peptide would have a high theoretical immunogenicity, and would include the N368/G369 amino acids in a central position. The GluN1<sub>359-378</sub> peptide (RKLVQVGIYNGTHVIPNDRK) fulfilled these two criteria (Supplementary Table 1) and was thus used for immunization for the rest of the study. We immunized mice with this peptide in an immunogenic adjuvant cocktail typically used to induce a T-cell (Fournier *et al.*, 2017) or B-cell mediated (Whittaker Hawkins *et al.*, 2017; Michel *et al.*, 2019) autoimmune response in mice. We extracted sera from these mice and used them to stain HEK-293 cells transfected with NMDAR subunits, a method classically used to detect circulating anti NMDAR autoantibodies (αNMDAR-Ab) in human diagnosis. This showed that animals immunized with the GluN1<sub>359-378</sub> peptide, but not sham animals, produced circulating αNMDAR-Ab (Fig. 1).

Then, we addressed whether this autoimmune challenge (Fig. 2A) induces behavioural changes that may reproduce part of the symptoms observed in NMDAR encephalitis. Two weeks after immunization, GluN1<sub>359-378</sub> immunized mice entered less often ( $P = 0.018$ ) and spent less time ( $P = 0.002$ ) than sham mice in the open arms of the O-maze (respectively,  $n = 10$  and  $n = 12$ ; Fig. 2B and C), and showed an increased latency time ( $P = 0.00001$ ) before entering the open arms (Fig. 2D). They also stayed immobile for a longer time than sham mice in the swimming test ( $I = 0.0004$ ,  $n = 10$  in each group; Fig. 2E). These two sets of experiments are evocative of an anxious and depressive-like behaviour in GluN1<sub>359-378</sub> mice. Next, sham and GluN1<sub>359-378</sub> mice were subjected to the Y-maze test to assess spatial memory. During the acquisition phase, the total number of visits into the two free access arms was equivalent for sham and GluN1<sub>359-378</sub> mice (see 'Materials and methods' section). During the test phase, sham mice discriminated the newly open arm and the two familiar arms correctly, as they visited significantly more often the new arm than the



**Figure 1 Validation of immunization.** Immunostaining of HEK293 cells ( $n = 3$ ) transfected with GluN1a and GluN2B subunits after incubation with serum of sham mice or GluN1<sub>359-378</sub> mice (revealed by anti-mouse IgG coupled to Cy3, red), or with a commercial anti-GluN1 antibody (H300, revealed by anti-rabbit IgG coupled to FITC, green). Scale bars = 100  $\mu\text{m}$ .

familiar arms (arms 1 and 2) ( $P = 0.028$  and  $P = 0.006$ , respectively,  $n = 12$ ; Fig. 2F). This indicates good spatial memory in sham mice. In sharp contrast, GluN1<sub>359-378</sub> mice failed to discriminate between new and familiar arms, as they visited the new arm significantly less often than the familiar arms ( $P = 0.018$  for both,  $n = 10$ ; Fig. 2F). These results reveal a deficit of spatial memory in GluN1<sub>359-378</sub>. Active immunization with a control peptide (Fig. 3A and Supplementary Table 2) did not induce any behavioural changes in the O-maze ( $P = 0.84$ ,  $P = 0.12$  and  $P = 0.67$ , respectively; Fig. 3B–D) or in the Y-maze (new arm versus arm 1:  $P = 0.007$ , new arm versus arm 2:  $P = 0.023$ ; Fig. 3E). Global motor activity (horizontal or vertical) was not influenced by active immunization with GluN1<sub>359-378</sub> (horizontal:  $P = 0.63$ , vertical:  $P = 0.91$ ,  $n = 10$  in each group; Fig. 2G and H) or with the control peptide (horizontal:  $P = 0.73$ , vertical  $P = 0.91$ ,  $n = 10$  in each group; Fig. 3F and G) as compared to sham mice.

Our next step was to test whether active immunization with GluN1<sub>359-378</sub> could induce epileptogenic effects, a symptom of human NMDAR encephalitis (Geis et al., 2019) reproduced after passive transfer of NMDAR antibodies in

mouse models (Wright et al., 2015). The injection of PTZ resulted in epileptic like behavioural signs ranging from motionless staring (stage 1) to convulsions (stages 5) (Fig. 4A–F). The number of stage 4 ( $P = 0.035$ ;  $n = 10$  in each group, Fig. 4C) and the average cumulative score after 60 min ( $P = 0.035$ ; Fig. 4E) were increased in GluN1<sub>359-378</sub> mice.

We then assessed the general pathological markers induced by active immunization in GluN1<sub>359-378</sub> mice. GluN1<sub>359-378</sub> mice showed diffuse MRI T2-FLAIR hyperintensities in the brain, particularly at perivascular locations (Fig. 5A). GluN1<sub>359-378</sub> mice also showed an increase in blood–brain barrier permeability, revealed by Evan’s blue extravasation, within the whole brain (Fig. 5B and corresponding quantification:  $P = 0.028$ ,  $n = 4$  in each group; Fig. 5C). Protein concentration was increased in the CSF of GluN1<sub>359-378</sub> mice ( $P = 0.029$ ,  $n = 10$  in each group; Fig. 5D), where anti-NMDAR IgG were detected (Fig. 5E). Finally, IgG deposits were observed within the brain parenchyma, around the ventricles and in the hippocampal region (Fig. 5F). These different pathological signs occurred in the absence of positive immunostaining for the neuronal degeneration marker, Fluoro-Jade<sup>®</sup> C (Fig. 5G).

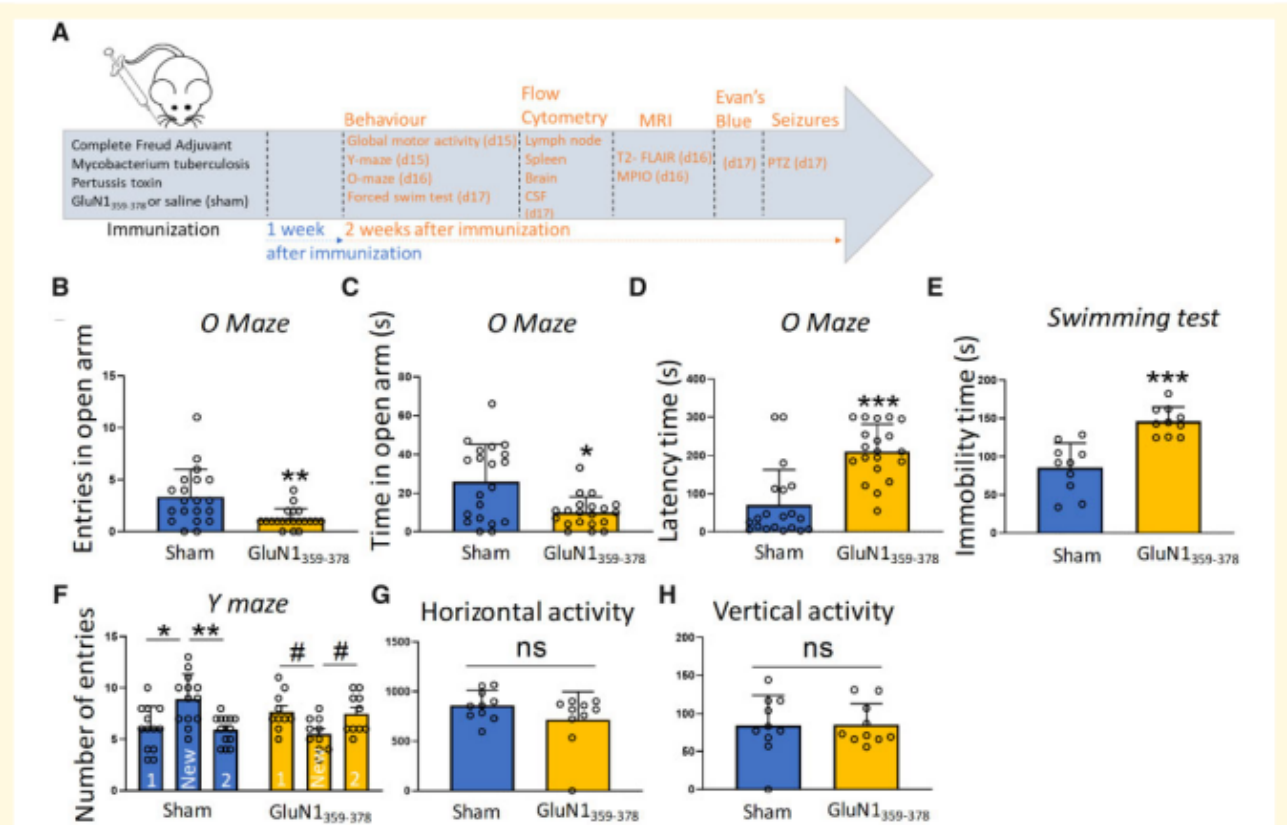
These data show that the immunization against GluN1<sub>359-378</sub> induces an autoimmune response that drives structural and behavioural impairments reminiscent of several key aspects of anti-NMDAR encephalitis.

Our next step was to explore whether the antibodies produced by the mice after immunization against GluN1<sub>359-378</sub> may influence NMDAR function. To this end, we studied the dynamics of calcium influx into cultured neurons induced by NMDA stimulation by using calcium video-microscopy (Fig. 5H–J). After two reference NMDA-induced spikes (50  $\mu\text{M}$ , 30 s), neurons were incubated with the sera from sham or GluN1<sub>359-378</sub> mice for 45 min. At the end of the incubation period, neurons were stimulated again (two stimulations with 50  $\mu\text{M}$  NMDA for 30 s). Incubation with serum from GluN1<sub>359-378</sub> mice strongly reduced the amplitude of NMDA-induced spike, while incubation with serum from sham mice had limited effects (Fig. 5H). The responsiveness compared to the first two peaks (Fig. 5I) and the global calcium response (AUC; Fig. 5J) were strongly reduced after incubation with serum from GluN1<sub>359-378</sub> mice ( $P < 0.00001$ ) as compared to incubation with serum from sham mice.

## Experimental NMDAR autoimmune encephalitis is mediated by a B-cell response

At the histological level, fibrinogen extravasation illustrated the increase in blood–brain barrier permeability in the hippocampal region of GluN1<sub>359-378</sub> animals (Fig. 6A). To address whether this increase in blood–brain barrier permeability was important for the development of the behavioural impairments, we immunized a series of animals without injecting pertussis toxin (Supplementary Fig. 1A). In this case, in

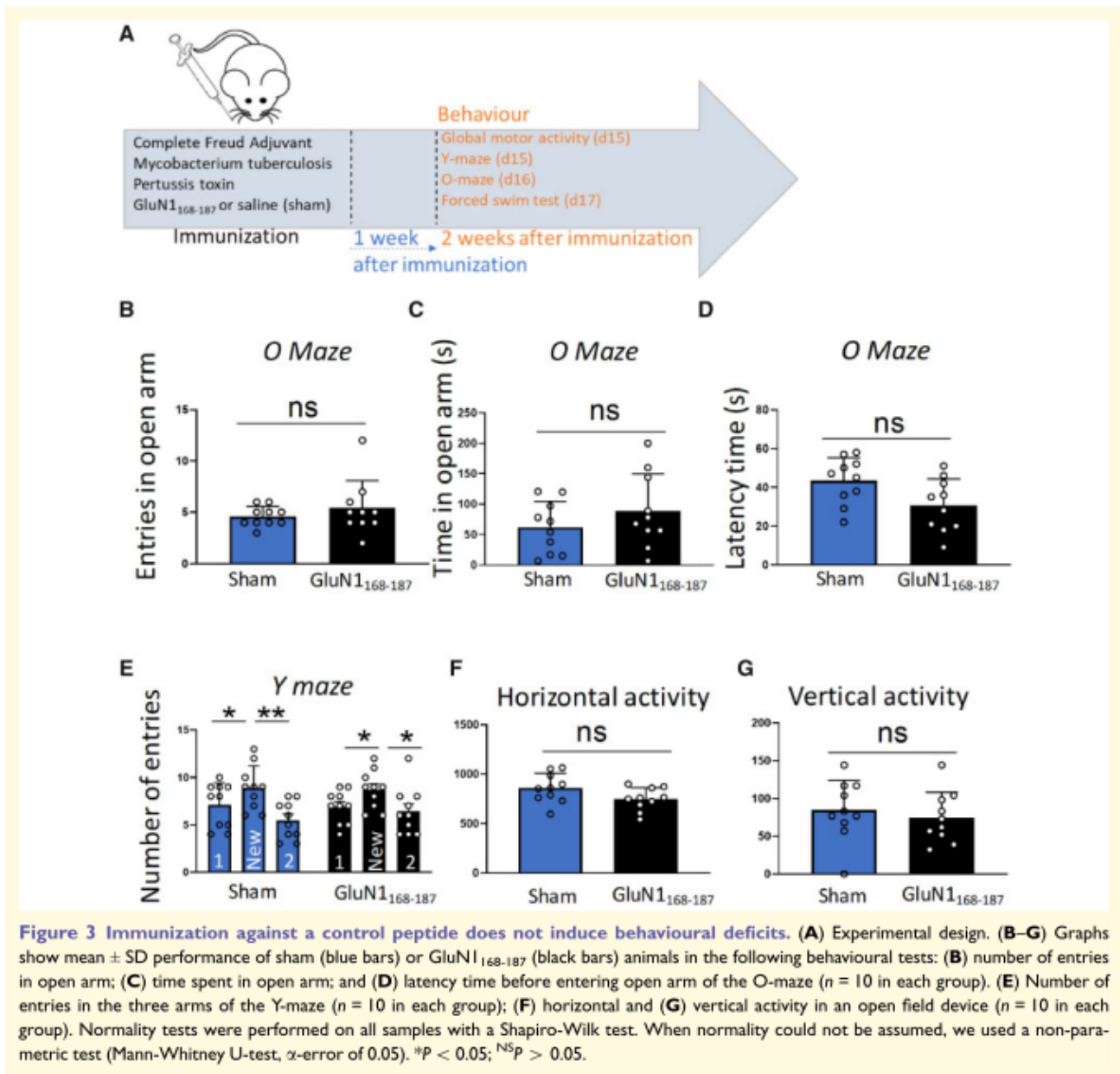




**Figure 2** Immunization against *GluN1*<sub>359-378</sub> induces anxiety- and depressive-like behaviour, and deficits in spatial memory. Graphs show mean  $\pm$  SD performance of sham (blue bars) or *GluN1*<sub>359-378</sub> (yellow bars) animals in the following behavioural tests: (A) experimental design; (B) number of entries in open arm; (C) time spent in open arm; and (D) latency time before entering open arm of the O-maze (sham  $n = 10$ ,  $n = 12$  *GluN1*<sub>359-378</sub>). (E) Immobility time in the forced swim test ( $n = 10$  in each group). (F) Number of entries in the three arms of the Y-maze ( $n = 12$  in each group). (G) Horizontal and (H) vertical activity in an open field device ( $n = 10$  in each group). Normality tests were performed on all samples with a Shapiro-Wilk test. When normality could not be assumed, we used a non-parametric test (Mann-Whitney U-test,  $\alpha$ -error of 0.05). \* $P < 0.05$  for inferior to new arm; # $P < 0.05$  for superior to new arm; <sup>NS</sup> $P > 0.05$ .

which no overt Evan's blue extravasation could be observed (Supplementary Fig. 1B), anxiety-like behaviour was absent (entries:  $P = 0.35$ , time in open arms:  $P = 0.97$ , latency time:  $P = 0.53$ ;  $n = 10$  in each group; Supplementary Fig. 1C and E) and spatial memory impairments were less marked (new arm versus arm 1:  $P = 0.007$ , new arm versus arm 2:  $P = 0.012$ ,  $n = 15$  in each group; Supplementary Fig. 1F). The increase in blood-brain barrier was not associated with endothelial expression of adhesion molecules, assessed here by molecular MRI for P-selectin (Fig. 6B), in contrast to what is observed in other models of CNS-directed autoimmune diseases (Fournier *et al.*, 2017). In line with this, few if any T-cell infiltration was observed at sites of overt blood-brain barrier permeabilization (Fig. 6C), in contrast to what is observed in other models of CNS-directed autoimmune diseases such as experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) (Fig. 6D). This absence of T-cell infiltration was confirmed by flow cytometry from the whole dissociated brain (Fig. 6E and corresponding quantification: CD4:  $P = 0.46$ , CD8:  $P = 0.082$ ,  $n = 5$  (sham) and 6 (*GluN1*<sub>359-378</sub>); Fig. 6F).

In contrast, a significant increase in B cell population, identified as B220<sup>+</sup> cells, was observed in the whole dissociated brain of *GluN1*<sub>359-378</sub> (Fig. 7A and corresponding quantification:  $P = 0.008$ ,  $n = 5$  and 6, respectively; Fig. 7B), reaching  $\sim 30\%$  of CD45<sup>+</sup> leucocytes. Interestingly, B cells were not found within the parenchyma (Fig. 7C), but rather in the meninges (Fig. 7D), ventricles (Fig. 7E), choroid plexus (Fig. 7F) and in the form of cell aggregates (Fig. 7G; corresponding quantification: meninges:  $P = 0.009$ , choroid plexus:  $P = 0.012$ , ventricles:  $P = 0.011$ , hippocampus:  $P = 1$ ,  $n = 5$  in each group; Fig. 7H). In addition, although B cells were rarely found in the CSF of sham animals, their number was increased in the CSF of *GluN1*<sub>359-378</sub> animals (Fig. 7I). Further, a substantial number of these cells matured into CD138<sup>+</sup> cells (plasma cells) (Fig. 7J). In sham animals, the vast majority (87%) of CD45<sup>+</sup> cells (leucocytes) were CD3<sup>+</sup> positive cells (T lymphocytes), while within the remaining population of CD3<sup>-</sup> cells, only 11.4% of cells were B220<sup>+</sup> (B cells) and 10.4% were CD138<sup>+</sup> (plasma cells) (Fig. 7K). In contrast, in *GluN1*<sub>359-378</sub> mice, only half of CD45<sup>+</sup> cells

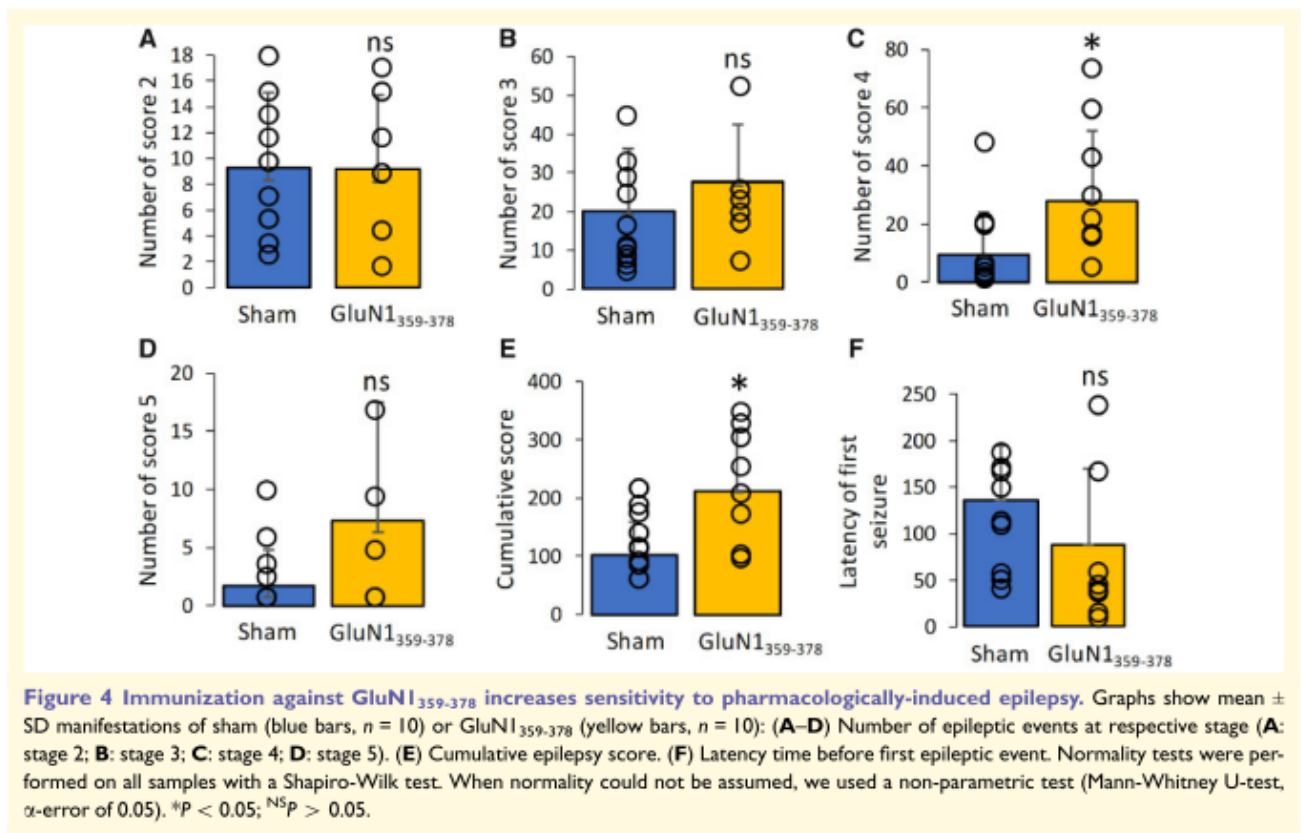


(leucocytes) were CD3<sup>+</sup> cells (T lymphocytes), and within the remaining population of CD3<sup>-</sup> cells, 33% of cells were B220<sup>+</sup> (B cells) and 27.2% were CD138<sup>+</sup> (plasmocytes) (Fig. 7K).

Some changes were observed in the myeloid populations (Supplementary Fig. 2; sham:  $n = 5$ , GluN1<sub>359-378</sub>:  $n = 6$ ). The LY6G<sup>+</sup> population (neutrophil phenotype) was increased in the brain ( $P = 0.008$ ), cervical lymph nodes ( $P = 0.0035$ ) and unchanged in the spleen ( $P = 0.78$ ) at Week 2 post-immunization (Supplementary Fig. 2A–C). Most myeloid cells were CD11b<sup>+</sup>/CD11c<sup>-</sup> cells (microglia/macrophages phenotype), while CD11b<sup>+</sup>/CD11c<sup>+</sup> cells and CD11b<sup>-</sup>/CD11c<sup>+</sup> cells (dendritic cell phenotypes) were found in low numbers (<1% of leucocytes; Supplementary

Fig. 2D). CD11b<sup>+</sup>/CD11c<sup>-</sup> cells were increased in the brain ( $P = 0.013$ ) and cervical lymph nodes ( $P = 0.008$ ) of GluN1<sub>359-378</sub> mice (Supplementary Fig. 2D and E), but not in the spleen (Supplementary Fig. 2) at that stage.

An increase in B cells and plasma cells in the CSF was only observed at 2 weeks after immunization, which corresponds to the symptomatic phase of the model. At 1 week after immunization, circulating antibodies were detected with less intensity (Supplementary Fig. 3A) than at 2 weeks post-immunization in GluN1<sub>359-378</sub> mice, and symptoms were still absent (Supplementary Fig. 3B–E). There was no increase in B cell population in the CSF of GluN1<sub>359-378</sub> mice as compared to sham animals neither in the whole dissociated brain (Supplementary Fig. 3F and corresponding



quantification Supplementary Fig. 3G) nor in the CSF (Supplementary Fig. 3H and corresponding quantification, Supplementary Fig. 3J), where no CD138<sup>+</sup> plasma cells were detected (Supplementary Fig. 3I and corresponding quantification, Supplementary Fig. 3J).

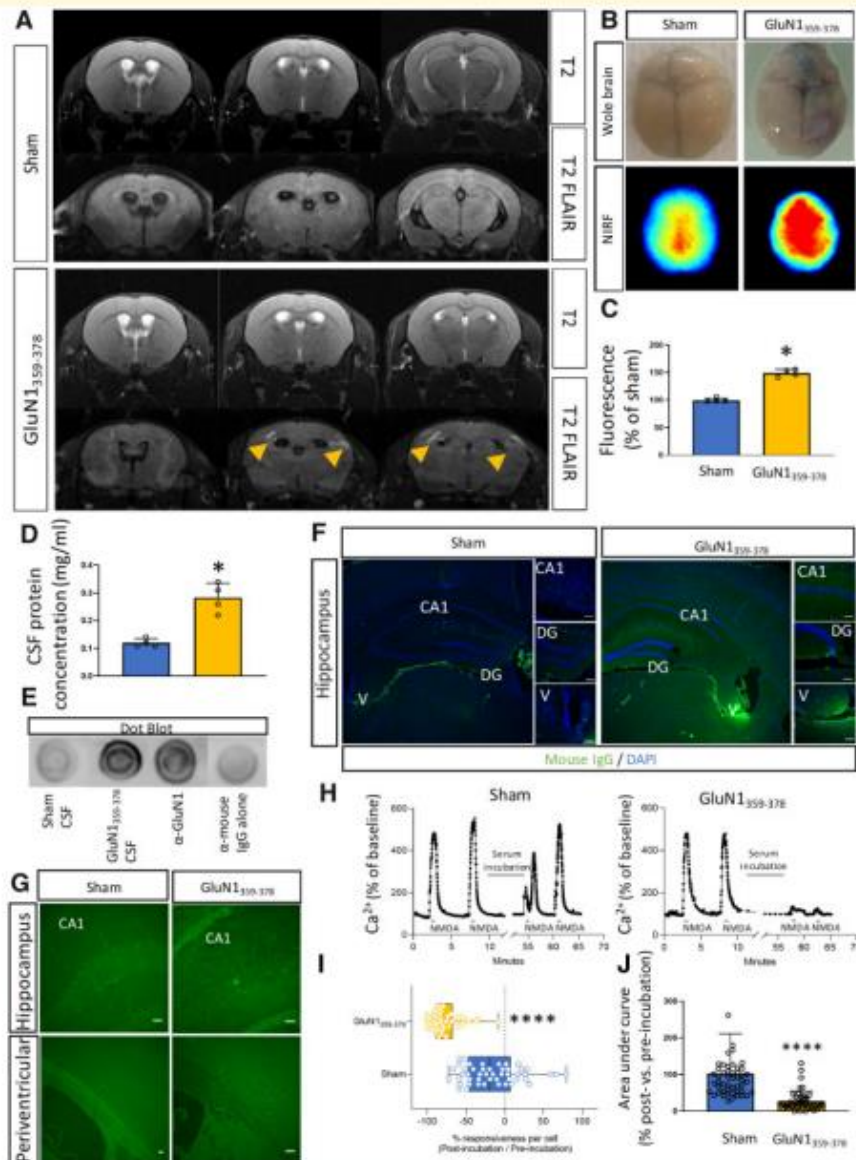
At 1 week after immunization, B220<sup>+</sup> B cells ( $P = 0.03$ ), CD8<sup>+</sup> T cells ( $P = 0.03$ ) or CD4<sup>+</sup> T cells ( $P = 0.03$ ) were increased in the spleen of GluN1<sub>359-378</sub> mice ( $n = 6$ ) as compared to sham mice ( $n = 5$ ) (Supplementary Fig. 4A and E). At 2 weeks after immunization, the number of B cells in the spleen of GluN1<sub>359-378</sub> mice went back to the level of sham mice ( $P = 0.64$ ), while the number of T4 ( $P = 0.008$ ) and T8 ( $P = 0.008$ ) cells decreased as compared to sham mice (Supplementary Fig. 4B and F). No difference in B cells ( $P = 0.19$ ) or T cells ( $P = 0.11$ ) were observed in cervical lymph node at 1 week (Supplementary Fig. 4C and G) or 2 weeks (Supplementary Fig. 4D and H) after immunization.

The above data suggest that anti-NMDAR encephalitis in GluN1<sub>359-378</sub> mice was mediated by a B-cell response. To verify this hypothesis, we depleted B cells by four injections (one injection every week) of B220 and CD19 antibodies (Carmi *et al.*, 2015) beginning 1 week before active immunization with GluN1<sub>359-378</sub> (Fig. 8A). This led to the depletion of B cells and plasmacytes, still observed at the end of the protocol (2 weeks after the last injection of depleting antibodies) (Fig. 8B, C and corresponding quantification,

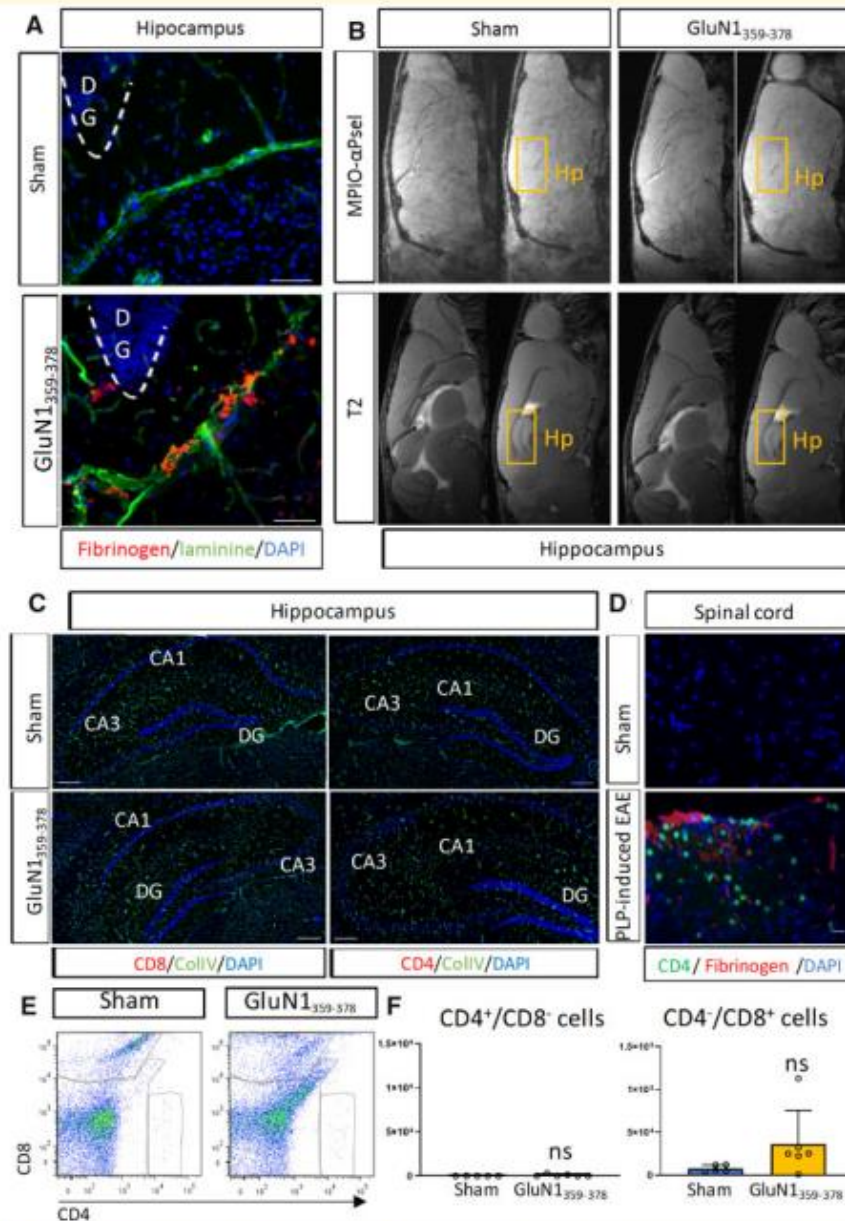
Fig. 8E), without affecting T cells (Fig. 8D and corresponding quantification, Fig. 8E).

Our next step was to assess how B-cell depletion affects the behaviour of GluN1<sub>359-378</sub> mice. Although B-cell depletion did not affect anxiety-like behaviour [entries:  $P = 0.11$ , time in open arms:  $P = 0.15$  and latency time:  $P = 1$ ,  $n = 10$  (isotype) and 9 (depleted); Fig. 8F–H], it reduced depressive-like behaviour, as B-cell-depleted GluN1<sub>359-378</sub> mice stayed immobile for a shorter time than isotype-injected GluN1<sub>359-378</sub> mice ( $P = 0.002$ ; Fig. 8I) in the swimming test. Y-maze experiments were used to assess whether B-cell depletion may also prevent the spatial memory deficit observed in GluN1<sub>359-378</sub> mice. When injected with control isotype, GluN1<sub>359-378</sub> mice failed to discriminate between new and familiar arms, as they visited the new arm as often as the familiar arms ( $P = 0.13$  and  $P = 1$ ; Fig. 8J). This indicates impairment of spatial memory in isotype-injected GluN1<sub>359-378</sub> mice. However, GluN1<sub>359-378</sub> mice depleted of B cells recover their ability to discriminate between new and familiar arms, as they visited significantly more often the new arm than the familiar arms ( $P = 0.01$  and  $P = 0.007$ ; Fig. 8J). These results indicate that the deficit of spatial memory in GluN1<sub>359-378</sub> is prevented when mice are depleted of B cells. Global motor activity (horizontal or vertical) was the same in isotype-injected or B-cell depleted GluN1<sub>359-378</sub> mice (Fig. 8K and L), which discards an influence of motor activity in the above observations.





**Figure 5** Pathological markers of encephalitis after immunization against GluN1<sub>359-378</sub>. **(A)** Representative images ( $n = 5$ ; nine slices per brain) of T<sub>2</sub>-FLAIR MRI of sham and GluN1<sub>359-378</sub> mice. Arrows show periventricular lesions. **(B)** Representative images; and **(C)** corresponding quantification of fluorescence (mean  $\pm$  SD) in brains of sham (blue bars) and GluN1<sub>359-378</sub> (yellow bars) mice ( $n = 4$  in each group) after Evan's blue injection to assess blood–brain barrier integrity. **(D)** Total protein concentration (mean  $\pm$  SD) in the CSF of sham (blue bars) and GluN1<sub>359-378</sub> (yellow bars) mice ( $n = 10$  in each group). **(E)** Immunoblotting using CSF from sham GluN1<sub>359-378</sub> mice to detect the amino-terminal domain of GluN1. GluN1 antibody (Lesept et al., 2016), an antibody directed against GluN1, was used as a positive control. The dot blot was revealed by anti-mouse IgG. Negative control was performed by omitting the primary serum (anti-mouse IgG alone). **(F)** Representative images mice ( $n = 3$  in each group, three anatomical sections: caudal, medial, rostral) of immunostaining for mouse IgG in the brain of sham and GluN1<sub>359-378</sub>. **(G)** Representative image of Fluoro-Jade<sup>C</sup> staining in the brain (hippocampus and perivascular zones) of sham and GluN1<sub>359-378</sub> mice ( $n = 3$  in each group). **(H)** Neurons were stimulated twice with NMDA (50  $\mu$ M, 30 s) at times indicated in the figure before and after incubation with serum from sham or GluN1<sub>359-378</sub> mice. Variations of mean calcium concentration in individual neurons (sham,  $n = 48$ ; GluN1<sub>359-378</sub>  $n = 46$ ; from three independent experiments) were measured by Fura-2 videomicroscopy and are expressed as percentage of basal level. **(I)** Graphs show percentage of responsiveness of each neuron after serum incubation (comparison of the AUC of calcium peaks after and before serum incubation, see 'Materials and methods' section). **(J)** Graphs show mean  $\pm$  SEM AUC of NMDA induced calcium peaks in neurons after incubation with serum from sham or GluN1<sub>359-378</sub> mice (sham,  $n = 48$ ; GluN1<sub>359-378</sub>,  $n = 46$ ; from three independent experiments).  $P < 0.00001$ , Mann-Whitney U-test. Scale bar = 50  $\mu$ m in **G**.



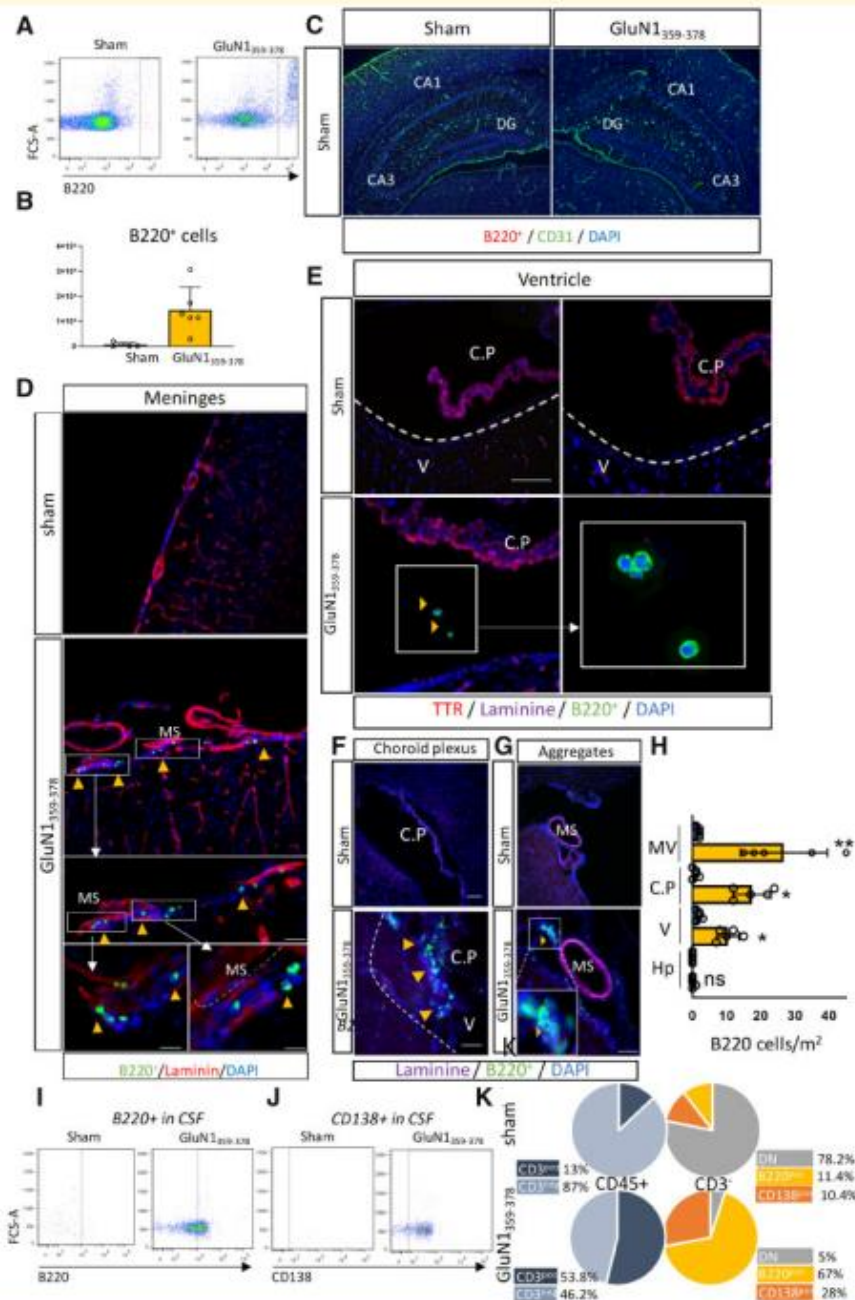
**Figure 6** Anti-NMDAR encephalitis occurs without overt T-cell recruitment. **(A)** Photomicrographs show staining for laminin (vessels, green) and fibrinogen (index of blood–brain barrier leakage, red) in the hippocampus of sham and GluN1<sub>359-378</sub> mice. Nuclei were counterstained with DAPI (blue). DG = dentate gyrus. Scale bar = 50  $\mu$ m. Representative image from  $n = 3$  in each group. **(B)** MRI images of brains from sham and GluN1<sub>359-378</sub> mice. Top: Molecular imaging after injection of MPIOs coupled to anti-P-selectin antibodies (MPIO- $\alpha$ PSel). Bottom: T<sub>2</sub>-weighted images. Hp = hippocampus. **(C)** Photomicrographs show staining for Collagen IV (vessels, green), CD4 and CD8 (lymphocytes, red) in the hippocampus of sham and GluN1<sub>359-378</sub> mice. Nuclei were counterstained with DAPI (blue). DG = dentate gyrus. Scale bar = 150  $\mu$ m. Representative image from  $n = 3$  in each group. **(D)** Photomicrographs show staining for CD4 (lymphocytes, green) and fibrinogen (index of blood–brain barrier leakage, red) in the spinal cord of sham and PLP-induced EAE mice. Nuclei were counterstained with DAPI (blue). Scale bar = 150  $\mu$ m. Representative image from  $n = 3$  in each group. **(E)** Flow cytometry for CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> cells (T lymphocytes) from sham and GluN1<sub>359-378</sub> mouse brains and **(F)** corresponding quantification (sham,  $n = 5$ ; GluN1<sub>359-378</sub>,  $n = 6$ ).

## Discussion

This study describes that active immunization of mice against GluN1<sub>359-378</sub> induces a B-cell-mediated autoimmune

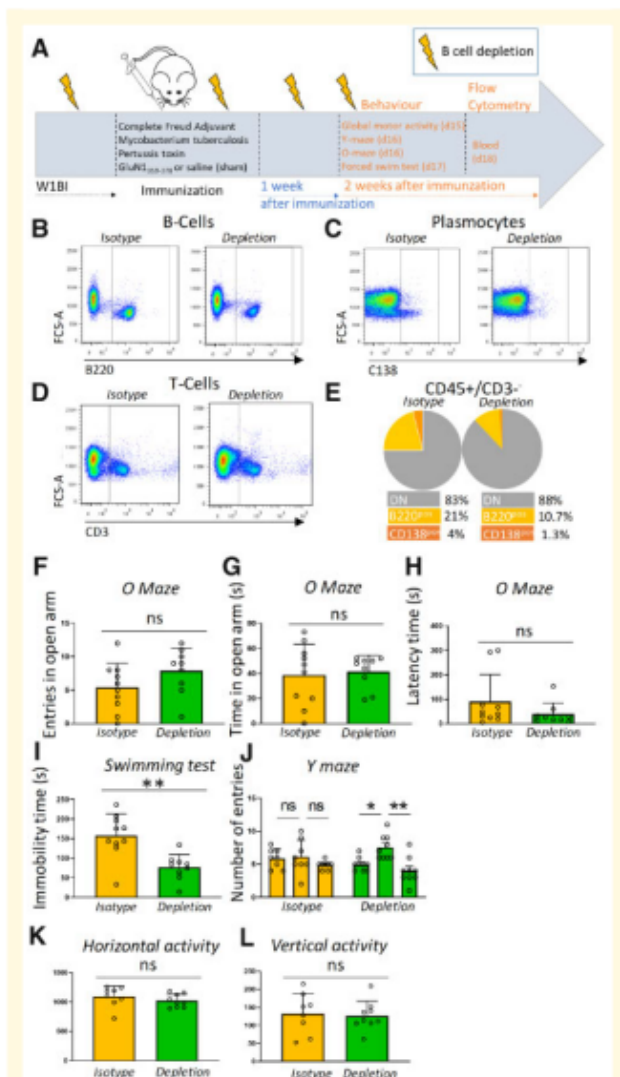
response targeting the CNS. This response features an infiltration of B-cells into the meninges, periventricular spaces and ventricles, where they differentiate into plasmocytes. This reaction is associated with encephalopathy





**Figure 7** Anti-NMDAR encephalitis occurs with B cell infiltration via leptomeningeal and circumventricular pathways. **(A)** Flow cytometry for B220+ cells (B lymphocytes) from sham and GluN1<sup>359-378</sup> mouse brains and **(B)** corresponding quantification ( $n = 5$  and  $6$ , respectively). **(C)** Photomicrographs show staining for CD31 (vessels, green) and B220 (B lymphocytes, red) in the hippocampus of sham and GluN1<sup>359-378</sup> mice. Nuclei were counterstained with DAPI (blue). Note the absence of B220+ staining. Scale bar =  $150 \mu\text{m}$ . Representative image from  $n = 3$  in each group. **(D)** Photomicrographs show staining for laminin (vessels, red) and B220 (B lymphocytes, green) in the meninges of sham and GluN1<sup>359-378</sup> mice. Nuclei were counterstained with DAPI (blue). Scale bar =  $150 \mu\text{m}$  (top) and  $20 \mu\text{m}$  (bottom). Representative image from  $n = 3$  in each group. **(E–G)** Photomicrographs show staining for Laminin (vessels, magenta), TTR (choroid plexus, red) and B220 (B lymphocytes, green) in the ventricles **(E)**, choroid plexus **(F)** and B cell aggregates **(G)** of sham and GluN1<sup>359-378</sup> mice. Nuclei were counterstained with DAPI (blue). Scale bar =  $150 \mu\text{m}$  (top) and  $20 \mu\text{m}$  (bottom). Representative image from  $n = 5$  in each group. **(H)** Corresponding quantification. CP = choroid plexus; Hp = hippocampus; MV = meningeal vessel; V = ventricle. **(I–K)** Flow cytometry for B220+ (B lymphocytes) and CD138+ (plasmocytes) and corresponding quantifications ( $n = 3$  pools of five CSF in each group).





**Figure 8** B-cell depletion prevents the progression of anti-NMDAR encephalitis. (A) Experimental design. (B–D) Flow cytometry for (A) B220<sup>+</sup> (B lymphocytes), (B) CD138<sup>+</sup> (plasmacytes) and (C) CD3<sup>+</sup> (T-Lymphocytes). (E) Corresponding quantifications ( $n = 4$  in each group). (F) Number of entries in open arm, (G) time spent in open arm and (H) latency time before entering open arm of the O-maze (isotype,  $n = 10$ ; depleted,  $n = 9$ ). (I) Immobility time in the forced swim test ( $n = 9$  in each group). (J) Number of entries in the three arms of the Y-maze (isotype,  $n = 10$ ; depleted,  $n = 9$ ). (K) Horizontal and (L) vertical activity in an open field device (isotype,  $n = 10$ ; depleted,  $n = 9$ ). Graphs show mean  $\pm$  SD performance of GluN1<sub>359-378</sub> mice with B-cell depletion (green bars) or isotype injection (yellow bars). Normality tests were performed on all samples with a Shapiro-Wilk test. When normality could not be assumed, we used a non-parametric test (Mann-Whitney U-test,  $\alpha$ -error of 0.05). \* $P < 0.05$  inferior to new arm; # $P < 0.05$  superior to new arm; <sup>NS</sup> $P > 0.05$ .

characterized by blood–brain barrier opening, periventricular FLAIR hyperintensities and IgG deposits. Two weeks after immunization, mice develop cognitive, emotional and

behavioural impairments. This paradigm provides a novel immune-mediated model of anti-NMDAR encephalitis that could be complementary to the existing models (Planagumà *et al.*, 2015; Pan *et al.*, 2019). It should be used in further studies to dissect the autoimmune processes leading to the intrathecal production of these antibodies and the mechanisms of their action. It could also provide a platform to test therapeutic strategies targeting the immune system in anti-NMDAR encephalitis.

Mice subjected to this paradigm show symptoms that are reminiscent of human anti-NMDAR encephalitis: memory impairments, anxiety- and depressive-like behaviours, and increased sensitivity to seizures. These symptoms are similar to those observed in previous works (Planagumà *et al.*, 2015; Wright *et al.*, 2015), despite distinct experimental paradigms. Interestingly, serum from GluN1<sub>359-378</sub> mice strongly reduced NMDA-induced calcium influx *in vitro*, which supports the relevance of the autoantibodies produced in this model and gives a possible link with the symptoms observed *in vivo*. Overall, it confirms that an immune reaction against NMDAR can lead to adverse effects *in vivo*, whatever the way this reaction is induced: direct injection or infusion of antibodies into the ventricles (Planagumà *et al.*, 2015; Malviya *et al.*, 2017; Taraschenko *et al.*, 2019), stereotactic injection of patient CSF into the parenchyma (Blome *et al.*, 2018), or active immunization, as is the case in the present work.

Interestingly, only anti-NMDAR antibodies from patients, but not from healthy subjects, induce synapse disorganization (Jézéquel *et al.*, 2017) and the effect of CSF from different patients induce variable effects (Blome *et al.*, 2018). This suggests that the epitope targeted by these antibodies is critical. Accordingly, active immunization or injection of anti-NMDA antibodies targeting other epitopes than the one involved in encephalitis have provided beneficial effects in models of brain haemorrhage (Gaberel *et al.*, 2013), ischaemic stroke (Macrez *et al.*, 2011) or multiple sclerosis (Macrez *et al.*, 2016). In the present study, active immunization against the amino acids 168 to 187 of the NMDA receptor—a site of positive regulation of NMDAR function (Lesept *et al.*, 2016)—did not induce any encephalitogenic effects. This observation in our experimental context contrasts with an earlier study describing that human circulating anti NMDAR antibodies (purified from healthy donors or from patients with schizophrenia, anti-NMDA encephalitis or hypertension) act regardless of their target epitope to induce NMDAR dysfunction (Castillo-Gómez *et al.*, 2017). This previous work may not exhaustively reflect the full variety of epitopes targeted by naturally occurring, autoreactive anti-NMDAR antibodies in humans. Further studies in a larger number of patients may resolve this point.

Of note, when injected intravenously in mice, human circulating anti-NMDAR antibodies induce effects on motor activity, but this occurs only when the blood–brain barrier permeability is impaired (Hammer *et al.*, 2014). This underlines the fact that anti-NMDAR antibodies must reach the CNS to induce their deleterious effects. In contrast, some

actions of anti-NMDAR antibodies outside the CNS, such as modulation of endothelial NMDAR activity, can provide beneficial effects in neuroinflammatory context (Macrez *et al.*, 2016). Further studies should address whether anti-NMDAR autoantibodies may interfere with described functions of non-neuronal NMDAR (Hogan-Cann and Anderson, 2016) in animal models of anti-NMDAR encephalitis.

Overall, these different points of discussion indicate that anti-NMDAR antibodies can provide various effects (beneficial, neutral or deleterious) depending on their target epitope, the context (healthy versus neuroinflammation), the localization of their action (intra- versus extra-CNS) or their target cell (neural versus non neural cells).

The behavioural impairments observed in the present study are more pronounced than those reported previously with a different paradigm (Pan *et al.*, 2019): these deficits are multiple (anxiety- and depressive-like behaviours, spatial memory impairment and increased sensitivity to seizures) and they occur spontaneously (in the absence of injection of the NMDA antagonist MK801). These differences could be linked to differences in the experimental design, including the target peptide (a single peptide focusing on N368/G369 versus four different peptides distributed on GluN1 extracellular sequence). Interestingly, one of these four peptides encompasses the same amino acids as the one used in the present study, which may indicate that other factors, besides the epitope, could be relevant in determining the effects of the antibodies, particularly in animal models. Another important difference with this previous study is the age (8–10-week-old mice versus 12-month-old mice). This latter parameter is likely to be critical, as the migration of B cells and their ability to produce antibodies is impaired as mice age (Turner and Mabbott, 2017). In line with this, anti-NMDAR encephalitis mostly affects young patients.

In the present study, NMDAR encephalitis is mediated by a B-cell response, without parenchyma infiltration or contribution of T cells. These findings are in contrast with another recent model (Jones *et al.*, 2019) in which mature T cells as well as antibody-producing cells were required for disease induction. A major difference in the study design was the material used for immunization and may explain this dissimilarity in the pathological mechanisms: in this previous study, mice were immunized with GluN1/GluN2B NMDA fully-assembled tetrameric receptors embedded in liposomes, in contrast to the small peptides injected without carriers in the present work. This indicates that different study designs can model NMDA encephalitis with a different respective involvement of B- or T-cell responses. The complementarity of these models gives interesting perspectives for further studies.

In any case, our study confirms the observation that the symptoms can occur in the absence of overt T cell and myeloid cell responses (Pan *et al.*, 2019) and brings an important new element by the description of a B-cell response after active immunization against GluN1. This response is characterized by an increase in the number of B cells in the peripheral lymphoid organs, followed by their migration

towards the meninges, passage to the ventricles and differentiation into plasma cells. The precise mechanisms responsible for B cell migration towards the brain in this model remain to be investigated. Assessing cytokine and chemokine levels may give important clues in this instance. This B-cell response is particularly relevant to the human pathology, as these cells are found in the CSF of patients (Dale *et al.*, 2013). In line with this, the nature of the inflammatory infiltrates is reminiscent of the clinical situation, in which rare T-cell infiltrates are detected (Tüzün *et al.*, 2009) and CD138<sup>+</sup> cells are the main component of inflammatory infiltrates (Martinez-Hernandez *et al.*, 2011). These observations have provided the basis for the use of anti-B cell therapy using Rituximab<sup>®</sup>, a monoclonal anti-CD20 antibody (Hohlfeld, 2018). Here, the depletion of B cells prevented the depression-like symptoms and the impairments in spatial memory observed in GluN1<sub>359-378</sub> mice. This confirms the central role of the B-cell response in the establishment of encephalitis-like symptoms in these mice.

The differentiation of B cells into plasma cells coincides in the ventricles with an increase in protein concentration and the detection of anti-NMDAR IgG in the CSF. This suggests that these plasma cells are responsible for the production of anti-NMDAR autoantibodies. In fact, we detected antibodies within the brain tissue, around the ventricles and in the hippocampus, which suggests that these antibodies diffuse from the ventricles to the tissue, as is the case in previously reported models where antibodies are infused into the ventricles (Planagumà *et al.*, 2015). However, the reduction of deficits observed here in the absence of PTX injection suggests that other mechanisms are important to induce a full behavioural phenotype. PTX targets various mediators of the immune system such TLR4, chemokine receptors or regulatory T cells and induces blood–brain barrier permeation, as confirmed here. This may indicate that one or several of these PTX-mediated effects may be important for the establishment of symptoms, in addition to B-cell-mediated processes. The fact that the prevention of behaviour impairments is only partial after both B-cell depletion and PTX omission is in favour of this hypothesis, which should be tested in further studies. Finally, evaluating the respective Ig isotypes found in the CSF, brain and serum could help addressing this point further.

The model described here may provide a useful platform for further studies aimed at testing therapies for anti-NMDAR encephalitis. Given the pathophysiology described in the present work, this model may prove particularly relevant for new therapies targeting B cells. This may include B cell-directed antibodies, autoantigen specific B-cell depleting therapy or B-cell receptor signalling inhibition (Musette and Bouaziz, 2018).

## Acknowledgements

We would like to thank Antoine Fournier, Marina Rubio, Izaskun Buendia, Yannick Hommet, Laurent Lebouvier and Isabelle Bardou for their input to this work.



## Funding

I.W., P.H. and C.R. received fellowships from the Regional Council of Normandy. This work was supported by the French ANR (Agence Nationale pour la Recherche).

## Competing interests

The authors report no competing interests.

## Supplementary material

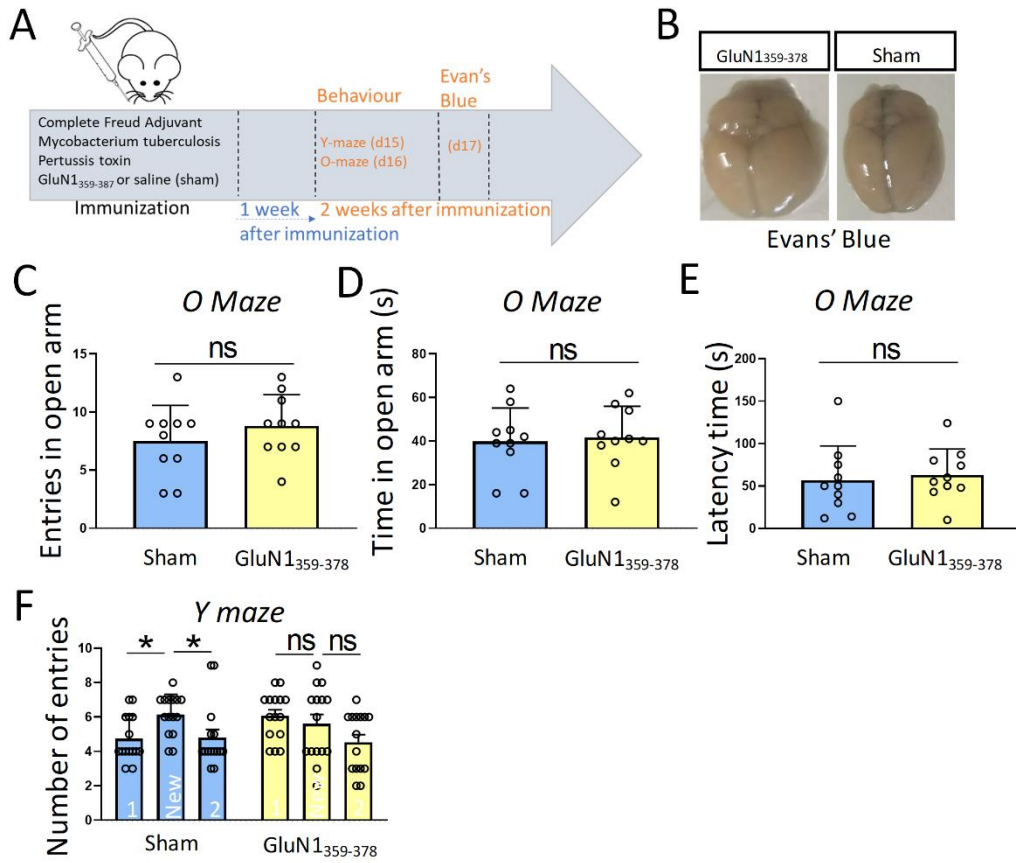
Supplementary material is available at *Brain* online.

## References

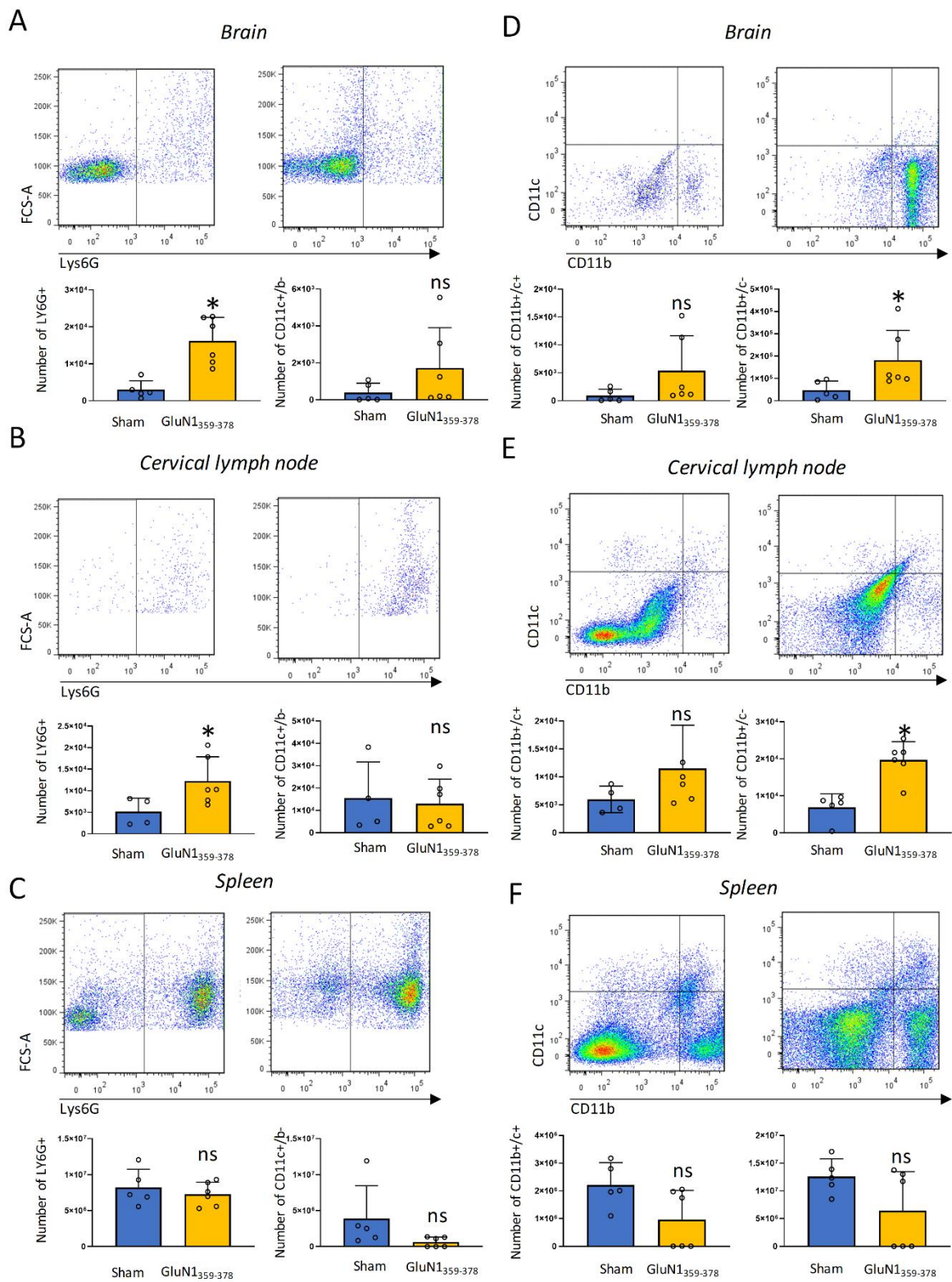
- Blome R, Bach W, Guli X, Porath K, Sellmann T, Bien CG, et al. Differentially altered NMDAR dependent and independent long-term potentiation in the CA3 subfield in a model of anti-NMDAR encephalitis. *Front Synaptic Neurosci* 2018; 10: 26.
- Carmi Y, Spitzer MH, Linde IL, Burt BM, Prestwood TR, Perlman N, et al. Allogeic IgG combined with dendritic cell stimuli induce antitumour T-cell immunity. *Nature* 2015; 521: 99–104.
- Castillo-Gómez E, Oliveira B, Tapken D, Bertrand S, Klein-Schmidt C, Pan H, et al. All naturally occurring autoantibodies against the NMDA receptor subunit NR1 have pathogenic potential irrespective of epitope and immunoglobulin class. *Mol Psychiatry* 2017; 22: 1776–84.
- Cryan JF, Holmes A. The ascent of mouse: advances in modelling human depression and anxiety. *Nat Rev Drug Discov* 2005; 4: 775–90.
- Dale RC, Pillai S, Brilot F. Cerebrospinal fluid CD19(+) B-cell expansion in N-methyl-D-aspartate receptor encephalitis. *Dev Med Child Neurol* 2013; 55: 191–3.
- Dalmau J, Gleichman AJ, Hughes EG, Rossi JE, Peng X, Lai M, et al. Anti-NMDA-receptor encephalitis: case series and analysis of the effects of antibodies. *Lancet Neurol* 2008; 7: 1091–8.
- DeSena AD, Greenberg BM, Graves D. ‘Light switch’ mental status changes and irritable insomnia are two particularly salient features of anti-NMDA receptor antibody encephalitis. *Pediatr Neurol* 2014; 51: 151–3.
- Finke C, Kopp UA, Prüss H, Dalmau J, Wandinger K-P, Ploner CJ. Cognitive deficits following anti-NMDA receptor encephalitis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2012; 83: 195–8.
- Fournier AP, Quenault A, Martinez de Lizarrondo S, Gauberti M, Defer G, Vivien D, et al. Prediction of disease activity in models of multiple sclerosis by molecular magnetic resonance imaging of P-selectin. *Proc Natl Acad Sci USA* 2017; 114: 6116–21.
- Gaberel T, Macrez R, Gauberti M, Montagne A, Hebert M, Petersen K-U, et al. Immunotherapy blocking the tissue plasminogen activator-dependent activation of N-methyl-D-aspartate glutamate receptors improves hemorrhagic stroke outcome. *Neuropharmacology* 2013; 67: 267–71.
- Geis C, Planagumà J, Carreño M, Graus F, Dalmau J. Autoimmune seizures and epilepsy. *J Clin Invest* 2019; 129: 926–40.
- Gleichman AJ, Spruce LA, Dalmau J, Seeholzer SH, Lynch DR. Anti-NMDA receptor encephalitis antibody binding is dependent on amino acid identity of a small region within the GluN1 amino terminal domain. *J Neurosci* 2012; 32: 11082–94.
- Gresa-Arribas N, Titulaer MJ, Torrents A, Aguilar E, McCracken L, Leypoldt F, et al. Antibody titres at diagnosis and during follow-up of anti-NMDA receptor encephalitis: a retrospective study. *Lancet Neurol* 2014; 13: 167–77.
- Hammer C, Stepniak B, Schneider A, Papiol S, Tantra M, Begemann M, et al. Neuropsychiatric disease relevance of circulating anti-NMDA receptor autoantibodies depends on blood-brain barrier integrity. *Mol Psychiatry* 2014; 19: 1143–9.
- Hara M, Martinez-Hernandez E, Ariño H, Armangué T, Spatola M, Petit-Pedrol M, et al. Clinical and pathogenic significance of IgG, IgA, and IgM antibodies against the NMDA receptor. *Neurology* 2018; 90: e1386–94.
- Hogan-Cann AD, Anderson CM. Physiological roles of non-neuronal NMDA receptors. *Trends Pharmacol Sci* 2016; 37: 750–67.
- Hohlfeld R. B-cells as therapeutic targets in neuro-inflammatory diseases. *Clin Immunol* 2018; 186: 51–3.
- Irani SR, Bera K, Waters P, Zuliani L, Maxwell S, Zandi MS, et al. N-methyl-D-aspartate antibody encephalitis: temporal progression of clinical and paraclinical observations in a predominantly non-paraneoplastic disorder of both sexes. *Brain* 2010; 133: 1655–67.
- Jézéquel J, Johansson EM, Dupuis JP, Rogemond V, Gréa H, Kellermayer B, et al. Dynamic disorganization of synaptic NMDA receptors triggered by autoantibodies from psychotic patients. *Nat Commun* 2017; 8: 1791.
- Jones BE, Tovar KR, Goehring A, Jalali-Yazdi F, Okada NJ, Gouaux E, et al. Autoimmune receptor encephalitis in mice induced by active immunization with conformationally-stabilized holoreceptors. *Sci Transl Med* 2019; 11: eaaw0044.
- Kraeuter A-K, Guest PC, Sarnyai Z. The Y-maze for assessment of spatial working and reference memory in mice. *Methods Mol Biol* 2019; 1916: 105–11.
- Lesept F, Chevilly A, Jezequel J, Ladépêche L, Macrez R, Aimable M, et al. Tissue-type plasminogen activator controls neuronal death by raising surface dynamics of extrasynaptic NMDA receptors. *Cell Death Dis* 2016; 7: e2466.
- Lüttjohann A, Fabene PF, van Luijckelaar G. A revised Racine’s scale for PTZ-induced seizures in rats. *Physiol Behav* 2009; 98: 579–86.
- Macrez R, Obiang P, Gauberti M, Roussel B, Baron A, Parcq J, et al. Antibodies preventing the interaction of tissue-type plasminogen activator with N-methyl-D-aspartate receptors reduce stroke damages and extend the therapeutic window of thrombolysis. *Stroke* 2011; 42: 2315–22.
- Macrez R, Ortega MC, Bardou I, Mehra A, Fournier A, Van der Pol SMA, et al. Neuroendothelial NMDA receptors as therapeutic targets in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain* 2016; 139: 2406–19.
- Malviya M, Barman S, Golombeck KS, Planagumà J, Mannara F, Strutz-Seebohm N, et al. NMDAR encephalitis: passive transfer from man to mouse by a recombinant antibody. *Ann Clin Transl Neurol* 2017; 4: 768–83.
- Martinez-Hernandez E, Horvath J, Shiloh-Malawsky Y, Sangha N, Martinez-Lage M, Dalmau J. Analysis of complement and plasma cells in the brain of patients with anti-NMDAR encephalitis. *Neurology* 2011; 77: 589–93.
- Michel L, Grasmuck C, Charabati M, Lécuyer M-A, Zandee S, Dhazee T, et al. Activated leukocyte cell adhesion molecule regulates B lymphocyte migration across central nervous system barriers. *Sci Transl Med* 2019; 11: eaaw0475.
- Mikasova L, De Rossi P, Bouchet D, Georges F, Rogemond V, Didelot A, et al. Disrupted surface cross-talk between NMDA and Ephrin-B2 receptors in anti-NMDA encephalitis. *Brain* 2012; 135: 1606–21.
- Musette P, Bouaziz JB. Cell modulation strategies in autoimmune diseases: new concepts. *Front Immunol* 2018; 9: 622.
- Nicole O, Docagne F, Ali C, Margail I, Carmeliet P, Mackenzie ET, et al. The proteolytic activity of tissue-plasminogen activator enhances NMDA receptor-mediated signaling. *Nat Med* 2001; 7: 59–64.
- Nosadini M, Mohammad SS, Corazza F, Ruga EM, Kothur K, Perilongo G, et al. Herpes simplex virus-induced anti-N-methyl-d-aspartate receptor encephalitis: a systematic literature review with analysis of 43 cases. *Dev Med Child Neurol* 2017; 59: 796–805.

- Pan H, Oliveira B, Saher G, Dere E, Tapken D, Mitjans M, et al. Uncoupling the widespread occurrence of anti-NMDAR1 autoantibodies from neuropsychiatric disease in a novel autoimmune model. *Mol Psychiatry* 2019; 24: 1489–501.
- Planagumà J, Leyboldt F, Mannara F, Gutiérrez-Cuesta J, Martín-García E, Aguilar E, et al. Human N-methyl D-aspartate receptor antibodies alter memory and behaviour in mice. *Brain* 2015; 138: 94–109.
- Schmued LC, Stowers CC, Scallet AC, Xu L. Fluoro-Jade C results in ultra high resolution and contrast labeling of degenerating neurons. *Brain Res* 2005; 1035: 24–31.
- Slattery DA, Cryan JF. Using the rat forced swim test to assess anti-depressant-like activity in rodents. *Nat Protoc* 2012; 7: 1009–14.
- Taraschenko O, Fox HS, Pittock SJ, Zekeridou A, Gafurova M, Eldridge E, et al. A mouse model of seizures in anti-N-methyl-d-aspartate receptor encephalitis. *Epilepsia* 2019; 60: 452–63.
- Turner VM, Mabbott NA. Ageing adversely affects the migration and function of marginal zone B cells. *Immunology* 2017; 151: 349–62.
- Tüzün E, Zhou L, Baehring JM, Bannykh S, Rosenfeld MR, Dalmau J. Evidence for antibody-mediated pathogenesis in anti-NMDAR encephalitis associated with ovarian teratoma. *Acta Neuropathol* 2009; 118: 737–43.
- Vincent A, Bien CG. Anti-NMDA-receptor encephalitis: a cause of psychiatric, seizure, and movement disorders in young adults. *Lancet Neurol* 2008; 7: 1074–5.
- Whittaker Hawkins RF, Patenaude A, Dumas A, Jain R, Tesfagiorgis Y, Kerfoot S, et al. ICAM1+ neutrophils promote chronic inflammation via ASPRV1 in B cell-dependent autoimmune encephalomyelitis. *JCI Insight* 2017; 2: e96882.
- Wright S, Hashemi K, Stasiak L, Bartram J, Lang B, Vincent A, et al. Epileptogenic effects of NMDAR antibodies in a passive transfer mouse model. *Brain* 2015; 138: 3159–67.

Supplementary figures

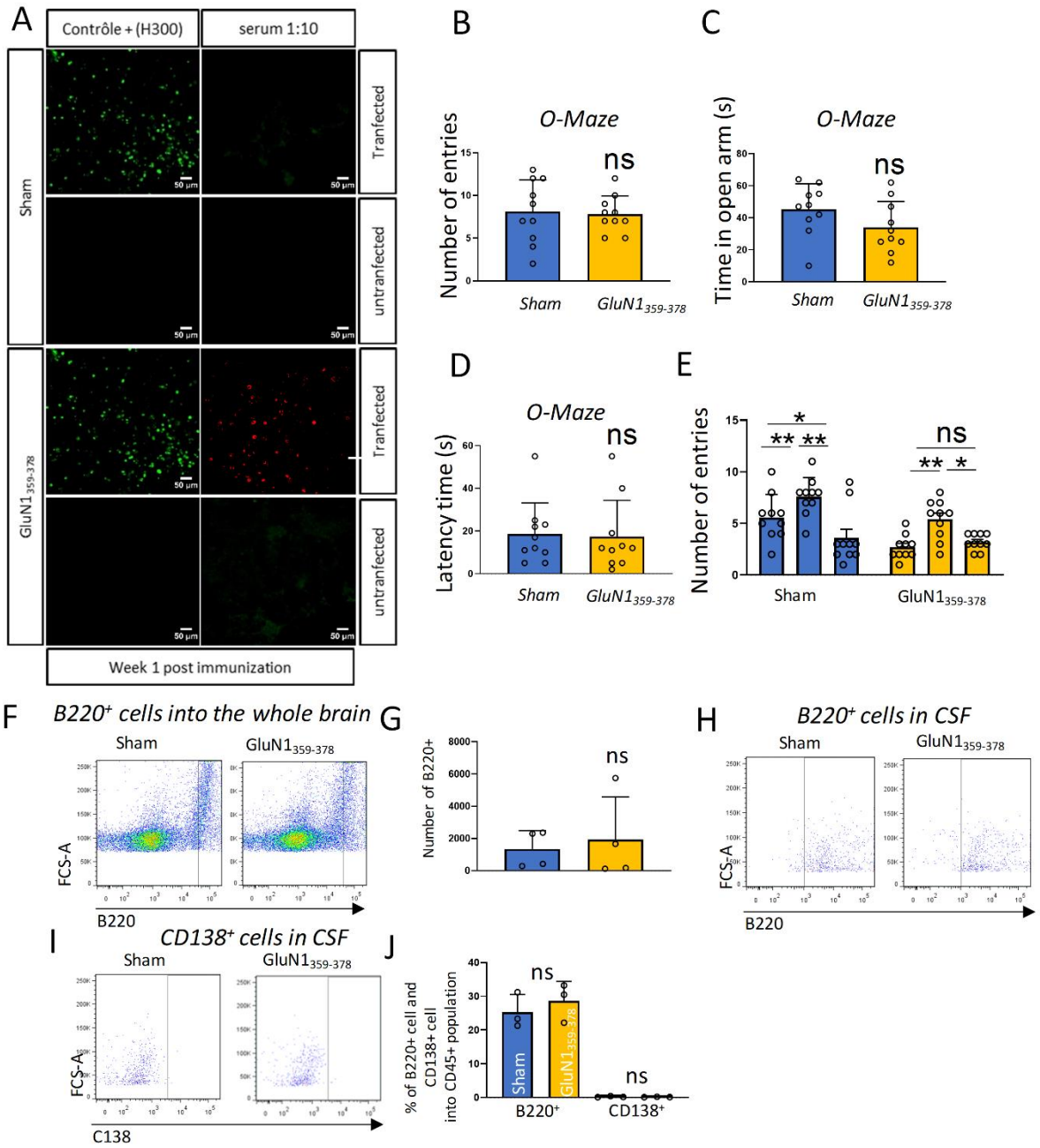


Suppl Fig 1

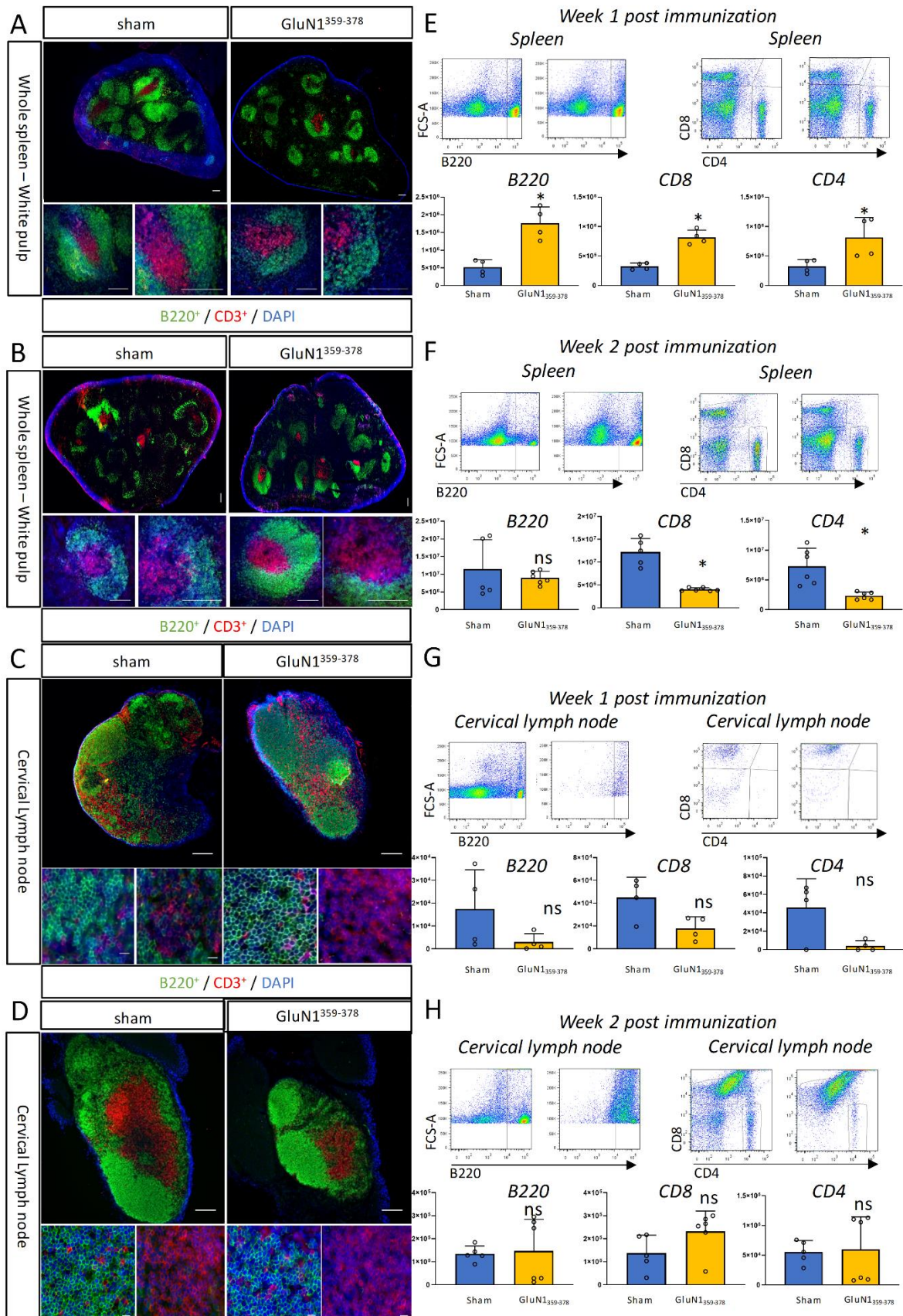


**Suppl Fig 2**





**Suppl Fig 3**



Suppl Fig 4



## Travail secondaire en dehors du contexte de la thèse

*VI-B: Article 2: Environmental enrichment alleviates the deleterious effects of stress in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE).*

### Contexte de ce travail

*J'ai participé à ce travail lors de mon stage de master 1 recherche en neurosciences, au sein de l'unité INSERM U1237 dirigée par le Professeur Denis Vivien et sous la direction des Docteurs Fabian Docagne et Richard Macrez. Ce travail, articulé autour du travail de thèse du Docteur Antoine Fournier, est centré sur les effets délétères d'un stress aigu répété dans un modèle murin de sclérose en plaques récurrent-rémittent. Ce travail se base sur des observations cliniques appuyant l'hypothèse que les événements stressants apparaissant dans la vie d'un individu atteint de SEP comme la perte d'un emploi ou bien encore un décès, peuvent augmenter l'occurrence des rechutes chez ces patients. A l'inverse, des stratégies de réduction de ces événements stressants, comme l'introduction de la méditation, peuvent moduler cet effet néfaste du stress et inverser l'apparition des rechutes induites par le stress chez ces mêmes sujets. Lors de ce travail, j'ai pu me former à l'induction de mes premiers modèles EAE chez la souris ainsi qu'à leur suivi quotidien. J'ai également été introduite à la réalisation de mes premiers tests comportementaux, et notamment celui utilisé dans le cadre de ce travail : le test d'évitement de l'eau (WAS - Water Avoidance Stress). Ce travail nous a fourni des résultats encourageants quant à notre hypothèse de départ et nous ont permis de rédiger cet article dans lequel je suis **troisième auteure**. Ce travail a été publié dans le journal "**Multiple Sclerosis Journal Experimental, Translational and clinical** »*

*L'article est introduit ci-après.*

**Titre :** *Un environnement enrichi atténue les effets délétères du stress dans un modèle d'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE).*

**Title:** *Environmental enrichment alleviates the deleterious effects of stress in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE).*

**Contexte de l'étude :** *Les observations cliniques appuient l'hypothèse que les événements stressants (perte d'un emploi, décès) augmentent l'occurrence des rechutes chez les patients atteints de sclérose en plaques. A l'inverse, les stratégies de réduction de stress, comme la méditation, peuvent moduler cet effet néfaste du stress. Cependant, une relation directe de cause à effet entre le niveau de stress et les rechutes ne peut pas être fermement établie à partir de ces données.*

**Objectif de l'étude :** *Le but de ce travail a été de déterminer si la modulation du stress (induction ou diminution) pouvait interférer avec la rechute des symptômes dans un modèle animal de sclérose en plaques récurrent/rémittent (RR).*

**Résultats :** Avec cette étude, nous rapportons qu'un stress aigu répété induit une augmentation de l'incidence des rechutes dans l'EAE de type RR. D'autre part, la mise en place d'un environnement enrichi réduit l'incidence et la gravité des rechutes, et reverse les effets d'un stress aigu répété chez la souris. Ces données fournissent une plate-forme pour d'autres études sur les processus biologiques qui relient le stress et les rechutes dans la SEP via un modèle animal approprié.

**Mots clés :** stress psychologique, sclérose en plaques, rechute, stress d'évitement de l'eau, environnement enrichi.



# Environmental enrichment alleviates the deleterious effects of stress in experimental autoimmune encephalomyelitis

Antoine Philippe Fournier, Erwan Baudron, Isabelle Wagnon, Philippe Aubert, Denis Vivien, Michel Neunlist, Isabelle Bardou and Fabian Docagne

Multiple Sclerosis Journal—  
Experimental, Translational  
and Clinical

October–December 2020, 1–9

DOI: 10.1177/  
2055217320959806

© The Author(s), 2020.  
Article reuse guidelines:  
sagepub.com/journals-  
permissions

## Abstract

**Background:** Clinical observations support the hypothesis that stressful events increase relapse occurrence in multiple sclerosis patients, while stress-reduction strategies can modulate this effect. However, a direct cause-effect relationship between stress level and relapse cannot be firmly established from these data.

**Objectives:** The purpose of this work was to address whether modulation of stress could interfere with symptom relapse in an animal model of multiple sclerosis with relapsing-remitting course.

**Methods:** Mice bred in standard or enriched environment were subjected to repeated acute stress during the remission phase of relapsing-remitting PLP-induced experimental autoimmune encephalomyelitis.

**Results:** We report that repeated acute stress induced a twofold increase in relapse incidence in experimental autoimmune encephalomyelitis. On the other hand, environmental enrichment reduced relapse incidence and severity, and reversed the effects of repeated acute stress.

**Conclusion:** These data provide the platform for further studies on the biological processes that link stress and multiple sclerosis relapses in a suitable animal model.

**Keywords:** Psychological stress, multiple sclerosis, relapse, water avoidance stress, environmental enrichment

Date received: 11 May 2020; accepted: 29 August 2020

## Introduction

Multiple sclerosis (MS) is a chronic inflammatory disease of the central nervous system that leads to various neurological manifestations, including sensitive and motor symptoms. In the most frequent form, the relapsing-remitting subtype, these symptoms occur in an unpredictable manner during periods of relapses, followed by periods of remissions when signs of disease activity are reduced or absent. There is considerable interest in identifying the factors that lead to the occurrence of relapse.

Clinical observations have suggested a link between acute stress and occurrence of relapses in MS patients. Considering the lack of prospective studies using objective measures of stress, there is still no

consensus to conclude on the effect of stress on MS onset and relapses.<sup>1</sup> However, several studies report that acute stressful life events (marital separation, difficulties at work, changes in place of residence, death of a relative, etc.)<sup>2</sup> increase the probability for MS patients to experience a relapse.<sup>3</sup> A prospective study showed that three or more stressful life events in a four week period led to a fivefold increase of MS relapse rate, and that the presence of at least one stressful life events is sufficient to increase by threefold the rate of relapse during the following four weeks.<sup>4</sup> Conversely, stress reduction strategies have shown positive effects in MS patients.<sup>5</sup>

Considering these clinical observations, several studies have attempted to reproduce the effects of

Antoine Philippe Fournier, Erwan Baudron, Isabelle Bardou and Fabian Docagne contributed equally to this study.

Correspondence to:  
**Fabian Docagne**,  
Normandie Univ, Unicaen,  
Inserm, Physiopathology and  
Imaging of Neurological  
Disorders, Cycleron Centre,  
Institut Blood and  
Brain@Caen-Normandie,  
Caen, France.  
docagne@eyceron.fr

**Antoine Philippe Fournier**,  
Normandie Univ, Unicaen,  
Inserm, Physiopathology and  
Imaging of Neurological  
Disorders, Cycleron Centre,  
Institut Blood and  
Brain@Caen-Normandie,  
Caen, France

Université de Montréal,  
Faculté de Médecine,  
Département de  
Neuroscience, Montréal,  
Canada

**Erwan Baudron,**  
**Isabelle Wagnon,**  
Normandie Univ, Unicaen,  
Inserm, Physiopathology and  
Imaging of Neurological  
Disorders, Cyceron Centre,  
Institut Blood and  
Brain@Caen-Normandie,  
Caen, France

**Philippe Aubert,**  
Université de Nantes,  
Inserm, The Enteric Nervous  
System in Gut and Brain  
Disorders, Nantes, France  
Institut des Maladies de  
l'Appareil Digestif, Nantes,  
France

**Denis Vivien,**  
Normandie Univ, Unicaen,  
Inserm, Physiopathology and  
Imaging of Neurological  
Disorders, Cyceron Centre,  
Institut Blood and  
Brain@Caen-Normandie,  
Caen, France  
Department of clinical  
research, CHU Côte de  
Nacre, Caen, France

**Michel Neunlist,**  
Université de Nantes,  
Inserm, The Enteric Nervous  
System in Gut and Brain  
Disorders, Nantes, France  
Institut des Maladies de  
l'Appareil Digestif, Nantes,  
France

**Isabelle Bardou,**  
**Fabian Docagne,**  
Normandie Univ, Unicaen,  
Inserm, Physiopathology and  
Imaging of Neurological  
Disorders, Cyceron Centre,  
Institut Blood and  
Brain@Caen-Normandie,  
Caen, France

stress in animal models of MS. In most cases, stress was shown to reduce, rather than increase, the severity of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE).<sup>6</sup> However, most of the studies have used chronic stress (more than one hour per day for more than five days),<sup>6</sup> which has long been known to inhibit immune response, rather than acute stress events. One study reported an advance in the onset of EAE after repeated acute stress.<sup>7</sup> More recently, mild chronic stress was shown to exacerbate and accelerate the clinical symptoms of rat EAE.<sup>8</sup> However, in all of these earlier studies, the stress paradigm was applied in the early phase, prior to symptom onset, and not during the remission phase. Thus, these studies did not allow addressing the effect of stress on relapses in relapsing-remitting context.

Overall, the question remains of whether acute stress, when occurring during remission periods, can influence the incidence and severity of relapses. In addition, the effect of stress reduction on relapses was never tested in relapsing-remitting animal models of MS. To answer these questions, we set up a paradigm of repeated acute stress applied during the remission phase of relapsing-remitting EAE. We observed that stress exposure precipitated relapse, so that in stressed animals, the incidence of relapse was doubled, and the delay before the occurrence of relapse was significantly reduced. Conversely, environmental enrichment, previously shown to reduce stress in rodents, reduced relapse incidence and severity, and reversed the effects of stress.

## Methods

### Animals

Experiments were performed on female SJL/J mice (Janvier, Le Genest-Saint-Isle, France) maintained under specific pathogen-free conditions at the Centre Universitaire de Ressources Biologiques (Basse-Normandie, France). This study and the procedures thereof were approved by the French ministry of education and research (Project licence APAFIS#2887-2015112017418114v2; Center agreement #D14118001) in accordance with the French (Decree 87/848) and European (Directive 86/609) guidelines. Animals were monitored once a day for signs of pain, posture, reactivity, activity, signs of distress, food/drink consumption and follow-up of body weight. Humane euthanasia was planned to be applied to any animal showing at least one of the following signs: prostration, body weight

loss > 20%, lack of reaction, prolonged inactivity or other signs of distress, stop of food and/or drink consumption.

*Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) Relapsing remitting EAE (PLP-induced EAE)* was induced in 8-week-old female SJL/J mice via subcutaneous immunization with 200 µg recombinant myelin proteolipid protein (PLP<sub>139-151</sub>, Eurogentec) in an emulsion mix (volume ratio 1:1) with Complete Freund's Adjuvant (CFA; Difco Laboratories) containing 800 µg of heat-killed Mycobacterium tuberculosis H37Ra (MBT; Difco). The emulsion was administered to regions above the shoulders and the flanks (total of 4 sites; 50 µl at each injection site). All animals were injected intraperitoneally with 200 ng pertussis toxin derived from Bordetella pertussis (Sigma-Aldrich) in 200 µL saline at the time of, and after 48 hours following immunization. EAE induction was performed with the application of local analgesia (lidocaine patch) to prevent discomfort and pain. The animals were euthanized 80 days after EAE induction under deep anesthesia (5% isoflurane, O2/N2O 1/1) by exsanguination via intracardiac infusion of saline.

### Clinical score

Mice were examined daily for clinical signs of EAE and were scored as followed; 0, no disease; 1, limp tail; 2, hindlimb weakness; 3, complete hindlimb paralysis; 4, hindlimb paralysis plus forelimb paralysis; and 5, moribund or dead. All clinical score were assessed daily by an examiner blinded to the EAE group. A relapse was defined as a sustained increase (minimum duration of 2 days) of at least 0.5 in clinical score.

### Water avoidance stress (WAS)

WAS (one hour per day during four days) was performed by placing asymptomatic EAE mice on a platform (4cm diameter) positioned at the center of a plastic container filled with water at room temperature up to 1 cm below the top of the platform. EAE mice were randomly assigned to the two experimental groups. Non-WAS mice were handled identically, but placed in an empty and clean cage.

### Standard breeding conditions

Mice in standard (STD) conditions were placed in standard cages [32 × 16 × 14 cm (L × W × H)], which allowed social interactions (5 mice per cage). Nesting material was placed in the cage and renewed if needed. The animals had *ad libitum* access to food and water.

### Environmental enrichment (EE)

Enriched mice were housed in Marlau™ cages [Viewpoint; 58 × 40 × 32 cm (L × W × H)], which allowed social interactions (15 mice per cage). These cages are composed of two floors. The ground floor has two compartments: one containing food, the other one containing water bottles, three running wheels and an elevated nest. The upper floor contains a maze changed three times a week. Because of one-way doors between the two ground compartments, mice had to climb to the upper floor using a ladder, pass through the maze and go down to the food compartment using a slide tunnel to reach food. Enriched mice were housed in these Marlau™ cages from the age of six weeks to the end of the experiment. Enrichment was thus applied before EAE induction and during all the phases of EAE, including presymptomatic phase, first peak, remission and relapses. There are no documented differences on stress scores, stress measurements or stress biomarkers across the two particular breeding conditions used in the present work. Nevertheless, environmental enrichment has been described before to reduce stress in laboratory rodents.<sup>9</sup>

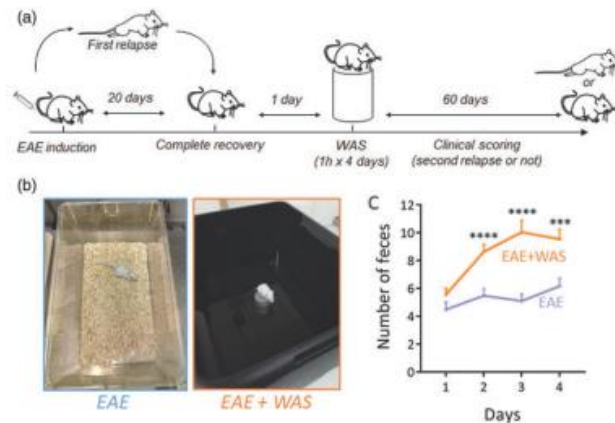
### Statistical analysis

Results are presented as the mean ± SEM. Normality tests were performed on all samples

(D'Agostino-Pearson omnibus test and Shapiro-Wilk test). When normality could not be assumed, we used non-parametric tests (Mann-Whitney's U-test), which are the most stringent in these conditions. For the comparison of the mean clinical scores, we used a two-way repeated measures ANOVA followed by a Bonferroni's multiple comparison *post hoc* test. For the comparison of the number of feces in STD, STD+WAS, EE and EE+WAS groups, we used a Kruskal-Wallis test followed by a Dunn's multiple comparison as a *post hoc* test. Onset and relapse incidence curves were analysed with Gehan-Breslow-Wilcoxon test. Data were analysed using GraphPad Prism 7.0. Two groups were considered to be significantly different when  $P < 0.05$ .

### Results

Repeated acute stress has been defined as a short exposure to stressing stimulus (<1h) repeated once daily during less than 5 days (as opposed to repeated chronic stress: >1h during more than 5 days).<sup>6</sup> Here, to induce repeated acute stress, we applied a paradigm in which mice were exposed to water avoidance stress (WAS) once a day during 4 days during the remission period of EAE (Figure 1(a) and (b)). The stressful nature of this paradigm was assessed



**Figure 1.** Experimental design for water avoidance stress. (a) Water avoidance stress (WAS, one hour per day for four days) was applied during the remission phase of PLP-induced relapsing-remitting EAE mice and the clinical scoring was assessed during 60 days. (b) Photography of the experimental system. Mice were placed for 1 hour on a platform positioned at the center of a plastic container filled with water at room temperature up to 1 cm below the platform level. Mice were randomly assigned to the two experimental groups. Non-WAS mice were handled identically, but placed in a standard cage. (c) Measure of fecal pellet outputs in the two experimental groups as an index of stress-induced colonic motility ( $n = 26$  and  $n = 28$  for EAE and EAE+WAS groups respectively). \*\*\* $P < 0.001$ ; \*\*\*\* $P < 0.0001$ , Mann-Whitney's U-test.



by measuring fecal pellet output during the exposure to stress (Figure 1(c)), as a measure of stress-induced colonic motility.<sup>10</sup> This procedure is fully non-invasive and was preferred to other methods such as measurement of stress hormones in the blood-stream that require invasive procedures and thus constitute a source of stress for the animals.

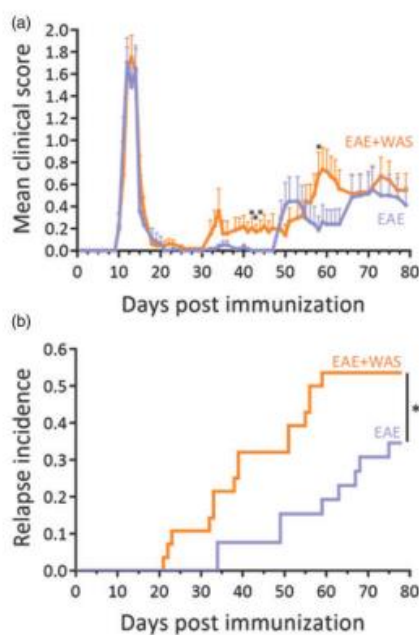
The exposure to stress induced an increase in clinical score which reached significance at days 42, 43, 44, and 58 (Figure 2(a)). These differences in mean clinical score were explained by the fact that WAS advanced the appearance of the relapse (mean day of relapse onset:  $40.53 \pm 3.43$  vs.  $55.33 \pm 4.92$ ;  $P = 0.0189$ ; mean duration of remission:  $23.67 \pm 3.66$  vs.  $38.0 \pm 4.91$ ;  $P = 0.0273$ ; Table 1), so that the incidence of relapse was increased by 1.58-fold at day 75 (Figure 2(b); Supplementary Figure 1A). Noteworthy, the severity of EAE was not affected by

stress (mean peak score:  $2.77 \pm 0.29$  vs.  $2.50 \pm 0.47$ ; Table 1).

Environmental enrichment has been described as an efficient paradigm to reduce stress in laboratory rodents.<sup>9</sup> Here, we bred mice in standard or enriched environment prior to EAE induction and exposure to repeated acute stress (Figure 3(a) and (b)). This paradigm of standard enrichment reversed the increase of fecal pellet output (used as index of stress-induced colonic motility) induced by WAS (Figure 3(c)).

Strikingly, animals bred in enriched environment showed a reduction in the first symptomatic peak of EAE (Days 12–17 post immunization, Figure 4 (a)) and a drastic reduction of clinical score during the relapse phase (days 48–71 and 73–78, Figure 4 (a)). These differences in mean clinical score along the course of EAE were the result of several parameters: First, the incidence of the disease and the incidence of relapse were reduced in enriched animals (Figure 4(b) and (c)), so that the incidence of disease was decreased by 1.52-fold at day 25 (Figure 4(b), Supplementary Figure 1B) and the incidence of relapse was decreased by 2.06-fold at day 70 (Figure 4(c), Supplementary Figure 1C). Second, the onset of the disease tended to occur later in enriched animals (mean day of relapse onset:  $14.67 \pm 0.41$  vs.  $13.74 \pm 0.35$  vs.;  $P = 0.0581$ ; Table 2).

Considering that repeated acute stress increased relapse rate and that environmental enrichment reduced the severity of EAE, our next question was to ask as to whether environmental enrichment may reduce the effects of stress. Mice bred in standard or enriched environment were subjected to WAS during the remission period (Figure 3(a)). In agreement with above results, mice bred in enriched environment showed a reduction in clinical score during the first peak of disease (days 13–14 and 16–17, Figure 5(a)). The mean clinical score gradually increased after the remission period in standard animals, but not in enriched animals (Figure 5(a)), reaching statistical difference at day 41, between days 43 and 50 and from day 52 to the end of the experiment (day 78). This difference was the reflect of a dramatic difference in the incidence of relapse (71.4% vs. 8.3%,  $P = 0.0011$ ; Figure 5(b), Supplementary Figure 1B). Only one animal (from  $n = 12$ ) suffered a relapse in the enriched group (Supplementary Figure 1B), and that relapse occurred much later than what observed in the

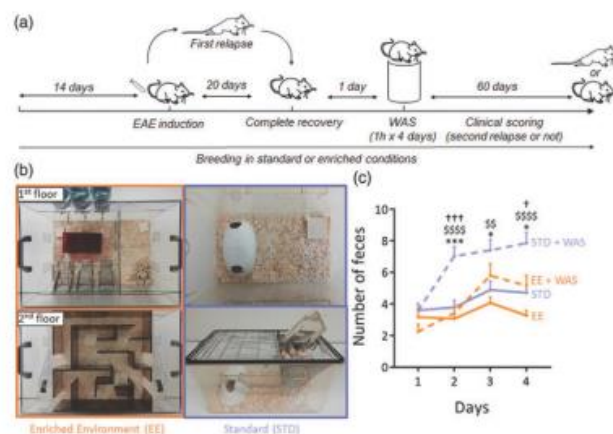


**Figure 2.** Acute stress precipitates relapse in EAE animals. (a) Clinical score was assessed daily by an examiner blinded to the treatment ( $n = 26$  and  $n = 28$  for EAE and EAE+WAS groups respectively;  $*P < 0.05$ , two-way repeated measures ANOVA + Bonferroni's multiple comparison). (b) Clinical evaluation expressed as the long-term relapse incidence in EAE and EAE+WAS groups ( $*P < 0.05$ , Gehan-Breslow-Wilcoxon test).

**Table 1.** Values for mean day of onset or relapses and mean peak clinical score in the EAE and EAE+WAS groups.

	EAE	N	EAE + WAS	N	P-value
Mean day of onset	11.50 ± 0.15	30/35	11.57 ± 0.21	30/35	0.7510
Peak score	2.52 ± 0.19		2.52 ± 0.19		0.7036
Mean duration of remission	38.00 ± 4.91		23.67 ± 3.66		0.0273*
Mean day of first relapse onset	55.33 ± 4.92	9/26	40.53 ± 3.43	15/28	0.0189*
Peak score	1.72 ± 0.41		2.20 ± 1.40		0.4066
Mean day of second relapse onset	62.80 ± 6.00	5/26	52.40 ± 4.36	10/28	0.1885
Peak score	3.00 ± 0.55		2.05 ± 0.28		0.1092
Mean day of third relapse onset	66.00 ± 0	1/26	63.50 ± 2.92	6/28	N.D.
Peak score	4 ± 0		2.42 ± 0.42		N.D.
Peak score (all relapse)	2.50 ± 0.47	9/26	2.77 ± 0.29	15/28	0.6130

N corresponds to the number of animals with first surge or relapse divided by the total number of animals within the group (see Supplementary Figure 1A for a detailed description). The data are given for the animals that develop a first peak. P values are given for t-test or, when normality could not be assumed, Mann-Whitney's U-test. \*p < 0.05.



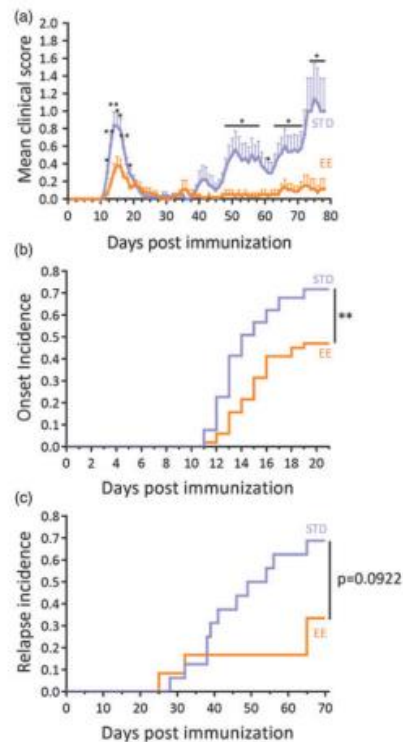
**Figure 3.** Experimental design for environment enrichment. (a) Environmental enrichment (EE) was applied from 14 days pre-EAE induction to the end of the protocol. Standard (STD) animals were kept in standard breeding conditions. WAS was applied to half of the animals of each group during the remission phase of EAE. In total, 4 experimental groups were studied: STD, STD+WAS, EE, EE+WAS. (b) Photography of the STD and EE breeding cages (see methods for details). (c) Measure of fecal pellet outputs in the four experimental groups as an index of stress-induced colonic motility ( $n = 16$ ,  $n = 21$ ,  $n = 12$  and,  $n = 12$  for STD, STD+WAS, EE, and EE+WAS groups respectively; \* $P < 0.05$ ; \*\*\* $P < 0.001$ , STD vs. STD+WAS;  $P < 0.0001$ , EE vs. STD+WAS;  $^{†††}P < 0.001$ , EE+WAS vs. STD+WAS; Kruskal-Wallis test + Dunn's multiple comparison).

standard group (61 days vs. a mean of  $43.73 \pm 3.15$  in standard animals; Table 3). The peak score of this relapse was also reduced as compared to the mean of the standard group ( $1.5 \pm 0$  vs.  $2.00 \pm 0.32$ ; Table 3). In addition, although 60% of the animals with a first relapse (9 animals out of 15) also suffered a second relapse later in the standard group ( $58.43 \pm 4.28$

days post immunization; Table 3), no second relapse was observed in the enriched group.

#### Discussion

The present study overall shows that repeated acute stress precipitates relapses in RR-EAE and that



**Figure 4.** Environmental enrichment reduced EAE severity. (a) Clinical score assessed daily by an examiner blinded to the treatment in the standard (STD) and enriched environment (EE) groups ( $n = 53$  and  $n = 51$  for STD and EE groups respectively;  $*P < 0.05$ ;  $**P < 0.01$ , two-way repeated measures ANOVA + Bonferroni's multiple comparison). (b) Clinical evaluation expressed as the EAE onset incidence in EE and STD groups ( $**P < 0.01$ , Gehan-Breslow-Wilcoxon test). (c) Clinical evaluation expressed as the long-term EAE relapse incidence in EE and STD groups ( $n = 16$  and  $n = 12$  for STD and EE groups respectively;  $P = 0.0922$ , Gehan-Breslow-Wilcoxon test).

environmental enrichment, previously reported to reduce stress in laboratory rodents,<sup>9</sup> prevents the occurrence of relapses and alleviates the effect of repeated acute stress on RR-EAE severity.

Controversial results have been reported in the past concerning the effects of stress on EAE.<sup>11</sup> A general consensus has emerged to state that chronic stress ameliorates, while acute stress worsens, disease course. The outcome of these studies was generally

the evolution of clinical score in a chronic, monophasic model, rather than the effect on relapses in a relapsing-remitting model, as described here. The data presented here show that repeated acute stress during the remission phase of RR-EAE is sufficient to precipitate relapses in absence of other inducers. These data complement previous reports of an exacerbation of disease by chronic mild stress.<sup>8</sup> Our data match clinical observation in MS patients, previously summarized in a meta-analysis<sup>12</sup> and describing that stressful life events exacerbate MS. The paradigm developed in the present study may therefore be used to investigate the mechanisms responsible for stress-induced occurrence of relapses. In complement, other paradigms of repeated acute stress, such as restraint stress or exposure to predator odors may be used in future studies.

The two major stress response systems, the hypothalamic-adrenal-pituitary axis and the sympathetic nervous system, have been suggested to mediate the effects of stress on relapses.<sup>13</sup> In addition to these pathways, stress also increases intestinal barrier permeability.<sup>14</sup> Animal studies give a possible link between gut inflammation and MS: intestinal barrier dysfunction occurs at the onset of monophasic EAE<sup>15</sup> and a pro-inflammatory response in the gut has been shown to trigger EAE.<sup>16,17</sup> Conversely, the sequestration of Th17 cells in the gut confers resistance to EAE.<sup>18</sup> Together, these studies suggest a sequence of events involving the gut in the pathogenesis of EAE: (i) initial expansion and activation of T-cell in gut-associated lymphoid tissues, leading to (ii) recruitment of auto-antibody-producing B cells and (iii) migration to brain draining cervical nodes to finally trigger autoimmune encephalomyelitis. Increased permeability of the intestinal barrier is a key feature of gut inflammation<sup>19</sup> and could thus initiate this cascade of events, which may be potentiated by stress. In addition, stress may also induce neurovascular pathology, leading to BBB permeation<sup>20,21</sup> which could provide an additional explanation for the effect of stress in EAE. The paradigm described in the present work could be useful to test these mechanistic hypotheses in further studies.

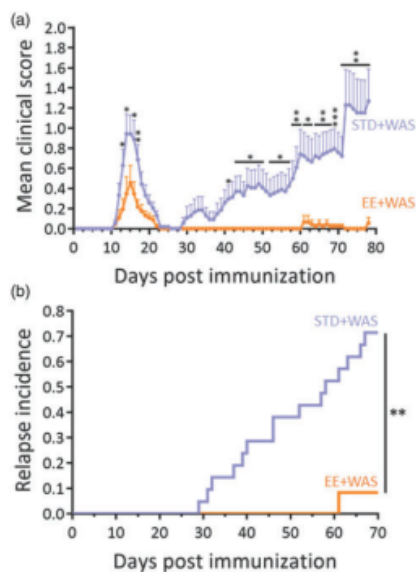
While the effects of stress on RR-EAE disease described here corroborate previous reports in experimental models<sup>8</sup> and coincide with clinical data,<sup>12</sup> more intriguing and novel are our data concerning the effects of environmental enrichment. Indeed, we show that animals bred in enriched environment show a reduced severity and incidence of the first



**Table 2.** Values for mean day of onset, mean day of relapse and mean peak clinical score in the STD or EE groups.

	STD EE	N	<i>P</i> -value	N	
Mean day of onset	13.74 ± 0.35	38/53	14.67 ± 0.41	24/51	0.0581
Peak score	1.64 ± 0.17		1.27 ± 0.16		0.2070
Mean day of first relapse onset	44.18 ± 3.33	11/16	46.75 ± 10.63	4/12	0.7597
Peak score	1.64 ± 0.44		1.63 ± 0.47		0.5963
Mean day of second relapse onset	55.29 ± 4.11	7/16	47.00 ± 0	1/12	N.D.
Peak score	2.43 ± 0.46		1.50 ± 0		N.D.
Mean day of third relapse onset	65.00 ± 2.42	4/16	69.00 ± 0	1/12	N.D.
Peak score	2.63 ± 0.55		1.50 ± 0		N.D.
Peak score (all relapse)	2.77 ± 0.37	11/16	1.63 ± 0.47	4/12	0.1143

N corresponds to the number of animals with first surge or relapse divided by the total number of animals within the group (see Supplementary Figure 1B for a detailed description). The data are given for the animals that develop a first peak. *P* values are given for t-test or, when normality could not be assumed, Mann-Whitney's U-test.



**Figure 5.** Environmental enrichment reversed the effects of stress on EAE severity. (a) Clinical score assessed daily by an examiner blinded to the treatment in the STD+WAS and EE+WAS groups ( $n = 21$  and  $n = 12$  for STD+WAS and EE+WAS groups respectively;  $*P < 0.05$ ;  $**P < 0.01$ ;  $***P < 0.001$ , two-way repeated measures ANOVA + Bonferroni's multiple comparison). (b) Clinical evaluation expressed as the long-term EAE relapse incidence in STD+WAS and EE+WAS groups ( $n = 21$  and  $n = 12$  for STD+WAS and EE+WAS groups respectively;  $**P < 0.01$ , Gehan-Breslow-Wilcoxon test).

RR-EAE peak, and a drastic amelioration of the second phase of the disease. In addition, environmental enrichment alleviated the effects of repeated acute stress, applied during the remission phase, on the incidence of relapse. These data suggest that animals bred in an enriched environment have lost their sensitivity to repeated acute stress on RR-EAE symptoms. The fact that environmental enrichment reduces the severity of RR-EAE from the first peak suggests that this breeding regimen exert a "conditioning" effect on animals towards a lesser sensitivity to EAE. Interestingly, although repeated acute stress prompts standard animals towards a higher rate of relapse, this stress paradigm does not compensate for the beneficial "conditioning" effect brought by environmental enrichment. Future experiments in which enrichment would be applied only during remission is a very exciting perspective that would test the possibility of a therapeutic effect of enrichment in EAE.

The mechanism by which environmental enrichment alleviates the effects of stress is also an intriguing question. Previous report suggested that environmental enrichment increases cerebral activity in the prefrontal cortex and that this increased activity participates in setting up stress resiliency.<sup>22</sup> This suggests that environmental enrichment could drive a manner of cerebral training in rodents that would lead to the reported beneficial effects. However, one cannot exclude that this regimen may reverse the effects of stress by other-though not necessarily exclusive- ways. Several positive effects of

**Table 3.** Values for mean day of relapse onset and mean peak clinical score in the STD+WAS and EE+WAS groups.

STD+WAS	EE+WAS	P-value	N	N	N
Mean day of first relapse onset	43.73 ± 3.15		15/21	61.00 ± 0	1/12 N.D.
Peak score	2.00 ± 0.32			1.50 ± 0	N.D.
Mean day of second relapse onset	58.43 ± 4.28		9/21	N.D.	0/12 N.D.
Peak score	2.36 ± 0.31			N.D.	N.D.
Mean day of third relapse onset	56.00 ± 2.00		2/21	N.D.	0/12 N.D.
Peak score	2.50 ± 1.00			N.D.	N.D.
Mean day of fourth relapse onset	76.00 ± 0		1/21	N.D.	0/12 N.D.
Peak score	1.00 ± 0			N.D.	N.D.
Peak score (all relapse)	2.50 ± 0.30		15/21	1.50 ± 0	1/12 N.D.

N corresponds to the number of animals with first surge or relapse divided by the total number of animals within the group (see Supplementary Figure 1B for a detailed description). The data are given for the animals that develop a first peak.

environmental enrichment, in addition to cerebral training, may account for its beneficial effects, including increase in physical activity, or changes in metabolic parameters.<sup>23</sup>

In conclusion, this study shows that repeated acute stress increases relapse rate and incidence in an experimental paradigm relevant to relapsing-remitting MS, the most frequent form of this disease. These data in animal models have to be seen in the light of recent successful attempts to use stress management strategies as an adjunct to the available MS treatments.<sup>24,25</sup> The use of preclinical animal models may provide rationales and mechanistic explanations for the use of these strategies in MS management.

#### Availability of Data and Materials

The datasets used and analysed during the current study are available from the corresponding author.

#### Conflict of Interests

The author(s) declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.

#### Funding

The author(s) disclosed receipt of the following financial support for the research, authorship, and/or publication of this article: This work was supported by the ARSEP foundation and the *Fondation pour la recherche médicale* (FRM). APF and IW received a fellowships from the Conseil Régional de Normandie.

#### Ethics Approval

This study and the procedures thereof were approved by the French ministry of education and research (Project reference APAFIS#2887-2015112017418114v2; Center agreement #D14118001) in accordance with the French (Decree 87/848) and European (Directive 86/609) guidelines.

#### ORCID iD

Fabian Docagne  <https://orcid.org/0000-0003-1745-0625>

#### Supplemental Material

Supplemental material for this article is available online.

#### References

1. Briones-Buixassa L, et al. Stress and multiple sclerosis: a systematic review considering potential moderating and mediating factors and methods of assessing stress. *Health Psychol Open* 2015; 2: 1–16.
2. Holmes TH and Rahe RH. The social readjustment rating scale. *J Psychosom Res* 1967; 11: 213–218.
3. Karagkouni A, Alevizos M and Theoharides TC. Effect of stress on brain inflammation and multiple sclerosis. *Autoimmun Rev* 2013; 12: 947–953.
4. Mitsonis CI, et al. The impact of stressful life events on risk of relapse in women with multiple sclerosis: a prospective study. *Eur Psychiatry J Assoc Eur Psychiatr* 2008; 23: 497–504.
5. Lovera J and Reza T. Stress in multiple sclerosis: review of new developments and future directions. *Curr Neurol Neurosci Rep* 2013; 13: 398.
6. Heesen C, Gold SM, Huitinga I, et al. Stress and hypothalamic-pituitary-adrenal axis function in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis – a review. *Psychoneuroendocrinology* 2007; 32: 604–618.

7. Chandler N, Jacobson S, Esposito P, et al. Acute stress shortens the time to onset of experimental allergic encephalomyelitis in SJL/J mice. *Brain Behav Immun* 2002; 16: 757–763.
8. Gerrard B, et al. Chronic mild stress exacerbates severity of experimental autoimmune encephalomyelitis in association with altered non-coding RNA and metabolic biomarkers. *Neuroscience* 2017; 359: 299–307.
9. Gurfel BT, et al. The calm mouse: an animal model of stress reduction. *Mol Med Camb Mass* 2012; 18: 606–617.
10. Mönnikes H, Schmidt BG and Taché, Y. Psychological stress-induced accelerated colonic transit in rats involves hypothalamic corticotropin-releasing factor. *Gastroenterology* 1993; 104: 716–723.
11. Heesen C, et al. Stress regulation in multiple sclerosis: current issues and concepts. *Mult Scler Houndmills Basingstoke Engl* 2007; 13: 143–148.
12. Mohr DC, Hart SL, Julian L, et al. Association between stressful life events and exacerbation in multiple sclerosis: a meta-analysis. *Br Med J* 2004; 328: 731.
13. Gold SM, et al. The role of stress-response systems for the pathogenesis and progression of MS. *Trends Immunol* 2005; 26: 644–652.
14. Vanhaecke T, et al. *L. fermentum* CECT 5716 prevents stress-induced intestinal barrier dysfunction in newborn rats. *Neurogastroenterol Motil Off J Eur Gastrointest Motil Soc* 2017; 29: e13069.
15. Nouri M, Bredberg A, Weström B, et al. Intestinal barrier dysfunction develops at the onset of experimental autoimmune encephalomyelitis, and can be induced by adoptive transfer of auto-reactive T cells. *PLoS One* 2014; 9: e106335.
16. Berer K, et al. Commensal microbiota and myelin autoantigen cooperate to trigger autoimmune demyelination. *Nature* 2011; 479: 538–541.
17. Lee YK, Menezes JS, Umesaki Y, et al. Proinflammatory T-cell responses to gut microbiota promote experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 108: 4615–4622.
18. Berer K, Boziki M and Krishnamoorthy G. Selective accumulation of pro-inflammatory T cells in the intestine contributes to the resistance to autoimmune demyelinating disease. *PLoS One* 2014; 9: e87876.
19. Neunlist M, et al. The digestive neuronal-gliol-epithelial unit: a new actor in gut health and disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2013; 10: 90–100.
20. Lehmann ML, et al. Decoding microglia responses to psychosocial stress reveals blood-brain barrier breakdown that may drive stress susceptibility. *Sci Rep* 2018; 8: 11240.
21. Menard C, et al. Social stress induces neurovascular pathology promoting depression. *Nat Neurosci* 2017; 20: 1752–1760.
22. Lehmann ML and Herkenham M. Environmental enrichment confers stress resiliency to social defeat through an infralimbic cortex-dependent neuroanatomical pathway. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 2011; 31: 6159–6173.
23. Toth LA, Kregel K, Leon L, et al. Environmental enrichment of laboratory rodents: the answer depends on the question. *Comp Med* 2011; 61: 314–321.
24. Levin AB, Hadgkiss EJ, Weiland TJ, et al. Meditation as an adjunct to the management of multiple sclerosis. *Neurol Res Int* 2014; 2014: 704691.
25. Mohr DC, et al. A randomized trial of stress management for the prevention of new brain lesions in MS. *Neurology* 2012; 79: 412–419.

## VII- Discussion

### VII-1 : Notre modèle confronté aux autres modèles animaux d'EAI à anticorps anti-NMDAR

Dans cette partie, nous allons confronter notre modèle par rapport aux autres modèles animaux d'encéphalite auto-immune via l'utilisation (immunisation passive) ou la production (immunisation active) d'anticorps anti-NMDAR. Afin de faciliter la compréhension et les comparaisons, le tableau (**tableau 45**), ci-dessous, résume le principe, les souches utilisées, les principaux résultats associés aux anticorps anti-NMDAR utilisés dans le cadre d'une infusion (Planaguma *et al.*, 2015) ou d'une immunisation active (Pan *et al.*, 2017 ; Jones *et al.*, 2029 ; Ding *et al.*, 2020).

modèle	Principe	Souche	Principaux résultats	Implication du système immunitaire
<b>Planagumà et al., 2015</b>	- Infusion d'anticorps anti-NMDAR humains issus du LCR de malades	- C57B/6J	- Déficit anxieux - Anhédonie - Déficit de mémorisation spatiale	- Non - Pas d'immunisation
<b>Wright et al., 2015</b>	- Injection unique d'anticorps anti-NMDAR humains issus du LCR de malades	- C57B/6J	- Augmentation de la susceptibilité de survenue des crises d'épilepsie sous PTZ après injection d'AC anti-NMDAR humains	- Non - Pas d'immunisation
<b>Pan et al., 2017</b>	- Immunisation active - Ovalbumine - 4 peptides GluN1-NMDAR - Rappel: NON	- ApoE <sup>+/+</sup> - ApoE <sup>-/-</sup>	- Hyperactivité motrice chez la souche ApoE <sup>-/-</sup> après injection de MK801 - Pas d'autre déficits comportementaux	- Oui car immunisation active - immunisation avec 4 peptides mais pas de distinction entre les 4
<b>Jones et al., 2019</b>	- Immunisation active avec des liposomes contenant la sous unité GluN1-GLUN2B du NMDAR - Rappel: OUI à J15	- C57B/6J - MuMt (LB KO) Tcr $\alpha$ (cd4/ cd8 KO)	- Hyperactivité motrice chez le groupe protéoliposome - Comportement stéréotypé affectant la confection du nid chez le groupe protéoliposome	- Oui - Immunisation avec toute la sous unité GluN1 - Infiltration de cellules immunitaires au sein du SNC - Utilisation de souche KO pour mettre en évidence l'implication des différentes lignées lymphocytaires
<b>Ding et al., 2021</b>	- Immunisation active avec le peptide GluN1 <sub>356-385</sub> - Rappel: OUI semaines 4 et 8	- C57BL/6J	- Déficiences de sociabilité - Déficit de mémorisation - Pas de déficit de type anxieux - Pas de déficit de type dépressif	- Oui - IgG au sein du SNC - Etude sur les AC du LCR

**Tableau 45 : Tableau présentant les modèles précliniques disponibles dans la littérature qui seront confrontés à notre modèle.**

**VII-1-A : Notre modèle confronté au modèle d'infusion de Planagumà et al., 2015**

C'est à partir de 2015 et les travaux de Planagumà et collaborateurs qu'est confirmée la pathogénicité des anticorps anti-NMDAR humains chez l'animal (Planagumà et al., 2015). De manière intéressante, les souris développent un spectre de déficits cognitifs et mnésiques proche de celui que nous observons chez l'homme durant la phase psychiatrique (Kayser et Dalmau., 2014). Avec notre modèle, basé sur une immunisation active, nous avons aussi pu

mettre en évidence des déficits comportementaux très proches de ceux observés chez l'homme et proches de ceux décrits dans le modèle de Planagumà et collaborateurs. Néanmoins, nous devons souligner que tous les tests que nous avons utilisés n'ont pas toujours donné des résultats en accords avec ceux de Planagumà et collaborateurs. En effet, nous n'avons pas obtenus de déficits comportementaux de type anhédonique (résultats non présentés dans ce manuscrit) contrairement à ceux décrits par ces auteurs. Il est fort probable que cette divergence puisse être attribuée au pourcentage d'eau sucrée qui diffère entre nos deux protocoles (10 % dans notre cas versus 2% dans l'étude de Planagumà et collaborateurs). Une autre éventualité pourrait résider dans le fait que l'action des anticorps anti-NMDAR infusés dans leur modèle affecte différemment les structures cérébrales associées à l'anhédonie par rapport à notre protocole d'immunisation active.

Une autre différence comportementale entre nos deux études est que nous rapportons un déficit de type anxieux non observé dans le modèle de Planagumà et collaborateurs. Ces auteurs ont utilisé un test avec un labyrinthe en croix surélevé. Au sein de notre laboratoire, l'anxiété est étudiée avec le labyrinthe en O qui, dans notre cas, révèle un déficit de type anxieux comme ce qui peut être observé dans le cadre de la pathologie humaine (Kayser et Dalmau., 2016). Notre modèle présente l'intérêt de révéler une nouvelle composante comportementale (l'anxiété) associée à la pathologie humaine qui n'avait pas pu être mise en évidence dans les autres modèles et qui reste un symptôme clé de la maladie chez l'humain.

Nous pouvons souligner que le modèle d'immunisation passive à l'aide d'anticorps hétérologues (humains/souris) pourraient être à l'origine de complications immunologiques (d'une réponse immunitaire dirigée contre les IgG humaines dirigées ou non contre le NMDAR). Une réaction immunitaire pourrait être à l'origine de différences expliquées ci-dessus.

L'immunisation passive et hétérologue ne semble pas être le modèle préclinique idéal ; il ne permet pas, contrairement à notre modèle, d'étudier précisément les mécanismes cellulaires, moléculaires et immunitaires associés à cette pathologie.



*VII-1-B : Notre modèle confronté au modèle d'injection intra cérébroventriculaire de Wright et al. 2015.*

L'intérêt majeur du modèle de Wright et collaborateurs de 2015 réside dans le fait que ces auteurs ont recherché des effets épileptogènes à court terme à la suite d'une injection intra-cérébroventriculaire d'anticorps anti-NMDAR de patients. Ils ont ainsi révélé qu'une injection unique d'anticorps anti-NMDAR humains pouvait, 48 heures après, affecter la susceptibilité aux crises d'épilepsie induites par un agent pharmacologique : le PTZ. Les anticorps anti-NMDA de patients accentuent les crises épileptiques induites par une injection de PTZ comme cela a pu être objectivé à l'aide d'analyses comportementales (échelle de Racine) et d'analyses électroencéphalographiques. Notre modèle reproduit les observations comportementales rapportées par ces auteurs à la suite de l'injection de PTZ. Il serait tout de même intéressant dans le cadre de notre modèle de pouvoir s'affranchir d'une injection de PTZ, qui ne permet pas de rester dans un cadre physiologique.

*VII-1-C : Notre modèle par rapport à un modèle d'immunisation active réalisé sur une souche de souris transgéniques ApoE<sup>-/-</sup>*

Un autre modèle, plus proche de notre méthodologie, a étudié les effets d'une immunisation active contre 4 peptides dont les séquences sont situées sur la partie extracellulaire de la sous unité GluN1 du NMDAR (Pan *et al.*, 2017). Cette immunisation est réalisée sur une souche de souris ApoE<sup>-/-</sup> génétiquement modifiée. Cette souche est connue pour avoir une BHE perméable, ce qui peut être considéré comme un biais expérimental (non physiologique). Dans cette étude on peut également critiquer le fait que les souris utilisées sont âgées de 12 mois. En moyenne, les animaux utilisés dans le cadre de l'encéphalite ne dépassent pas 10 à 12 semaines, ceci pour se rapprocher le plus possible de la physiopathologie humaine qui veut que cette maladie touche majoritairement le sujet jeune. Dans leur étude, les auteurs ont utilisé une batterie de tests comportementaux dont les résultats ne sont pas en accord avec ceux de Planagumà et collaborateurs ou encore ceux de notre étude. Seule une hyperactivité locomotrice a pu être révélée chez les animaux ApoE<sup>-/-</sup> mais seulement s'ils étaient traités avec du MK801. Cet antagoniste pharmacologique non

compétitif des NMDARs est classiquement utilisé dans les modèles pharmacologiques de schizophrénie. Rappelons que la schizophrénie partage de nombreux symptômes cliniques avec l'EAI à anticorps anti-NMDAR (Coyle JT., 2012 ; Rung *et al.*, 2015). Dans notre modèle, nos souris développent spontanément des déficits beaucoup plus nets et variés que ceux observés dans l'équipe de Pan et collaborateurs. Ainsi, nous avons rapporté des déficits de types anxieux, dépressifs et des déficits de mémorisation à long terme. Nos déficits sont observés sans ajout de MK-801 et sans utiliser une souche de souris transgénique présentant une BHE perméable (Pan *et al.*, 2017). Ainsi, nos observations s'avèrent très difficilement comparables et discutables. Néanmoins, il est fort probable que nos divergences résultent dans les protocoles d'immunisation. En effet, dans notre modèle, nous avons utilisé un peptide de 20 acides aminés présentant l'avantage de contenir en son centre la partie reconnue par les anticorps pathogènes (N368/G369) (Gleichman *et al.*, 2012). Nous pouvons théoriquement envisager que la réponse immunitaire soit focalisée sur ce peptide. Dans leur étude, Pan et collaborateurs immunisent leur souris avec un cocktail contenant quatre peptides utilisés simultanément. Ces quatre peptides, dont les séquences sont rencontrées sur l'ensemble de la sous unité GluN1, vont de l'ATD jusqu'au LBD et ont des longueurs en acides aminés variables (une quinzaine d'acides aminés pour les peptides 1, 2 et 3 et plus de 150 acides aminés pour le peptide 4). Bien que leur peptide 2 contienne aussi le N368 et le G369 (zone reconnue par les anticorps dans la maladie), nous pouvons envisager que dans cette étude, la réactivité du système immunitaire ait pu être orientée vers des épitopes portés par les autres peptides (peptide 1,3 et 4) mais n'induisant pas de déficits comportementaux ou bien que la réaction immunitaire se soit centrée sur un peptide de plus grande taille, qui lui aussi, n'aboutit pas à un tableau clinique d'EAI à anticorps anti-NMDAR. Dans ce cas, des anticorps auraient pu être générés mais ces derniers n'ont peut-être pas un tropisme particulier pour l'épitope pathogène de la sous unité GluN1 du NMDAR, ou bien, s'ils reconnaissent d'autres parties du récepteur, leur fixation ne perturbe pas significativement le fonctionnement de ce dernier. Des anticorps sont alors bien produits mais ils ne conduisent pas aux symptômes classiquement observés dans l'EAI à anticorps anti NMDAR. Le choix du peptide immunogène semble donc très important dans la mise en place de déficits mnésiques et comportementaux. Nous allons le

voir par la suite, tous les anticorps ciblant le NMDAR ne sont pas forcément pathogènes, et certains peuvent même s'avérer protecteurs, mettant en exergue le rôle central de l'épitope reconnu par le paratope des Immunoglobulines. La révélation d'anticorps anti-NMDARs n'est pas obligatoirement synonyme de pathogénicité. L'intérêt de notre modèle limite et cible spécifiquement une région du récepteur décrite comme responsable des symptômes.

#### *VII-1-D : Notre modèle confronté au modèle de Jones et al., 2019*

Le modèle de Jones et collaborateurs est le deuxième modèle qui se propose d'introduire une immunisation active pour modéliser l'EAI à anticorps anti-NMDAR. Ce modèle, dont la méthodologie est séduisante, propose l'immunisation des animaux via des vecteurs de type liposomal, dans lesquels le NMDAR est enchâssé. Comme nous le verrons plus en détail par la suite, les auteurs ne s'intéressent pas seulement aux lymphocytes B mais aussi aux lymphocytes T, pour lesquels ils ont fait le choix d'utiliser des modèles de souris transgéniques afin de valider ou d'invalidier leurs hypothèses initiales quant à l'implication de ces types cellulaires.

Dans le cadre de leur immunisation, il n'est cette fois-ci pas question de peptides de petites tailles (Pan *et al.*, 2017) mais d'un antigène particulier incluant la séquence des sous unités GluN1-GluN2B insérées au sein de liposomes (protéoliposomes). A nouveau, le choix de cet antigène peut soulever plusieurs questions. En effet, cette structure est de taille importante, même si, par extension, elle contient forcément la partie reconnue par les auto-AC. Pour valider leurs résultats, ils poursuivent leur modèle en utilisant deux souches de souris transgéniques. La souche Tcr $\alpha$ , une souche murine dépourvue en LT-C4<sup>+</sup> et LT-CD8<sup>+</sup>, ainsi qu'une souche MuMT<sup>-</sup>, dépourvue de lymphocyte B (Kitamura *et al.*, 1991 ; Mombaerts *et al.*, 1992). Dans le cas de notre modèle, nous nous serions davantage intéressés à la souche murine transgénique MuMT<sup>-</sup>, dans le sens où elle ne présente pas de LB. L'implication évidente des LB est révélée dans nos travaux via notre technique de déplétion des LB même si la déplétion de ces derniers n'était pas totale dans notre étude. Avec cette diminution des LB, nous avons pu constater en parallèle un changement de comportement de nos animaux immunisés. Nos animaux ne présentaient plus les mêmes altérations par rapport à

l'immunisation active sans déplétion des LB. Avec une souche telle que la MuMT<sup>-</sup>, nous pourrions nous assurer de ne pas avoir de LB circulants et ainsi répondre indéniablement aux rôles essentiels des LB dans l'EAI.

L'utilisation de la souche Tcr $\alpha$  ne présentant pas de LT à la fois cytotoxiques (CD8) et auxiliaires (CD4) permettrait de comprendre la place et le rôle des LT dans la réponse auto-immune des LB dans cette pathologie. Comme nous avons pu le voir lors de l'introduction de ce manuscrit, les LT, et principalement les LT auxiliaires (CD4<sup>+</sup>) pourraient participer à la réponse immunitaire humorale médiée par les LB. En effet, les LT auxiliaires permettent, entre autres, la mise en place des réponses thymo-dépendantes, la formation des centres germinatifs et *in fine* la production des LB mémoires et de plasmocytes. Comprendre l'impact des LT CD4<sup>+</sup> est tout aussi important que de comprendre l'impact des LB. Ainsi, bien que l'EAI à anticorps anti-NMDAR soit dans certains cas traitée par une immunothérapie ciblant le CD20 et donc les lymphocytes B, il faut garder à l'esprit que cette pathologie auto-immune est très probablement le fruit d'une coopération avec les différents acteurs du système immunitaire, incluant à la fois les LB et les LT.

#### *VII-1-E : Notre modèle confronté au modèle de Ding et al., 2020*

Le modèle de Ding et collaborateurs est basé sur une immunisation active contre un peptide dont la séquence est présente sur la partie extracellulaire du NMDAR, le peptide GluN1<sub>356-385</sub>. Cette méthodologie est très similaire à celle que nous avons réalisée dans notre modèle avec l'utilisation d'un peptide composé de 29 aa pour le leur et de 20 aa pour le nôtre.

Une fois l'immunisation effectuée, une validation de la production d'anticorps anti-NMDAR a été réalisée dans le LCR. L'étude du LCR est un point très pertinent car la production intrathécale d'anticorps anti-NMDAR est un des points clé de la pathologie. L'équipe de Ding et collaborateurs est la seule, avec notre modèle, à avoir introduit ce fait important dans leur protocole expérimental.

Néanmoins, ce modèle présente aussi certains points qui diffèrent de notre modèle. A ce titre nous pouvons citer les deux rappels immunologiques, aux semaines quatre et huit permettant de potentialiser la réponse immunitaire et d'augmenter production des anticorps. Le rappel

immunologique peut générer une surproduction d'Ig ne respectant pas forcément la cinétique normale de la maladie.

Ensuite, les auteurs démontrent, comme dans notre étude, une production intrathécale d'anticorps anti-NMDAR dans le LCR. Ils n'ont pas étudié si des plasmocytes ou des lymphocytes B étaient présents dans le LCR, ni si la déplétion de ces cellules modifiait la mise en place de la pathologie. En revanche, ils montrent la présence d'IgG dans l'hippocampe, comme ce qui est classiquement décrit, mais également dans le cervelet de leurs animaux et retrouvent des résultats très intéressants, en faveur d'une augmentation de ces IgG dans ces deux structures chez les animaux immunisés par rapport aux animaux du groupe contrôle.

Enfin, nous pouvons aborder la partie concernant les tests comportementaux. A l'instar des travaux réalisés par l'équipe de Planagumà et collaborateurs, ils s'intéressent aux déficits de sociabilité de leurs animaux. Cette approche est intéressante puisque qu'il est décrit, chez certains patients, une augmentation de leur agressivité. Il serait intéressant dans le cadre de notre modèle d'ajouter ce test à notre protocole expérimental pour compléter notre connaissance des troubles comportementaux. Pour ce qui est des autres résultats des tests comportementaux, à contrario de notre modèle, ils ne mettent pas évidence de déficits de type anxieux ou de dépressif. Pour l'anxiété, le fait que nous n'utilisons pas le même dispositif expérimental (Labyrinthe en croix surélevée pour eux et labyrinthe en O pour nous), peut, peut-être influencer les résultats terminaux. Néanmoins, nos deux modèles ont des résultats assez similaires, ce qui confirme l'importance du ciblage de la partie du récepteur NMDA reconnue par les auto-anticorps (N368/G369).

Pour terminer cette discussion des modèles existants et pour replacer notre modèle dans son contexte, nous nous proposons de récapituler les avantages et les inconvénients de chaque modèle sous la forme d'un tableau ([Tableau 46](#)).

Modèle	Avantages	Inconvénients
<b>Planagumà et al., 2015</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Premier modèle animal proposé</li> <li>- Mise en évidence de la pathogénicité des anticorps anti-NMDAR humain chez le rongeur</li> <li>- Simple à mettre en œuvre</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Infusion et pas immunisation</li> <li>- Pas d'étude poussées sur le SI</li> </ul>
<b>Wright et al., 2015</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Premier modèle étudiant l'épilepsie dans un modèle murin d'EAI à anticorps anti-NMDAR</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Les souris ne développent pas spontanément de crise d'épilepsie</li> <li>- Utilisation du PTZ</li> </ul>
<b>Pan et al., 2017</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Immunisation active</li> <li>- Souris mâle et femelle</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Immunisation avec 4 peptides sans distinction</li> <li>- Utilisation de CFA, d'IFA et d'ovalbumine</li> <li>- Utilisation d'une souche ApoE<sup>-/-</sup></li> <li>- Utilisation de MK801 pour obtenir un déficit comportemental</li> <li>- Pas d'étude du LCR</li> <li>- Pas d'étude en imagerie (IRM)</li> <li>- Peu de déficits comportementaux et un protocole expérimental lourd</li> </ul>
<b>Jones et al., 2019</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Immunisation active</li> <li>- Etude du système immunitaire</li> <li>- Implication des LBs et des LTs</li> <li>- Utilisation de souches transgénique pour valider l'implication du SI</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Pas d'étude du LCR</li> <li>- Pas d'étude en imagerie (IRM)</li> </ul>
<b>Ding et al., 2021</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Immunisation active</li> <li>- Utilisation d'un peptide unique</li> <li>- Le peptide contient l'épitope</li> <li>- Etude du système immunitaire</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Pas d'étude sur le LCR</li> <li>- Pas d'étude sur les populations lymphocytaires infiltrées en IHC ou en cytométrie</li> <li>- Pas d'étude des lésions cérébrales en imagerie (IRM)</li> </ul>



<b>Wagnon et al., 2020</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Immunisation active contre un peptide unique</li> <li>- Utilisation d'un peptide contrôle</li> <li>- Déficits comportementaux robustes, stables et proches de ceux observés dans la physiopathologie humaine</li> <li>- Caractérisation des sous populations lymphocytaires dans l'encéphale, le LCR et les organes lymphoïdes secondaires</li> <li>- Etude de l'épilepsie</li> <li>- Résultats proches de ceux observés par Ding <i>et al.</i>, 2021 dont le modèle adopte une méthodologie proche de la notre</li> <li>- Validation de l'implication des LBs dans notre modèle</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Dosages cytokiniques du LCR absents</li> <li>- Approfondir la caractérisation des sous types de populations lymphocytaires et plasmocytaires</li> <li>- Mutagénèse sur notre peptide dirigée à la manière de Ding <i>et al.</i>, 2021</li> <li>- Pas de crise d'épilepsie spontanée chez nos souris</li> <li>- Nécessité d'utiliser du PTZ</li> <li>- Déplétion des LBs partielle</li> </ul>
----------------------------	--	---

**Tableau 46 : Avantages et les inconvénients des modèles discutés dans ce manuscrit (Bleu) (Planagumà et al., 2015 ; Wright et al., 2015 ; Pan et al., 2017 ; Jones et al., 2019 ; Ding et al., 2021) et la comparaison à notre modèle (Wagnon et al., 2020) (Orange).**

### VII-2 : Anticorps anti-NMDAR : bénéfiques ou délétères, une question d'épitopes

Dans une revue récente de H. Ehrenreich (Ehrenreich., 2018), l'auteur rapporte que l'on retrouve chez environ 20% des sujets sains des anticorps dirigés contre le NMDAR. Cette séroprévalence est plus importante comparée à la séroprévalence (2 % en moyenne) d'autres autoanticorps également dirigés contre des antigènes cérébraux. Une étude de Jezequel et collaborateur en 2017 montre que seul les anticorps anti-NMDAR de patients vont affecter la

physiologie des synapses glutamatergiques alors que les auto-anticorps anti-NMDAR de sujets sains n'ont, quant à eux, pas d'effet (Jezequel *et al.*, 2017). De plus, les effets induits par le LCR de patients peuvent avoir des effets variables (Blome *et al.*, 2018). Ces données indiquent que l'épitope ciblé par les auto-anticorps est critique et qu'il peut mener à un contexte pathologique complexe.

L'importance de l'épitope reconnu par les auto-anticorps anti-NMDAR est également révélée par des travaux de notre équipe. En effet, nous avons révélé qu'une immunisation active ou que l'injection d'anticorps anti-NMDAR ciblant d'autres épitopes que celui impliqué dans l'encéphalite à anticorps anti-NMDAR (N368/G369) avaient des effets très bénéfiques dans différents modèles murins de pathologies touchant le SNC tels que l'AVC ischémique (Macrez *et al.*, 2011), un modèle d'hémorragie cérébrale (Gaberel *et al.*, 2013) ou encore dans la SEP (Macrez *et al.*, 2016). Dans le cas de la SEP, l'étude de Macrez et collaborateurs en 2016 a montré qu'un anticorps monoclonal, nommé le glunomab<sup>®</sup>, reconnaissant une zone située allant de l'acide aminé 163 à l'acide aminé 192 de l'ATD. De manière très intéressante, cet anticorps a des effets bénéfiques dans un modèle murin d'EAE-MOG, mimant la forme primaire progressive de la SEP (Macrez *et al.*, 2016). Le glunomab<sup>®</sup> bloque l'évolution de la maladie chez les souris EAE-MOG en ciblant le site d'action d'une sérine protéase : l'activateur tissulaire du plasminogène (tPA) au niveau de la sous unité GluN1 des NMDAR neuro-endothéliaux. Cet anticorps prévient les effets délétères excitotoxiques induits par le tPA (Macrez *et al.*, 2016).

Dans notre modèle, nous avons utilisé un peptide contrôle, le peptide GluN1<sub>168-187</sub>, dont la séquence n'est pas impliquée dans la maladie. L'immunisation avec ce peptide n'induit pas de déficits comportementaux similaires à ceux observés avec le peptide GluN1<sub>359-378</sub>. La séquence du GluN1<sub>168-187</sub> contient un fragment appartenant à une région modulatrice du récepteur NMDA (Lesept *et al.*, 2016).

L'ensemble des données présentées ci-dessus montre que des anticorps reconnaissant différentes zones sur une même protéine (ici l'ATD de la sous unité GluN1) peuvent induire des effets très différents voire opposés en fonction de l'épitope ciblé, mais aussi en fonction du

contexte pathologique ou physiologique. Ils ne vont pas systématiquement induire une pathologie et peuvent même s'avérer très bénéfiques dans le cadre de certaines pathologies.

### *VII-3 : Le système immunitaire : point central de notre modèle*

La plupart des modèles actuels ciblent la pathogénicité des anticorps anti-NMDAR humains. Un acteur essentiel de cette pathologie est absent de la plupart des modèles : le système immunitaire. Pourtant, c'est bien lui qui permet la mise en place de cette pathologie. Il est important de le prendre en considération dans les modèles animaux pour que ces derniers soient les plus proches possible de la physiopathologie humaine et puissent être utilisés pour tester efficacement de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Dans notre modèle, nous avons pu mettre en évidence, à la suite de notre immunisation active, une réponse médiée par les lymphocytes B. Cette réponse est caractérisée par une augmentation du nombre de lymphocytes B dans les organes lymphoïdes périphériques puis de leur migration vers les méninges. Ces lymphocytes B passent dans les ventricules et se retrouvent dans le LCR. Par la suite, des plasmocytes (vraisemblablement issus de la maturation des LB) sont retrouvés dans le LCR et sont responsable de la sécrétion d'Ig au sein du LCR. Ces données sont intéressantes car elles concordent avec la physiopathologie humaine où les lymphocytes B et les plasmocytes sont retrouvés à la fois dans le cerveau et le LCR des patients (Martinez-Hernandez *et al.*, 2011 ; Dale *et al.*, 2012). C'est l'implication des lymphocytes B dans la pathologie humaine qui a conduit à l'utilisation du Rituximab® chez l'homme (Holfeld R., 2018). Cet anticorps monoclonal cible le CD20 des lymphocytes B humains et permet leur déplétion. Dans notre modèle, nous avons également déplété les lymphocytes B chez nos souris. Cette opération a été rendue possible grâce à l'utilisation simultanée d'un anticorps anti CD45R/B220 et d'un anticorps anti CD19 (Carmi *et al.*, 2015). Ce traitement a permis de reverser les symptômes de types dépressifs et de mémorisation spatiale à long terme observés chez nos souris GluN1<sub>359-378</sub>. Ce résultat confirme le rôle central des lymphocytes B dans la genèse des symptômes mimant une EAI à anticorps anti-NMDAR dans notre modèle. Néanmoins, nous nous serions attendus à un résultat plus puissant de cette déplétion qui reste incomplète. Il aurait peut-être été pertinent d'effectuer cette

déplétion à un moment différent, plus tôt ou plus tardivement pour optimiser l'élimination des LB.

Pour poursuivre sur les caractéristiques du système immunitaire, nous avons remarqué que la différenciation des lymphocytes B en plasmocytes coïncide avec une augmentation de la concentration en protéine dans le LCR et une détection des IgG anti-NMDAR dans le LCR. Ces deux paramètres sont aussi pris en compte dans l'établissement du diagnostic chez l'homme. Ces données suggèrent que ce sont les plasmocytes qui sont responsable de cette production d'anticorps anti-NMDAR dans le SNC. Ces anticorps anti-NMDAR sont retrouvés dans le tissu cérébral de nos souris et autour des ventricules comme ce qui a pu être mis en évidence dans les autres modèles murins d'EAI à anticorps anti-NMDAR (Planaguma *et al.*, 2015 ; Pan *et al.*, 2017 ; Jones *et al.*, 2019 ; Ding *et al.*, 2021).

#### *VII-4 : Pour aller plus loin dans l'étude du système immunitaire*

Dans notre modèle, nous avons mis en évidence une infiltration de lymphocytes B (B220<sup>+</sup>) au sein de l'encéphale de nos souris et nous avons caractérisé les lymphocytes B présents au sein de la rate et des ganglions lymphatiques cérébraux. Néanmoins, nous n'avons pas caractérisé avec précision les sous types de lymphocytes B que nous avons dans ces structures. En effet, comme nous avons pu le voir dans l'introduction, il existe plusieurs types de lymphocytes B. Dans la cadre de nos amas de lymphocytes B présents au sein des méninges, il serait intéressant de réaliser des marquages immunohistochimiques dans le but de caractériser précisément les sous populations lymphocytaires de ces amas. Nous n'avons pu trancher quant à la présence d'organes lymphoïdes tertiaires dans notre modèle, il serait judicieux de mieux explorer ces amas pour comprendre comment et pourquoi ils se mettent en place au sein du SNC. La présence d'organes lymphoïdes tertiaires est un fait avéré dans certaines pathologies auto-immune touchant le SNC, telle que la SEP, nous aborderons ce point ci-après.

#### *VII-4-A : L'analyse des cytokines et des chemokines dans le LCR*

L'étude du LCR dans notre modèle a permis de mettre en évidence la présence de lymphocytes B (B220<sup>+</sup>) et de plasmocytes (CD138<sup>+</sup>) qui sont également retrouvés chez

l'homme. Cependant, il est possible d'aller plus loin dans la compréhension des mécanismes inflammatoires mise en jeu en analysant les cytokines et les chemokines retrouvées dans le LCR de nos souris immunisées. L'analyse des différentes cytokines et chemokines peut être un bon indicateur du type cellulaire impliqué (différents types de lymphocyte T ou lymphocyte B) et pourrait être le reflet de la sévérité inflammatoire. Les cytokines et les chemokines sont des médiateurs cellulaires centraux dans les processus inflammatoires et leur élévation est observée dans différents désordres auto-immuns touchant le système nerveux central. En effet, il a été démontré chez des patients atteints d'EAI à anticorps anti-NMDAR, une augmentation des cytokines/chemokines TNF- $\alpha$ , IL-10, IFN- $\alpha$ , IL-6, CXCL10, CXCL12, CXCL13 dans le LCR. Pour réaliser leur étude (Kothur *et al.*, 2016), une technique « *multiplex immunoassay* » a été réalisé. Cette technique permet l'étude simultanément de plusieurs cytokines et chémokines en une seule fois et pourrait permettre dans notre cas, l'étude d'un large panel de candidats cytokiniques en complément de la cytométrie en flux réalisée pour le phénotypage des différentes populations lymphocytaires présents dans le LCR (Kothur *et al.*, 2016). Il serait intéressant chez nos souris de pouvoir réaliser cette même technique sur le LCR et d'extraire un profil des cytokines/chemokines à un instant donné et de corrélérer cela à l'état cognitif, mnésique de nos souris mais aussi de corrélérer cela à l'infiltration leucocytaire que nous avons pu décrire deux semaines post immunisation ou bien encore lors du protocole de déplétion des lymphocytes B dans notre modèle murin.

Une étude de Leybold et collaborateurs en 2015 a mis en évidence une élévation significative du taux de CXCL13 dans le LCR chez 70 % des patients atteint d'EAI à anticorps anti-NMDAR durant la phase aiguë de la maladie (9.6pg/ml chez les patients atteints de l'EAI à anticorps anti NMDAR contre 1.4 pg/ml chez les individus contrôles ne présentant pas de troubles neuro-inflammatoires). Cette élévation de CXCL13, qui peut perdurer dans le temps après la mise en place d'un traitement, peut être corrélée à la survenue de rechutes en parallèle d'une mauvaise réponse aux traitements. De manière intéressante, la chémokine CXCL13 n'est pas augmentée dans le sérum des sujets sains, ce qui peut en faire un biomarqueur relevant à ajouter dans l'analyse du LCR pour l'établissement d'un pronostic et l'étude de biomarqueurs dans notre modèle (Leybold *et al.*, 2015). Il a déjà été mis en évidence dans d'autres études

que la chemokine CXCL13 participe à l'attraction des lymphocytes B dans le SNC lors d'un contexte neuro-inflammatoire. En effet, CXCL13 favoriserait la formation d'organes lymphoïdes ectopiques (OLE) au sein du SNC chez des patients atteints de SEP mais également dans un modèle murin de SEP (Magliozzi *et al.*, 2004 ; Serafini *et al.*, 2004). Ces organes lymphoïdes tertiaires ectopiques sont généralement situés dans les méninges et, à l'instar des centres germinatifs observés dans les ganglions lymphatiques, ils sont composés des mêmes types cellulaires tels que des lymphocytes B, des lymphocytes T auxiliaires folliculaires et des cellules dendritiques. Des modèles murins EAE mimant une SEP RR ont permis la mise en évidence d'OLE contenant des cellules dendritiques exprimant la chémokine CXCL13 qui régule la migration des lymphocytes B et des T auxiliaires. Dans notre modèle, nous avons mis en évidence des agrégats de lymphocytes B au niveau des méninges. Cependant, ces agrégats n'étaient pas composés de lymphocytes T et nous n'avons donc pas pu les caractériser en organes lymphoïdes tertiaires. Il serait pertinent de prélever le cerveau de nos souris à un temps plus tardif (trois ou quatre semaines post immunisation) pour mettre en évidence des OLE méningés composés de lymphocytes B, de lymphocytes T auxiliaires mais aussi de cellules dendritiques, car ces OLT pourraient potentiellement mettre plus de temps à émerger dans le SNC. La chémokine CXCL13 pourrait s'avérer être un biomarqueur intéressant à inclure dans l'étude du LCR de nos animaux mais également dans des études immunohistochimiques permettant la caractérisation avec précision d'OLE méningés (Leypold *et al.*, 2015).

#### *VII-4-B : BAFF et APRIL : deux candidats de choix dans la lignée des lymphocytes B*

BAFF et APRIL sont deux cytokines impliquées dans la maturation et la survie des lymphocytes B. Ils agissent en se fixant aux récepteurs BAFF-R et TACI. BAFF, via son interaction avec BAFF-R, est essentiel dans la maturation et la survie des lymphocytes B immatures. Il a été précédemment mis en évidence dans d'autres désordres auto-immuns touchant le SNC, une augmentation des facteurs BAFF et APRIL dans le LCR. C'est le cas dans la neuromyélie optique, la sclérose en plaques ou encore le lupus érythémateux systémique suggérant un rôle central de BAFF et APRIL dans ces processus auto-immuns (George-Chandy *et al.*, 2008 ; Kotur *et al.*, 2016 ; Quan *et al.*, 2012).



Etant donné le rôle central des lymphocytes B dans notre modèle, il est envisageable que ces deux candidats soient élevés dans le LCR de nos souris comme ce qui peut être le cas dans d'autres pathologies auto-immunes impliquant les lymphocytes B. Il serait possible d'étudier BAFF et APRIL dans le LCR de nos animaux en utilisant par exemple un test ELISA comme ce qui a été réalisé par l'équipe de Deng et collaborateurs en 2017 avec le LCR de patients atteints d'EAI à anticorps anti-NMDAR. Leur étude démontre une élévation des taux de BAFF et APRIL dans le LCR des patients mais démontre aussi une corrélation avec la sévérité de la pathologie. En effet, plus les taux de BAFF et APRIL sont élevés dans le LCR des patients et plus le pronostic est défavorable. Nous pourrions corrélérer cela à nos études chez la souris et l'utiliser comme biomarqueur pronostic, en stratifiant différents groupes. Par exemple, un groupe avec peu de déficits comportementaux et mnésiques et un groupe avec de gros déficits comportementaux et mnésiques puis en quantifiant BAFF et APRIL dans le LCR de ces deux groupes et observer s'il y a une corrélation entre les déficits cognitifs observés, leur sévérité et l'élévation de ces deux molécules dans le LCR de nos souris (Deng *et al.*, 2017).

## VII-5 : Perspectives de recherches basées sur les études *in vitro* et *in vivo*

### VII-5-A : Les études *in vitro*

Différents modèles *in vitro* ont permis de mettre en évidence la pathogénicité des anticorps anti-NMDAR de patients atteints d'EAI à anticorps anti-NMDAR. Ces expériences *in vitro* ont permis de montrer sur des cultures de neurones hippocampiques de rat que les anticorps anti-NMDAR causaient une baisse sélective et réversible de la densité des NMDAR (Hughes *et al.*, 2010).

Le peptide que nous avons utilisé afin de modéliser l'EAI à anticorps anti-NMDAR chez l'animal a montré son efficacité concernant son immunogénicité (médiée principalement par les lymphocytes B) et sa pathogénicité (induction de déficits comportementaux proches de ceux décrits chez l'humain). Une des premières questions à laquelle nous aimerions répondre serait de confirmer le(s) mécanisme(s) d'action de nos anticorps. Cela nous permettrait de s'assurer qu'ils suivent le même mécanisme d'action que les anticorps anti-NMDAR humains pathogènes évoqué plus haut. Pour ce faire, il serait intéressant que nous puissions démontrer

les mécanismes moléculaires impliqués dans la pathogénicité des anticorps anti-NMDAR issus de notre immunisation active.

A la manière de Hughes et collaborateurs en 2010, nous pourrions mettre en culture des neurones hippocampiques de rongeurs et tester l'effet des anticorps anti-NMDAR produits à la suite de notre immunisation sur la densité en NMDAR au niveau synaptique mais aussi sur leur localisation fine au niveau post-synaptique (synaptique ou extra synaptique). Cette expérience nous permettrait de savoir si les anticorps générés par notre immunisation induisent les mêmes effets que les anticorps anti-NMADR humains (Hughes et al., 2010).

Pour aller plus loin dans la compréhension des mécanismes moléculaires, une étude menée par Mikasova et collaborateurs en 2012 a permis de montrer que l'effet des anticorps anti-NMDAR peut être reversé via l'activation *in vitro* des EphB2R. Rappelons que l'EphB2R permet l'ancrage du NMDAR au niveau post synaptique et que les anticorps anti-NMDAR humains vont rompre cette liaison EphB2R/NMDAR induisant un glissement du NMDAR en extra synaptique puis son internalisation (Mikasova *et al.*, 2012). L'ajout d'éphrine-B2, le ligand naturel de l'EphB2R dans le milieu de culture des neurones permet l'activation de l'EphB2R et inhibe la diffusion en extra synaptique des NMDAR. Cet ajout d'éphrine-B2 reverse donc les effets pathogènes des anticorps sur le NMDAR. Nous pouvons envisager de tester ce protocole pour confirmer les études préalables concernant les anticorps pathogènes et confirmer que les auto-anticorps produits dans notre modèle peuvent conduire aux mêmes effets.

#### *VII-5-B : Les études in vivo*

Nous avons vu que l'activation *in vitro* des EphB2R avec leur ligand, l'éphrine-B2 limitait la diffusion en extra synaptique des NMDAR dans des cultures de neurones hippocampiques de rat. L'équipe de Planagumà et collaborateur en 2016 a étudié l'effet d'une injection d'éphrine-B2 dans leur modèle murin d'infusion d'anticorps anti-NMDAR humains (Planagumà *et al.*, 2015). De manière intéressante, l'addition d'éphrine-B2 permet une réduction des déficits mnésiques et cognitifs induits chez la souris par les auto-anticorps de patients (Planagumà *et al.*, 2016). Si les anticorps anti-NMDAR générés par notre immunisation agissent selon le même mécanisme que les anticorps anti-NMDAR humains pathogènes,

l'injection d'éphrine-B2 à nos souris pourrait reverser les déficits comportementaux et mnésiques observés et ouvrir la voie à de nouvelles pistes thérapeutiques.

## *VIII : Conclusion*

En conclusion de ce travail, nous pouvons dire que notre modèle décrit dans cette thèse va apporter un support pertinent nous aidant à mieux comprendre les mécanismes physiopathologiques de l'EAI à anticorps anti-NMDAR. Avec notre nouveau modèle murin, nous avons pu commencer à aborder le système immunitaire, davantage dans sa globalité, ce qui n'est pas toujours pris en compte dans les modèles actuels mais qui est pourtant central dans la pathologie.

Notre modèle a permis de valider notre premier objectif en mettant en évidence des déficits comportementaux robustes comprenant des troubles anxieux, dépressifs et mnésiques proches de ceux observés chez l'homme à la suite d'une immunisation active. Ces déficits sont aussi cohérents avec ceux observés dans un modèle basé sur l'infusion d'anticorps anti-NMDAR de patients.

Nous avons aussi pu valider notre deuxième objectif en montrant une forte implication des lymphocytes B et des plasmocytes avec des techniques pertinentes comme la cytométrie en flux. En accord avec la pathologie humaine, nous observons dans notre modèle une infiltration de lymphocytes B qui se différencient en plasmocytes et permettent la présence d'anticorps anti-NMDAR au sein du LCR de nos souris. Ces plasmocytes sont l'origine de la production intrathécale d'anticorps anti-NMDAR au sein du SNC. Pour valider l'effet des lymphocytes B dans notre modèle, un protocole de déplétion de ces derniers a été utilisé. De manière intéressante, il a permis de réduire les déficits comportementaux observés chez nos souris tout en réduisant le nombre de lymphocyte B sanguins circulants. Cette expérience valide l'implication des lymphocytes B dans notre modèle d'immunisation et le dernier objectif que nous nous étions fixés. Ce résultat très intéressant va nous permettre de tester de nouvelles thérapies ciblant les lymphocytes B en les déplaçant ou bien en agissant sur leur différenciation et/ou leur prolifération.

Pour aller plus loin dans la caractérisation de notre modèle, nous avons montré que les souris immunisées contre le peptide GluN1<sub>359-378</sub> présentaient une susceptibilité plus importante aux crises d'épilepsie induites pharmacologiquement.

Que cela soit au niveau cellulaire, moléculaire ou physiologique, notre nouveau modèle d'immunisation nous offre de nombreuses perspectives à la fois sur l'étude du système immunitaire dans les pathologies auto-immunes neuropsychiatriques, mais aussi sur les symptômes associés comme l'épilepsie. Enfin notre modèle offre à notre équipe de recherche une nouvelle thématique et la possibilité d'étudier plus précisément les mécanismes immunitaires, physiopathologiques et moléculaires associés à l'EAI à autoanticorps anti-NMDAR.

## Bibliographie

- Andersen, Per et al. 2007. The Hippocampus Book. <https://pdfs.semanticscholar.org/a2dd/f28079529c17aaa2d7087902f102ba0a28d9.pdf> (August 15, 2017).
- Anderson S. M., Tomayko M. M., Ahuja A., Haberman A. M., Shlomchik M. J. 2007. New markers for murine memory B cells that define mutated and unmutated subsets. *J. Exp. Med.* 204, 2103–2114.
- Ahlmann M, Hempel G. 2016. The effect of cyclophosphamide on the immune system: implication for clinical cancer therapy. *Cancer Chemotherapy and pharmacology.* 78:661-671.
- Ajami, B., Bennett, J. L., Krieger, C., Tetzlaff, W. & Rossi, F. M. Local self-renewal can sustain CNS microglia maintenance and function throughout adult life. *Nature Neurosci.* 10, 1538–1543
- Allen CDC, Ansel KM, Low C, Lesley R, Tamamura H, Fujii N, Cyster JG. 2004. Germinal center dark and light zone organization is mediated by CXCR4 and CXCR5. *Natu. Immunol.* 5, 943-952.
- Almqvist N, Martensson IL. 2012. The pre-BCR cell receptor; selecting for or against autoreactivity. 201; 76 (3) 256-262.
- Ahmed R, Omidian Z, Giwa A, Cornwell B, Majety N, Bell DR, et al. A public BCR present in a unique dual-receptor-expressing lymphocyte from type 1 diabetes patients encodes a potent T cell autoantigen. *Cell.* (2019) 177 :1583–99. e16. doi: 10.1016/j.cell.2019.05.007
- Alexander DD, Mink PJ, Adami HO, et al. The non-Hodgkin lymphomas: a review of the epidemiologic literature. *Int J Cancer.* 2007;120 Suppl 12:1-39.
- Amanna IJ, Slifka MK. 2010. Mechanisms that determine plasma cell life span and the duration of humoral immunity. *Immunol Rev.* 236 :125-38. doi: 10.1111/j.1600-065X.2010.00912.x.
- Amanna IJ, Carlson NE, Slifka MK. 2007. Duration of humoral immunity to common viral and vaccine antigens. *New England Journal of Medicine.* 357 1903-1915.
- Amon TI, Horton RM, Grigороva IL. 2013. Visualization of splenic marginal zone B-cell shuttling and follicular B-cell egress. *Nature.* 493(7434): 684-8.
- Armangue, Thaís et al. 2013. “Pediatric Anti-NMDAR Encephalitis-Clinical Analysis and Novel Findings in a Series of 20 Patients.” *J Pediatr.* 162(4): 850–56.
- Astorri E, Bombardieri M, Gabba S, Peakman M, Pozzilli P, Pitzalis C. 2010. Evolution of ectopic lymphoid neogenesis and in situ autoantibody production in autoimmune nonobese diabetic mice: cellular and molecular characterization of tertiary lymphoid structures in pancreatic islets. *J Immunol.* 185 :3359–68.

- Attwell, David, and Alasdair Gibb. 2005. "Neuroenergetics and the Kinetic Design of Excitatory Synapses." *Nature Reviews Neuroscience* 6(11): 841–49. <http://www.nature.com/doi/10.1038/nrn1784>.
- Avrameas S. 1991. Natural autoantibodies: from "horror autotoxicus to gnothi seauton. *Immunology today*. 12(5): 154-159.
- Backhaus O. 2018. Generation of antibody Diversity. <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.72818>
- Balu DT. 2016. The NMDA receptor and schizophrenia: from pathophysiology to treatment. *Adv. Pharmacol.* 76, 351-382.
- Barnett, L.G., et al., B cell antigen presentation in the initiation of follicular helper T cell and germinal center differentiation. *J Immunol*, 2014. 192(8): p. 3607-17.
- Batista FD, Harwood NE. 2009. The who, how and where of antigen presentation to B cells. *Nature review Immunology*.
- Baumgarth N. 2013. Innate-like B cell and their rules of engagement. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 785:57-66.
- Benarroch, Eduardo E. 2008. "Metabotropic Glutamate Receptors: Synaptic Modulators and 120 Therapeutic Targets for Neurologic Disease." *Neurology* 70(12): 964–68. <http://w>.
- B. Bergmann, O. Grimsholm, K. Thorarinsdottir, W. Ren, P. Jirholt, I. Gjertsson, I.-L. Mårtensson. 2013. Memory B cells in mouse models.
- Binder M, Otto F, Mertelsmann R, Veelken H, Trepel M. 2006. The epitope recognized by rituximab. *Immunobiology*.2006; 108,6.
- Bishop GA and Hostager BS. B lymphocyte activation by contact-mediated interactions with T lymphocytes. *Current opinion in immunology* 2001; 13: 278–285. Review 2001/06/19
- Blair PA et al. 2010. CD19(+) CD24(hi) CD38(hi) B cells exhibit regulatory capacity in healthy individuals but are functionally impaired in systemic Lupus Erythematosus patients. *Immunity*. 32 (1): 129-140.
- Blattner MS, de Bruin GS, Bucelli RC, Day GS. 2019. Sleep disturbances are common in patients with autoimmune encephalitis. *Journal of Neurology*. (2019) 266:1007-1015.
- Bloch, Karen C, and Carol A Glaser. 2015. "Encephalitis Surveillance through the Emerging Infections Program, 1997-2010." *Emerging Infectious Diseases* 21(9): 1562–67. Boeckers, T. M. 2006. "The Postsynaptic Density." *Cell and Tissue Research* 326(2): 409–22
- Blome R, Bach W, Guli X, Porath K, Sellmann T, Bien CG, Köhling R, Kirschstein T. 2018. Differentially Altered NMDAR Dependant and Independent Long-Term Potentiation in



the CA3 Subfield in a Model of Anti-NMDAR Encephalitis. *Frontiers in Synaptic neuroscience*. 10:26.

- Borhis G, Richard Y. 2015. Subversion of the B-cell compartment during parasitic, bacterial, and viral infections. *BMC immunology*. (2015) 16:15.
- Bosly A. 2009. Anticorps monoclonal anti-CD20 (rituximab) dans les maladies hématologiques et les affections auto-immunes. *Réanimation*. 15(2006) 270-277.
- Bost, Chloe. 2016. Encéphalites À Anticorps Anti-Récepteur N-Méthyl-D-Aspartate: Description de La Cohorte Française.
- Bost, Chloe, Olivier Pascual, and Jérôme Honnorat. 2016. "Autoimmune Encephalitis in Psychiatric Institutions: Current Perspectives." *Neuropsychiatric Disease and Treatment* 12: 2775–87.
- Braverman JA, Marcus C, Garg R. 2015. Anti-NMDA-receptor encephalitis: A neuropsychiatric syndrome associated with ovarian teratoma. *Gynecologic Oncologic reports*. 14 (2015) 1-3.
- Broucker de T. 2011. Encéphalites paranéoplasiques et auto-immunes : quand y penser, comment en faire le diagnostic. *Réanimation*. 20 :242-250.
- Brynjolfsson SF, Berg PL, Ekerhult OT, Rimkute I, Wick MJ, Mårtensson IL, Grimsholm OL. 2018. Long-Lived Plasma Cells in Mice and Men. *Front Immunol*. 2018; 9: 2673. doi: 10.3389/fimmu.2018.02673.
- Cambier JC, Gauld SB, Merrel KT, Vilen BJ. 2007. B-cell anergy : from transgenic models to naturally occurring anergic B cells. *Nat. Rev. Immunol*. 7(8) : 633-643.
- Cappione A, Anolik JH, Pugh-Bernard A, Barnard J, Dutcher P, Silverman G *et al*. 2005. Germinal center exclusion of autoreactive B cells is defective in human systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest*. 115 : 3205-3216.
- Carrithers MD, Visintin I, Viret C. 2002. Rôle of genetic background in P selectin - dependent immune surveillance of the central nervous system. *Journal of Neuroimmunology*. 129 :51-7.
- Carmi Y, Spitzer MH, Linde IL, Burt BM, Prestwood TR, Perlman N, et al. Allogeneic IgG combined with dendritic cell stimuli induce antitumour T-cell immunity. *Nature* 2015; 521: 99–104.
- Cattoretti, G., Shaknovich, R., Smith, P.M., Jack, H.M., Murty, V.V., and Alobeid, B. 2006. Stages of germinal center transit are defined by B cell transcription factor coexpression and relative abundance. *J. Immunol*. 177, 6930.
- Cerutti A, Cols M, Puga I. 2013. Marginal zone B cells: Virtues of innate-like antibody-producing lymphocytes. *Nature Review Immunology*. 13(2):118-32.

- Cerutti, A., and Rescigno, M. (2008). The biology of intestinal immunoglobulin A responses. *Immunity* 28, 740–750.
- Chefdeville A, Treuilleux I, Mayeur ME, Couillault C, Picard G, Bost C, Mokhtari K, Vasiljevic A, Meyronet D, Rogemond V, Psimaras D, Dubois B, Honnorat J, Desestret V. 2018. Immunopathological characterization of ovarian teratomas associated with anti N-methyl-D-aspartate receptor encephalitis. *Acta neuropathologica communication*. (2019) 7:38.
- Chu, V.T., and Berek, C. (2012). Immunization induces activation of bone marrow eosinophils required for plasma cell survival. *Eur. J. Immunol.* 42, 130–137. Chu, V.T., Fröhlich, A., Steinhauser, G., Scheel, T., Roch, T., Fillatreau, S., Lee, J.J., Löhning, M., and Berek, C. (2011). Eosinophils are required for the maintenance of plasma cells in the bone marrow. *Nat. Immunol.* 12, 151–159.
- Chu VT, Beller A, Nguyen TTN, Steinhauser G, Berek C. 2011. The long-term survival of plasma cells. *Scandinavian journal of immunology*. Vol 73, issue 6.
- Chung JB, Sater RA, Fields ML, Erikson J, Monroe JG. 2002. CD23 defines two distinct subsets of immature B cells which differ in their responses to T cell help signals. *International immunology*. 2002;14(2):157-66.
- Chung, J.B., Silverman, M., and Monroe, J.G. 2003. Transitional B cells: step by step towards immune competence. *Trends Immunol.* 24, 343–349.
- Cinamon G, Zachariah MA, Lam OM, Foss Jr FW, Cyster JG. 2008. Follicular shuttling of marginal zone B cells facilitates antigen transport. *Nature immunology*. 9(1):54-62.
- Citri A; Malenka RC. 2008. Synaptic plasticity: Multiple forms, functions and mechanisms. *Neuropsychopharmacology*. **33**, 18-41.
- Corcoran, A.E. (2005). Immunoglobulin locus silencing and allelic exclusion. *Semin. Immunol.* 17, 141– 154.
- Coyle JT. 2012. NMDA Receptor and Schizophrenie: A brief History. *Schizophrenia Bulletin*. 38(5)920-926.
- Cull-Candy, S., S. Brickley, and M. Farrant. 2001. “NMDA Receptor Subunits: Diversity, Development and Disease.” *Current Opinion in Neurobiology* 11(3): 327–35.
- Cull-Candy, S. G., and D. N. Leszkiewicz. 2004. “Role of Distinct NMDA Receptor Subtypes at Central Synapses.” *Science Signaling* 2004(255): re16-re16. <http://stke.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/stke.2552004re16>.
- Cunningham AF, Langarica AF, Bobat S, Dominguez Medina CC, Cook CNL1 , Ross EA , Lopez-Macias C2, Henderson RI. 2014. B1 cells recognize protective antigens after natural infection and vaccination. *Frontiers in immunology*. 5-535.
- Crottys S. 2011. Follicular helper CD4 T cells T<sub>FH</sub>. *Annu Rev Immunol.* **29** : 621-663.

- Dale RC, Pillai S, Brilot F. 2012. Cerebrospinal fluid CD19+ B-cell expansion in N-methyl-D-aspartate receptor encephalitis. *Developmental Medicine and Child Neurology*. 10.1111/dmcn.12036.
- Dalmau J. 2016. NMDA receptor encephalitis and other antibody-mediated disorders of the synapse. *The 2016 Cotzias Lecture. American Academy of Neurology*. 87 : 2471-2482.
- Dalmau J, Gleichman AJ, Hughes EG, Rossi JE, Peng X, Lai M, Dessain SK, Rosenfeld MR, Balice-Gordon R, Lynch DR. 2008. Anti-NMDA-receptor encephalitis case series and analysis of the effects of antibodies. *Lancet Neurology*. 7 (12): 1091-1097.
- Dalmau J, Tuzun E, Wu H, Masjuan J, Rossi J, Voloschin A, Baehring J, Shimazaki H, Koide R, King D, Mason W, Sansing L, Dichter M, Rosenfeld M, Lynch DR. 2007. Paraneoplastic anti-N-methyl-D-aspartate receptor encephalitis associated with ovarian teratoma. *Annals of Neurology*. 61, 25-36.
- Dalmau J, Lancaster E, Martinez-Hernandez E, Rosenfeld MR, Balice-Gordon R. 2011. Clinical experience and laboratory investigations in patients with anti-NMDAR encephalitis. *Lancet Neurology*. 10 (1): 63-74.
- Dalva MB, McClelland AC, Kayser MS. 2007. Cell adhesion molecules: signalling functions at the synapse. *Nature Review Neurosciences*. 2007; 8: 206–20.
- Daneman R. The blood-brain barrier in health and disease 2012. *Ann Neurol*. 72 :648–672.
- Day GS, Laiq S, Tang-Wai DF, Munoz DG. 2014. Abnormal neurons in teratomas in NMDAR encephalitis. *JAMA neurology*. 71 (6): 717-24.
- Deng B, Liu XN, Zhang X, Quan C, Chen XJ. 2017. Raised cerebrospinal fluid BAFF and APRIL levels in anti-N-methyl-D-Aspartate receptor encephalitis: Correlation with clinical outcome. *Journal of Neuroimmunology*. 305 (2017) 84-91.
- Ding Y, Zhou Z, Chen J, Peng Y, Wang H, Qiu W, Xie W, Zhang J, Wang H. 2021. Anti-NMDAR encephalitis induced in mice by active immunization with a peptide from the amino-terminal domain of the GluN1 subunit. *Journal of Neuroinflammation*. (2021) 18:53.
- Dowben JS, Kowalski PC, Kelter NL. 2015. Biological Perspectives Anti-NMDA Receptor Encephalitis. 51-236-240.
- D'Souza L, Bhattacharya D. 2019. Plasma cells: You are what you eat. *Immunol Rev*. 2019 Mar ;288(1) :161-177. doi: 10.1111/imr.12732.
- Du J, Li XH, Li YJ. 2016. Glutamate in peripheral organs biology and pharmacology. *European journal of Pharmacology*. 784 :42-8.

- Dzamba D, Honsa P, Anderova M. 2013. NMDA receptors in glial cells: pending questions. *Current neuropharmacology*. 11 : 250-62.
- Elgeta R, Benson MJ, De Vries VC, Wasiuk, Guo Y, Noelle RJ. 2009. Molecular mechanism and function of CD40/CD40L engagement in the immune system. *Immunol Review*. 229 : 152-172.
- Emerson RO, Dewitt WS, Vignali M, Gravley J, Hu JK, Osborne EJ, et al. Immunosequencing identifies signatures of cytomegalovirus exposure history and HLA-mediated effects on the T cell repertoire. *Nat Genet*. (2017) 49 :659– 65. doi: 10.1038/ng.3822
- Emile JF, Brousse N. 1992. Physiologie de la réponse immunitaire humorale thymodépendante. *Médecine/sciences mini-synthèse*. 1992; 8 :588-90.
- Ehrenreich H. 2018. Autoantibodies against *n*-methyl-*d*-aspartate receptor 1 in health and disease. *Curr Opin Neurol*. 2018 Jun; 31(3): 306–312. Published online 2018 Apr 26. doi: [10.1097/WCO.0000000000000546](https://doi.org/10.1097/WCO.0000000000000546).
- Eto D, Lao C, DiToro D, Barnett B, Escobar TC, Kageyama R *et al*. 2011. IL-21 and IL-6 are critical for different aspects of B cell immunity and redundantly induce optimal follicular helper CD4 T cell (Tfh) differentiation. *Plos One*. 6 : 17739.
- Evans JG, Chavez-Rueda KA, Eddaoudi A, Meyer-Bahlburg A, Rawlings DJ, Ehrenstein MR, Mauri C. 2007. Novel suppressive function of transitional 2 B cells in experimental arthritis. *J. Immunol*. 178(12) : 7868-78.
- Feng F, Fan S, Sun Y, Zhang Z, Ren H, Li W, Cui L, Peng B, Ren X, Zhang W, Guan H, Wang J. 2017. Study of B cell Repertoire in patients with Anti N-Methyl-D-Aspartate Encephalitis . *Frontiers in immunology*. 11 :1539.
- Ferraro TN, Golden GT, Smith GG, St Jean P, Scork NJ, Mulholland. 1998. Mapping loci for pentylentetrazol-induced seizure susceptibility in mice. *Journal of Neurosciences*. 19: 6733-9.
- Ferraro TN, Golden GT, Snyder R, Laibinis M, Smith GG, Buono RJ. 1998. Genetic influences on electrical seizure threshold. *Brain Research*. 813 : 207-10.
- Florance NR, Davis RL, Lam C, Szperka C, Zhou L, Ahmad S, Campen CJ, Moss H, Peter N, Gleichman AJ, Glaser CA, Lynch DR, Rosenfeld MR, Dalmau J. 2009. Anti-N-methyl-D-aspartate receptor (NMDAR) encephalitis in children and adolescents. *Annals of Neurology*. 66, 11-18.
- Finke, Carsten et al. 2015. "Structural Hippocampal Damage Following Anti-N-Methyl-DAspartate Receptor Encephalitis." *Biological psychiatry*. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006322315001493> (May 18, 2015).

- Fillatreau S, Sweenia CH, McGeachy MJ, Gray D, Anderton SM. 2002. B cells regulates autoimmunity by provision of IL-10. *Nat. Rev. Immunol.* 3(10) : 944-950.
- Fournier AP, Quenault A, Martinez de Lizarrondo SM, Gauberti G, Defer G, Vivien D, Docagne F, Macrez R. 2017. Prediction of disease activity in models of multiple sclerosis by molecular magnetic resonance imaging of P-selectin. 114 **(23)** 6116-6121.
- Fournier AP, Baudron E, Wagnon I, Aubert P, Vivien D, Neunlist M, Bardou I, Docagne F. 2020. Environmental enrichment alleviates the deleterious effects of stress in experimental autoimmune encephalitis. *ETC Journal*.
- Frechette ES, Zhou L, Galetta SL, Dalmau J. 2011. Prolonged follow-up and CSF antibody titers in a patient with anti-NMDA receptor encephalitis. *Neurology.* 76: S64-6.
- Fujitas N, Jayes DL, Geigerman C, Akyldiz A, Moeney MR, Boss JM, Wade PA. 2004. MT3A and the Mi-2/NuRD complexe regulate cell fate during B lymphocyte differentiation. *Cell.* 119:75-86.
- Fujinami RS, Oldstone MB, Wroblewska Z, Frankel ME, Koprowski H. 1983. Molecular mimicry in virus infection: crossreaction of measles virus phosphoprotein or of herpes simplex virus protein with human intermediate filaments. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1983 Apr; 80(8):2346-50.
- Furukawa H. 2012. Structure and function of glutamate receptor amino terminal domains. *The journal of physiology.*590.1 **(2012)** pp 63-72.
- Gaberel T, Macrez R, Gauberti M, Montagne A, Hebert M, Petersen K-U, et al. Immunotherapy blocking the tissue plasminogen activator-dependent activation of N-methyl-D-aspartate glutamate receptors improves hemorrhagic stroke outcome. *Neuropharmacology* 2013; 67: 267–271.
- Gable et al., 2012. “The Frequency of Autoimmune N-Methyl-D-Aspartate Receptor Encephalitis Surpasses That of Individual Viral Etiologies in Young Individuals Enrolled in the California Encephalitis Project.” *Clinical Infectious Diseases* 54(7): 899–904. <http://cid.oxfordjournals.org/lookup/doi/10.1093/cid/cir1038>.
- Gable MS, Gavali S, Radner A, Tilley DH, Lee B, Dyer L, Collins A, Dengel A, Dalmau J, Glaser CA. 2009. Anti-NMDA receptor encephalitis: report of ten cases and comparison with viral encephalitis. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases.*28: 1421-1429.
- Gaillard R, Gourion D, Llorca PM. 2013. Anhedonia in depression. *L'encéphale* 39. **(4)** : 296-305.
- Gao J, Ma X, Gu W, Fu M, An J, Xing Y, Gao T, Li W, Liu Y. 2012. Novel functions of murine B1-cells: Active phalocytic and microbicidal abilities. *European Journal of Imunology.* Vol 42, Issue 4. 982-992.

- Geis C, Planagumà J, Carreno M, Graus F, Dalmau J. Autoimmune seizures and epilepsy. *Journal of Clinical Investigations*. 129 : 926-940.
- George-Chandy A, Trysberg E, Eriksson K. 2008. Raised intrathecal levels of APRIL and BAFF in patients with systemic lupus erythematosus: relationship to neuropsychiatric symptoms. *Arthritis Research Therapy*. 10,R97.
- Ghosn EE, Dadate-Ngatchou P, Yang Y et al. 2011. Distinct progenitors for B-1 and B-2 cells are present in adult mouse spleen. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 108(7) : 2879-2884.
- Gielen M. 2010. Fonctionnement des récepteurs-canaux du glutamate. Des protéines responsables de la transmission synaptique excitatrice. *Médecine/Sciences*. 26:65-72.
- Gitiaux C, Simonnet H, Eisermann M, Leunen D, Dulac O, Nabbout R, Chevignard M, Honnorat J, Gataullina S, Musset L, Scalais E, Gauthier A, Hully M, Boddaert N, Kuchenbuch M, Desguerre I, Kaminska A.2013. Early electro-clinical features may contribute to diagnosis of the anti-NMDA receptor encephalitis in children. *Clinical neurophysiology: Official Journal of the International Federation of the Clinical Neurophysiology*. 124(12):2354-61.
- Gladding, Clare M., and Lynn A. Raymond. 2011. "Mechanisms Underlying NMDA Receptor Synaptic/extrasynaptic Distribution and Function." *Molecular and Cellular Neuroscience* 48(4): 308–20. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mcn.2011.05.001>.
- Gleichman AJ, Spruce LA, Dalmau J, Seeholzer SH, Lynch DR. 2012. Anti-NMDA Receptor Encephalitis Antibody Binding Is Dependant on Amino Acid Identity of a small Region Within the GluN1 Amino Terminal Domain. *Journal of Neurosciences*. 32(32): 11082-11094.
- Granerod, Julia et al. 2010. "Causes of Encephalitis and Differences in Their Clinical Presentations in England: A Multicentre, Population-Based Prospective Study." *The Lancet Infectious Diseases* 10(12): 835–44. [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(10\)70222-X](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(10)70222-X).
- Gresa-Arribas N, Titulaer MJ, TorrentsA, Aguilar E, McCracken L, Leypold F, Gleichman AJ, Balice-Gordon R, Rosenfeld MR, Lynch D, Grauss F, Dalmau J. 2014. Antibody titres at diagnosis and during follow-up of anti-NMDA receptor encephalitis: a retrospective study. *Lancet neurology*. 13, 167-177.
- Greenbaum A, Hsu YM, Day RB, Schuettpelz LG, Christopher MJ, Borgerding JN, Nagasawa T, Link DC. 2013. CXCL12 in early mesenchymal progenitors is required for hematopoietic stem cell maintenance. *Nature*. 495 (7440): 227-230.
- Groc, L. et al. 2006. "NMDA Receptor Surface Mobility Depends on NR2A-2B Subunits." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103(49): 18769–74. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17124177> (August 16, 2017).



- Groc, Laurent et al. 2004. "Differential Activity-Dependent Regulation of the Lateral Mobilities of AMPA and NMDA Receptors." *Nature neuroscience* 7(7): 695–96. <http://www.nature.com/doi/10.1038/nn1270> (August 16, 2017).
- Goodnow CC, Sprent J, Fazekas de St Groth B, Vincesa CG. 2005. Cellular and genetic mechanisms of self-tolerance and autoimmunity. *Nature*. 2; 435(7042):590-7.
- Gunduz-Bruce. 2009. The acute effects of NMDA antagonists: From the rodent to the human brain. *Brain Res.Rev.* 60, 279-286.
- Halverson R, Torres RM, Pelonda. 2004. Receptor editing in the main mechanism of B cell tolerance toward membrane antigens. *Nature immunology*. Vol 5, Num 6.
- Han Y, Li H, Guan Y, Huang J. Immune repertoire: a potential biomarker and therapeutic for hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett.* (2016) 379:206– 12. doi: 10.1016/j.canlet.2015.06.022
- Hara M, Martinez-Hernandez E, Arino H, Armangue T, Spatola M, PetitPedrol M, et al. Clinical and pathogenic significance of IgG, IgA, and IgM antibodies against the NMDA receptor. *Neurology*. (2018) 90:e1386– 94. doi: 10.1212/WNL.0000000000005329
- Haradtke S, Ohl L, Forster R. 2005. Balanced expression of CXCR5 and CCR7 on follicular T helper cells determines their transient positioning to lymph node follicles and is essential for efficient B-cell help. *Blood*. **106**: 1924-1931.
- Harris, Alexander Z., and Diana L. Pettit. 2007. "Extrasynaptic and Synaptic NMDA Receptors Form Stable and Uniform Pools in Rat Hippocampal Slices." *The Journal of Physiology* 584(2): 509–19.
- Hayakawa K, Hard, Paks D, Hezeeg LA. 1983. The LY-1 B cell subpopulation in normal immunodeficient, and autoimmune mice. *J. Exp. Med.* 157, 202–218.
- Haynes, N.M., Allen, C.D.C., Lesley, R., Ansel, K.M., Killeen, N., and Cyster, J.G. (2007). Role of CXCR5 and CCR7 in follicular Th cell positioning and appearance of a programmed cell death gene-1high germinal center-associated subpopulation. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 179, 5099–5108.
- Heine, J. et al. 2015. "Imaging of Autoimmune Encephalitis – Relevance for Clinical Practice and Hippocampal Function." *Neuroscience*. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0306452215004790>.
- Hervé M, Isnardi I, Ng YS, Bussel JB, Ochs HD, Cunningham-Rundles C, Meffre E. 2007. CD40 ligand and MHC class II expression are essential for human peripheral B cell tolerance. *J Exp Med* 204 : 1583–1593, 2007.
- Herzog S, Reth M, Jumaa H. 2009. Regulation of B-cell proliferation and differentiation by pre-B-cell receptor signaling. *Nature Review Immunology*. Volume 9: 195-205.
- Hoffman W, Lakkis FG, Chalasani G. 2016. B Cells, Antibodies and More. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2016 Jan 7; 11(1): 137–154.

- Hogan-Cann, Adam D., and Christopher M. Anderson. 2016. "Physiological Roles of NonNeuronal NMDA Receptors." *Trends in Pharmacological Sciences* 37(9): 750–67. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tips.2016.05.012>.
- Hohlfeld R. 2018. B-cells as therapeutic targets in neuro-inflammatory diseases. *Clinical Immunology*. 2018 ; 186 :51-53.
- Huppert J, Closhen D, Crowford R, White R, Kulig P, Pietrowski E, Bechmann I, Becher B, Luhmann HJ, Waisman A, Kuhlmann RW. 2010. Cellular mechanisms of IL-17-induced blood brain barrier disruption. *FASEB J*. 24, 1023-1034.
- Hughes EG, Peng X, Gleichman AJ, Lai M, Zhou L, Tsou R, Parsons TD, Lynch DR, Dalmau J, Balice-Gordon RJ. 2010. Cellular and synaptic mechanisms of anti-NMDA receptor encephalitis. *Journal of Neurosciences*. 28; 30(17): 5866-5875.
- Hrishu AP, Sethuraman M. 2019. Cerebrospinal Fluid (CSF) Analysis and Interpretation in Neurocritical Care for Acute Neurological Conditions. *Indian J Crit Care Med*. 2019 Jun; 23(Suppl 2): S115–S119. doi: 10.5005/jp-journals-10071-23187
- Imbach, P., Barandun, S., d'Apuzzo, V., Baumgartner, C., Hirt, A., Morell, A. et al. (1981) High-dose intravenous gammaglobulin for idiopathic thrombocytopenic purpura in childhood. *Lancet* 1: 1228–1231
- Irani SR, Bera K, Waters P, Zuliani L, Maxwell S, Zandi MS, et al. N-methyl-D-aspartate antibody encephalitis: temporal progression of clinical and paraclinical observations in a predominantly non-paraneoplastic disorder of both sexes. *Brain* 2010; 133: 1655–1667.
- Janz S, Potter M, Rabkin CS. Lymphoma- and leukemia-associated chromosomal translocations in healthy individuals. *Genes Chromosomes Cancer*. 2003; 36:211-223.
- Jeannin-Mayer S, André-Obadia N, Rosenberg S, Boutet C, Honnorat J, Antoine JC, Mazzola L. 2019. EEG analysis in anti-NMDA receptor encephalitis: Description of typical patterns. *Clinical Neurophysiology*. 130 (2019) 289-296.
- Jézéquel J, Johnsson EM, Dupuis JP, Rogemond V, Gréa H, Kellermayer B, Hamdani N, Le Guen E, Rabu C, Lepleux M, Spatola M, Mathias E, Bouchet D, Ramsey AJ, Yolken RH, Tamouza R, Dalmau J, Honnorat J, Leboyer M, Groc L. 2017. Dynamic disorganization of synaptic NMDA receptors triggered by autoantibodies from psychotic patients. *Nature Communications*. 8:e2466.
- Jones BE, Tovar KR, Goehring A, Jallal-Yazdi F, Okada NJ, Gouaux E, Westbrook GL. 2019. Autoimmune receptor encephalitis in mice induced by active immunization with conformationally stabilized holoreceptors. *Sciences Translational Medicine*. 11, eaaw0044 (2019).
- Kallies A et al., 2007. Initiation of plasma-cell differentiation is independent of the transcription factor Blimp-1. *Immunity*. 26, 555-566.

- Kallies A, Hashold J, Tarlinton DM, Dietrich W, Corcoran LM, Hodgkin PD et al., 2004. Plasma cell ontogeny defined by quantitative changes in Blimp-1 expression. *J. Exp. Med.* 200; 967-77.
- Káradóttir, Ragnhildur, Pauline Cavelier, Linda H Bergersen, and David Attwell. 2005. "NMDA Receptors Are Expressed in Oligodendrocytes and Activated in Ischaemia." *Nature* 438(7071): 1162–66.
- Kataoka, Hiroshi, Nobuhiro Sawa, Yasuyo Tonomura, and Satoshi Ueno. 2017. "Early Progression of Brain Atrophy in Patients with Anti-N-Methyl-D-Aspartate Receptor Encephalitis." *Medicine* 96(17): e6776. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28445312> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC5413277> <http://Insights.ovid.com/crossref?an=00005792-201704280-00061>.
- Kayser MS, Dalmau J. 2016. Anti-NMDA receptor encephalitis, autoimmunity, and psychosis. *Schizophrenia Research.* 176 (1): 36-40.
- Keenan RA, De Riva A, Corleis B et al. Censoring of autoreactive B cell development by the pre-B cell receptor. *Science* 2008;321:696–9.
- Kim, M.-S., Lapkouski, M., Yang, W., and Gellert, M. (2015). Crystal structure of the V(D)J recombinase RAG1-RAG2. *Nature* 518, 507–511.
- Kipp M, Nyamoya S, Hochstrasser T, Amor S. Multiple sclerosis animal models: a clinical and histopathological review. *Brain pathology review.* 27 (2017) 123-137.
- Kitamura D, Roes J, Kuhn R, Rajewsky K. 1991. A B cell-deficient mouse by targeting disruption of the membrane exon of the immunoglobulin  $\mu$  chain gene. *Nature.* 350, 423-426.
- Kivisakk, P. et al. Human cerebrospinal fluid central memory CD4+ T cells: evidence for trafficking through choroid plexus and meninges via P-selectin. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 100, 8389–8394 (2003).
- Klein U, Dalla-Favera R. 2008. Germinal centres: role in B-cell physiology and malignancy. *Nature Immunology Review.* Volume 8: 22-33.
- Kolmer W. 1921. Über eine eigenartige Beziehung von Wanderzellen zu dem Chorioalplexus des Gehirns der Wirbeltiere. *Anat Anz.* 1921; 54:15-23.
- Köhr, Georg. 2006. "NMDA Receptor Function: Subunit Composition versus Spatial Distribution." *Cell and Tissue Research* 326(2): 439–46.
- Kothur K, Wienholt L, Mohammad SS, Tantsis EM, Pillai S, Britton PN, Jones CA, Angiti RR, Barnes EH, Schlub T, Bandodkar S, Brilot F, Dale RC. 2016. Utility of CSF Cytokine-Chemokine as Markers of Active Intrathecal Inflammation: Comparison of Demyelinating, Anti-NMDAR and Enteroviral Encephalitis. *Plos One.* DOI: 10.1371.

- Kothur K, Wienholt L, Brilot F, Dale RC. 2016. CSF cytokines/chemokines as biomarkers in neuroinflammatory CNS disorders; a systematic review. *Cytokine* 77, 227-237.
- Kreye J, Wenke NK, Chayka M, Leubner J, Murugan R, Maier N, et al. Human cerebrospinal fluid monoclonal N-methyl-D-aspartate receptor autoantibodies are sufficient for encephalitis pathogenesis. *Brain*. (2016) 139 :2641–52. doi: 10.1093/brain/aww208
- Kurosaki T, Kometani K, Ise W. 2015. Memory B cells. *Nat. Rev. Immunol.* 15 : 149-159.
- Lalive P.H. 2011. Biomarqueurs en neuro-immunologie. *Revue médicale suisse*. 7 :860-6.
- Lanzavecchia, A., and Sallusto, F. (2007). Toll-like receptors and innate immunity in B-cell activation and antibody responses. *Curr. Opin. Immunol.* 19, 268–274.
- Lau, C.G., and Zukin, R.S. 2007. NMDA receptor trafficking in synaptic plasticity and neuropsychiatric disorders. *Nature Review Neurosciences*. 8, 413-426.
- Laurie DJ, Seeburg PH. 1994. Regional and Developmental Heterogeneity in Splicing of the Rat Brain NMDAR1 Mrna. *Journal of Neurosciences*. 14:3180-94.
- Le Guen E, Doukhan R, Hamdani N, Tamouza R, Groc L, Honnorat J, Leboyer M. 2015. Anticorps anti-NR1 dans l'encéphalite anti-récepteur N-méthyl-D-aspartate et la schizophrénie. *Médecine/sciences*. 31 : 60-7.
- Lemura Y, Yamada Y, Hirata M, Kataoka TR, Minamiguchi S, Haga H. 2018. Histopathological characterization of the neuroglial tissue in ovarian teratoma associated with anti-N-methyl-D-Aspartate (NMDA) receptor encephalitis. *Pathology International*. 68: 677-684.
- Lesept F, Chevilly A, Jezequel J, Ladépêche L, Macrez R, Aimable M, et al. Tissue-type plasminogen activator controls neuronal death by raising surface dynamics of extrasynaptic NMDA receptors. *Cell Death Dis* 2016; 7: e2466.
- Leshner AP, Myers TJ, Tecklenburg F, Streck CJ. 2010. Anti-N-methyl-D-Aspartate receptor encephalitis associated with an ovarian teratoma in an adolescent female. *Journal of Pediatric Surgery*. 45, 1550-1553.
- Leybold F, Armangue T, Dalmau J. 2015. Autoimmune encephalopathies. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1338 (1): 94-114.
- Liba Z, Kayserova J, Elisak M, Marusic P, Nohejlova H, Hanzalova J, Komarek V, Sediva A. Anti-n-methyl-d-aspartate receptor encephalitis: The clinical course in light of the chemokine and cytokine levels in cerebrospinal fluid. *J;Neuroinflammation* 13, 55.
- Limnander, A., Zikherman, J., Lau, T., Leitges, M., Weiss, A., and Roose, J.P. 2014. Protein kinase C promotes transitional B cell-negative selection and limits proximal B cell receptor signaling to enforce tolerance. *Mol. Cell. Biol.* 34, 1474–1485.

- Lin YC, Jhunjhunwala S, Benner C, Heinz S, Welinder R, Mansson R, Sigvardsson M, Hagman J, Espinoza CA, Dutkowski J, et al. 2010. A global network of transcription factors involving E2A, EBF1 and Foxo1 that orchestrates B cell fate. *Nature Immunology*. 11: 635-643.
- Lindner C, Tcamhomsenl, Wahl B et al., 2015. Diversification of memory B cells drives the continuous adaptation of secretory antibodies to gut microbiota. *Nat. Immunol*. 16: 880-888
- Lindner S, Dahlke K, Sontheimer K et al., 2013. Interleukine 21-induced granzyme B-expressing B cell infiltrate tumors and regulate T cells. *Cancer Res*. 73(8): 2468-2479.
- Lindstrom JM, Engel AG, Seybold ME. 1976. Pathological mechanisms in experimental autoimmune myasthenia gravis. II. Passive transfer of experimental autoimmune myasthenia gravis in rats with anti-acetylcholine receptor antibodies. *Journal of Experimental medicine*. 144: 739-753.E
- Ling EA, Kaur C, Lu J. 1998. Origin, nature, and some functional considerations of intraventricular macrophages, with special reference to the epiplexus cells. *Microscopic Research and Technique*. 41, 43–56.
- Liu J, Zhan W, Kim CJ et al., 2014. IL-10-producing B cells are induced early in HIV-1 infection and suppress HIV-1-specific T cell responses. *Plos One*. 9(2): e89236.
- Liu YJ, Zhang J, Lane PJ, Chan EY, MacLennan IC. 1991. Site of specific B cell activation in primary and secondary responses to T cell-dependent and T cell-independent antigens. *Eur J Immunol*. 21(12):2951-62.
- Longatti PL, Basaldella L, Orvieto E, Fiorindi A, Carteri A. Choroid plexus and aquaporin-1: a novel explanation of cerebrospinal fluid production, *Pediatr. Neurosurg*. 40 (2004) 277-283.
- Luttjohann A, Fabene PF, van Luijtelaaar G. 2009. A revised Racin’s scale for PTZ-induced seizures in rats. *Physiology behavior*.98: 579-86.
- Maat, Peter et al. 2012. “Psychiatric Phenomena as Initial Manifestation of Encephalitis by anti-NMDAR Antibodies.” *Acta Neuropsychiatrica*: 1–9. [http://www.journals.cambridge.org/abstract\\_S1601521512000274](http://www.journals.cambridge.org/abstract_S1601521512000274).
- Macrez R, Obiang P, Gauberti M, Roussel B, Baron A, Parcq J, et al. Antibodies preventing the interaction of tissue-type plasminogen activator with N-methyl-D-aspartate receptors reduce stroke damages and extend the therapeutic window of thrombolysis. *Stroke* 2011; 42: 2315–2322.
- Macrez R, Ortega MC, Bardou I, Mehra A, Fournier A, Van der Pol SMA, Haelewyn B, Maubert E, Lesept F, Chevilly A, De Castro F, De Vries HE, Vivien D, Clemente D, Docagne F. 2016. Neuroendothelial NMDA receptors as therapeutic targets in

experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain A journal of neurology*. 139; 2406-2419.

- Magliozzi R, Columba-Cabezas S, Serafini B, Aloisi F. Intracerebral expression of CXCL13 and BAFF is accompanied by formation of lymphoid follicle-like structures in the meninges of mice with relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol*. 2004;148:11–23. doi: 10.1016/j.jneuroim.2003.10.056.
- Makuch M, Wilson R, Al-Diwani A, Varley J, Kienzler AK, Taylor J, Berretta A, Fowler D, Lennox B, Leite I, Waters P, R Irani S. 2018. N-Methyl-D-Aspartate Receptor Antibody Production From Germinal Center Reactions: Therapeutic Implications. *Annals of Neurology*. 2018;83-553-561.
- Malviya M, Barman S, Golombeck KS, Planagumà J, Mannara F, Strutz-Seebohm N, Wrzos C, Demis F, Baksmeir C, Steckel J, Falk KK, Gross CC, Kovac S, Bönte K, Johnen A, Wandinger KP, Martin-Garcia E, Becker AJ, Elger CE, Klöcker N, Wiendl H, Meuth SG, Hartung HP, Seebohm G, Leybold F, Maldonado R, Stadelmann C, Dalmau J, Melzer N, Goebels N. 2017. NMDAR encephalitis: passive transfer from man to mouse by a recombinant antibody. *Annals of Clinical and Translational Neurology*. 4(11): 768-783.
- Manson R, Welinder E, Ahsberg J, Lin YC, Glass CK, Lucas JS, Sygvardsson M, Murre C. 2012. Positive interaction feedback circuitry, involving EBF1 and FOXO1, orchestrates B-cell fate. *Proc Natl Acad Sci USA*. 297: 110-113.
- Mårtensson, I.-L., Almqvist, N., Grimsholm, O., and Bernardi, A.I. (2010). The pre-B cell receptor checkpoint. *FEBS Lett*. 584, 2572–2579
- Mårtensson, I.-L., Keenan, R.A., and Licence, S. 2007. The pre-B-cell receptor. *Curr Opin Immunol*. 19, 137–142.
- Martin, F., Oliver, A.M., and Kearney, J.F. (2001). Marginal zone and B1 B cells unite in the early response against T-independent blood-borne particulate antigens. *Immunity* 14, 617–629.
- Martin F, Kearney JF. 2002. Marginal-zone B cells. *Nat. Rev. Immunol*. 2, 323-335.
- Martin, F., Oliver, A.M., and Kearney, J.F. (2001). Marginal zone and B1 B cells unite in the early response against T-independent blood-borne particulate antigens. *Immunity* 14, 617–629.
- Martinez-Hernandez E, Horwath J, Shiloh-Malawsky Y, Sangha N, Martinez-Lage M, Dalmau J. 2011. Analysis of complement and plasma cells in the brain of patients with anti-NMDAR encephalitis. *Neurology*. 77.589-593.
- Matsushita T, Yanaba K, Bouaziz JD, Fujimoto M, Tedder M. 2008. Regulatory B cell inhibits EAE initiation in mice while other B cells promote disease progression. *J Clin Invest*. 118(10): 3420-30.



- Mauri C, Ehrenstein MR. 2008. The short history of regulatory B cell. *Trends Immunol.* 29: 34-40.
- Mauri C. et al. 2003. Prevention of arthritis by interleukin 10-producing B cells. *J. Exp. Med.* 197: 489-501
- Mauri C, Menon M. 2017. Human regulatory B cell in health and disease: therapeutic potential. Centre for Rheumatology, Division of Medicine.
- McDermott, A.J. and G.B. Huffnagle. 2014. The microbiome and regulation of mucosal immunity. *Immunology.* 142(1): p. 24-31.
- Melchers F. 2015. Checkpoints that control B cell development. *Journal of clinic investigation.* 2015; 125 (6) : 2203-2210.
- Mikasova L, De Rossi P, Bouchet D, Georges F, Rogemond V, Didelot A, Meissirel C, Honnorat J, Groc L. 2012. Disrupted surface cross-talk between NMDA and Ephrin-B2 receptors in anti-NMDAR encephalitis. *Brain A journal of Neurology.* 2012: 135; 1606-1621.
- Mikkola I, Heavy B, Horcher M, Busslinger M. 2002. Reversion of B cell commitment upon loss of Pax5 expression. *Sciences.* 297: 110-113.
- Mitsdoerffer et Peters. 2016. Tertiary Lymphoid Organs in Central Nervous System Autoimmunity. *7: 4 51*
- Mizoguchi A, Mizoguchi E, Takedatsu H, Blumberg RS, Bhan AK. 2002. Chronic intestinal inflammation generates IL-10 producing regulatory B cell subset characterized by CD1d upregulation. *16(2) : 219-30.*
- Mombaert P, Clarke AR, Rudnicki MA et al., 1992. Mutations in T-cell antigen receptor genes alpha and beta block thymocyte development at different stages. *Nature.* 360, 225-231.
- Montecino-Rodriguez E, Dorshkind K: B-1 B cell development in the fetus and adult. *Immunity* 36: 13–21, 2012
- Moscato EH, Jain A, Peng X, Hughes EG, Dalmau J, Balice-Gordon RJ. 2010. Mechanisms underlying autoimmune synaptic encephalitis leading to disorders of memory, behavior and cognition: insights from molecular, cellular and synaptic studies. *European journal of neurosciences.* 32(2): 298-309.
- Murre C. 2018. “Big bang” of B-cell development revealed. *Genes development.* 15; 32 (2): 93-95.
- Nemazee, D. Receptor selection in B and T lymphocytes. *Annu. Rev. Immunol.* 18, 19–1 (2000).
- Nemazee D. 2017. Mechanisms of central tolerance for B cells. *Nature Review Immunology.* 17(5):281-294.
- Nescakova Z, Bystricky S. 2011. B cells – ontogenesis and immune memory development. *Gen. Physiol. Biophys.* (2011), 30, 1–10. Doi :10.4149/gpb\_2011\_01\_1.

- Nosadini M, Mohammad SS, Corazza F, Ruga EM, Kothur K, Perilongo G, et al. Herpes simplex virus-induced anti-N-methyl-d-aspartate receptor encephalitis: a systematic literature review with analysis of 43 cases. *Dev Med Child Neurol* 2017; 59: 796–805
- Nose M, Nishihara M, Kamogawa J, Terada M, Nakatsuru S. 2000. Genetic basis of autoimmune disease in MRL/lpr mice : dissection of the complex pathological manifestations and their susceptibility loci. *Rev Immunogenet.* 2 :154–6
- Nurieva RI, Chung Y, Hwang D, Yang XO, Kang HS, Ma L. 2008. Generation of T follicular helper cells is mediated by interleukine-21 but independent of T helper 1, 2, or 17 cell lineages. *Immunity.* 29:138-149.
- Nutt SL, Heavy B, Rolink AG, Busslinger M. 1999. Commitment to the B-lymphoid lineage depends on the transcription factor Pax5. *Nature.* 401- 556-562.
- Nutt SL, Hodgkin PD, Tarlinton DM, Corcoran LM. 2015. The generation of antibody-secreting plasma cells. *Nat. Rev. Immunol.* 15: 160-171.
- O'Connell, F.P., J.L. Pinkus, and G.S. Pinkus. 2014. CD138 (syndecan-1), a plasma cell marker immunohistochemical profile in hematopoietic and nonhematopoietic neoplasms. *American Journal of Clinical Pathology.* 121(2): p. 254-63.
- Ochsenbein AF, Fehr T, Lutz C et al. 1999. Control of early viral and bacterial distribution and disease by natural antibodies. *Science.* 286(5447).
- Oldstone MB. 1998. Molecular mimicry and immune-mediated diseases. *FASEB J.* 12: 1255-1265.
- Pahari S, Chatterjee D, Negi S, Kaur J, Singh B, Agrewala JN. 2017. Morbid Sequences Suggest Molecular Mimicry between Microbial Peptides and Self-Antigens : A Possibility of Inciting Autoimmunity. *Frontiers in microbiology.* 2017 ; 8 : 1938.
- Pan H, Oliveira B, Saher G, Dere E, Tapken D, Mitjans M, Seidel J, Wesolowski J, Wakhloo D, Klein-Schmidt C, Ronnenberg A, Schwabe K, Trippe R, Mätz-Rensing K, Berghoff S, Al-Krinawe Y, Martens H, Begeman M, Stöcker W, Kaup FJ, Reinhard M, Boretius S, Nave KA, Krauss JK, Hollmann M, Lüder F, Ehrenreich H. 2018. Uncoupling the widespread occurrence of anti-NMDAR1 autoantibodies from neuropsychiatric disease in a novel autoimmune model. *Molecular psychiatry.* 22: 1776-1784.
- Paoletti, P., Bellone, C., and Zhou, Q. 2013. NMDA receptor subunit diversity: impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease. *Nature Review Neurosciences.* 14, 383-400.
- Paoletti, Pierre, and Jacques Neyton. 2007. "NMDA Receptor Subunits: Function and Pharmacology." *Current opinion in pharmacology* 7(1): 39–47. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17088105> (February 20, 2013).
- Pape KA, Taylor JJ, Maul RW, et al. 2011. Different B cell populations mediate early and late memory during an endogenous immune response. *Science.* 331: 1203–1207. DOI: 10.1126/science.1201730.

- Parekh S, Polo JM, Shaknovich R, Juszczynski P, Lev P, Ranuncolo SM, Yin Y, Klei V, Cattoretti G, Dalla Favera R. 2007. BCL-6 programs lymphoma cells for survival and differentiation through distinct biochemical mechanism. *Blood*. 110: 2067-2074.
- Party H, Dujarrier C, Hebert M, Lenoir S, Martinez de Lizaronda S, Delepée R, Fauchon C, Bouton MC, Obiang P, Godefroy O, Save E, Lecardeur L, Chabry J, Agin V, Vivien D. 2019. Plasminogen Activator Inhibitor-1 (PAI-1) deficiency predisposes to depression and resistance to treatments. *Acta neuropathologica communications*. 14 ;7(1) :153.
- Peery, Harry E. et al. 2012. "Anti-NMDA Receptor Encephalitis. The Disorder, the Diagnosis and the Immunobiology." *Autoimmunity Reviews* 11(12): 863–72. <http://dx.doi.org/10.1016/j.autrev.2012.03.001>.
- Planagumà J, Haselmann H, Mannara F, Petit-Pderol M, Grünewald B, Aguilar E, Röpke L, Martin-Garcia E, Titulaer MJ, Jercog P, Graus F, Maldonado R, Geis C, Dalmau J. 2016. Ephrin-B2 Prevents N-Methyl-D-Aspartate Receptor Antibody Effects on Memory and Neuroplasticity. *Brain a journal of neurology*. 80(3) 388-400.
- Planagumà J, Leypold F, Mannara F, Gutiérrez-Cuesta J, Martin-Garcia E, Aguilar E, Titulaer MJ, Petit-Pedrol M, Jain A, Balice-Gordon R, Lakadamyali M, Graus F, Maldonado R, Dalmau J. 2015. Human N-methyl D-aspartate receptor antibodies alter memory and behavior in mice. *Brain A journal of Neurology*. 2015: 138-94-109.
- Pieper K, Grimbacher B, Eibel H. 2013. B-cell biology and development. *Mechanisms of allergic diseases*. Volume 131 number 4.
- Pierce SK, Liu W. 2013. Encoding immunological memory in the initiation of B-cell receptor signaling. *Cold Spring Harb. Symp. Quant Biol*. 78: 231-237.
- Pillai S, Cariappa A. 2009. The follicular versus marginal zone B lymphocytes cell fate decision. *Nature review of Immunology*. 9, 767-777.
- Pillai S, Cariappa A, Moran ST. 2005. Marginal zone B cells. *Annu. Rev. Immunol*. **23**, 161-196.
- Pilli D, Zou A, Tea F, Dale RC, Brilot F. Expanding role of T cells in human autoimmune diseases of the central nervous system. *Frintieres in Immunology*. 8, 652.
- Quan C, Yu H, Qiao J, Xiao B, Zhao G, Wu Z, Li Z, Lu C. 2013. Impaired regulatory function and enhanced intrathecal activation of B cells in neuromyelitis optica: distinct from multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis*. 19, 289-298.
- Rauner, Claudia, and Georg Köhr. 2011. "Triheteromeric NR1/NR2A/NR2B Receptors Constitute the Major N-Methyl-D-Aspartate Receptor Population in Adult Hippocampal Synapses." *Journal of Biological Chemistry* 286(9): 7558–66.
- Rathmell JC, Townsend SE, Xu JC, Flavell RA, Goodnow CC. 1996. Expansion or elimination of B cells in vivo: Dual roles for CD40- and Fas (CD95)-ligands modulated by the B cell antigen receptor. *Cell* 87: 319–329, 1996.
- Revy P, Muto T, Levy Y, et al. Activation-induced cytidine deaminase (AID) deficiency causes the autosomal recessive form of the Hyper-IgM syndrome (HIGM2). *Cell* 2000 ; 102: 565–575.

- Ribatti D. 2017. The discovery of plasma cells: An historical note. *Immunology letters*. 188: 64-67.
- Rose NR. 2017. Negative selection, epitope mimicry and auto-immunity. *Current opinion in immunology*. 49, 51-55.
- Rose NR. 2014. Molecular mimicry and clonal deletion: A fresh look. *Journal of theoretical biology*. 21;375: 71-76.
- Roth K, Oehme L, Zehentmeier S, Zhang Y, Niesner R, Hauser AE. 2014. Tracking Plasma Cell Differentiation and Survival. *Cytometry part A Journal of the International Society for Advancement of Cytometry*. 85A: 15-24, 2014.
- Rouers A, Jeger-Madiot R, Moris A, Graff-Dubois S. 2017. Lymphocyte T folliculaire helper et VIH – Univ pour le meilleur et le pire. *Médecine et Sciences*. 2017: 33/ 876-86.
- Saab AS, Tzvetavona ID, Baltan S, Dibaj P, Kusch K. 2016. Oligodendroglial NMDA receptors regulate glucose and axonal energy metabolism. *Neuron*. 91:119-32.
- Sagaert et De Wolf-Peeters C. 2003. Classification of B-cell according to their differentiation status, their micro-anatomical localization and their developmental lineage. *Immunology letter*. 90, 179-186.
- Saito, M., Novak, U., Piovan, E., Basso, K., Sumazin, P., Schneider, C., Crespo, M., Shen, Q., Bhagat, G., Califano, A., et al. (2009). BCL6 suppression of BCL2 via Miz1 and its disruption in diffuse large B cell lymphoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 11294–11299.
- Salter, Michael G, and Robert Fern. 2005. “NMDA Receptors Are Expressed in Developing Oligodendrocyte Processes and Mediate Injury.” *Nature* 438(7071): 1167–71. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16372012>.
- Sandoval H, Srikanth K, Wang J. 2018. Regulation of B cell fate, Survival, and function by Mitochondria and Autophagy. *Mitochondrion*. 41: 58-65.
- Sansing LH, Tüzün E, Ko MW, Baccon J, Lynch RD, Dalmau J. 2007. A patient with encephalitis associated with NMDA receptor antibodies. *Nature Clinical Practice Neurology*. 3(5): 291-296.
- Schiemann B, Gommerman JL, Vora K, et al. An essential role for BAFF in the normal development of B cells through a BCMA-independent pathway. *Science (New York, NY)* 2001;293(5537):2111-4.
- Schioppa T, Moore R, Thompson RG, Rosser EC, Kulbe H, Nedospasoy S, Mauri C, Coussens LM, Balkwill FR. 2011. B regulatory cells and the tumor-promoting actions of TNF alpha during squamous carcinogenesis. *Proc Natl. Acad. Sci.* 108(26): 106622-7.
- Schmitt SE, Pargeon K, MD, Frechette ES, Hirsch LJ, Dalmau J, Friedman D. 2012. Extreme delta brush. A unique EEG pattern in adults with anti-NMDA receptor encephalitis. *Neurology*. 79(11): 1094–1100

- Shaffer, A.L. et al. Blimp-1 orchestrates plasma cell differentiation by extinguishing the mature B cell gene expression program. *Immunity* **17**, 51–62 (2002).
- Shaffer AL, Shapiro-Shelef M, Iwakoshi NN, Lee AH, Qian SB, Zhao H, Yu X, Yang I, Tan BK, Rosenwald A et al. 2004. XBP1, downstream of Blimp-1, expands the secretory apparatus and other organelles, and increase protein synthesis in plasma cell différenciation. *Immunity*. 21 : 81-93.
- Sharma R, Al-Saleem FH, Panzer J, Lee J, Puligedda RD, Felicori LF, et al. Monoclonal antibodies from a patient with anti-NMDA receptor encephalitis. *Ann Clin Transl Neurol.* (2018) 5:935–51. doi: 10.1002/acn3.592
- Seifert M, Przekopowitz M, Taudien S, et al. Functional capacities of human IgM memory B cells in early inflammatory responses and secondary germinal center reactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2015; 112: E546–555. DOI: 10.1073/pnas.1416276112.
- Seifert M, Küppers.2016. Human memory B cells. *Leukemia*. 30, 2283-2292.
- Seité JF, Hillion S, Harbonnier T, Pers JO. 2014. Intravenous immunoglobulin and B cell: when the product regulates the producer. Vol 67, Issue 3 – 595-603.
- Serafini B, Rosicarelli B, Magliozzi R, Stigliano E, Aloisi F. Detection of ectopic B-cell follicles with germinal centers in the meninges of patients with secondary progressive multiple sclerosis. *Brain Pathol.* 2004;14:164–174. doi: 10.1111/j.1750-3639.2004.tb00049.x
- Serlin Y, Shelef I, Knyazer B. 2015. Anatomy and physiology of the blood-brain-barrier. *Seminars in cell and developmental biology*. 38:2-6.
- Shaffer, A.L., Lin, K.I., Kuo, T.C., Yu, X., Hurt, E.M., Rosenwald, A., Giltnane, J.M., Yang, L., Zhao, H., Calame, K., et al. (2002). Blimp-1 orchestrates plasma cell differentiation by extinguishing the mature B cell gene expression program. *Immunity* 17, 51–62.
- Shaffer, A.L., Shapiro-Shelef, M., Iwakoshi, N.N., Lee, A.-H., Qian, S.-B., Zhao, H., Yu, X., Yang, L., Tan, B.K., Rosenwald, A., et al. (2004). XBP1, downstream of Blimp-1, expands the secretory apparatus and other organelles, and increases protein synthesis in plasma cell differentiation. *Immunity* 21, 81–93.
- Shahaf G, Zisman-Rozen S, Benhamou D, Melamed D, Mehr R. 2016. B Cell Development in the Bone Marrow Is Regulated by Homeostatic Feedback Exerted by Mature B cell. *Frontiers in immunology*. 7:77.
- Shapiro-Shelef, M., Lin, K.I., McHeyzer-Williams, L.J., Liao, J., McHeyzer-Williams, M.G., and Calame, K. (2003). Blimp-1 is required for the formation of immunoglobulin secreting plasma cells and pre-plasma memory B cells. *Immunity* 19, 607–620.
- Shapiro-Shelef, M. and K. Calame, Regulation of plasma-cell development. *Nature Review Immunology*. 2005. 5(3): p. 230-42.
- Siewe B, Stapleton JT, Martisson J et al., 2013. Regulatory B cell frequency correlates with markers of HIV disease progression and attenuates anti-HIV CD8+ T cell function in vitro. *J. Leukoc. Biol.* 93(5): 811-818.

- Sigvardsson. 2018. Molecular regulation of differentiation in early B-lymphocyte development. *Internal journal of molecular sciences*. 19(7): 1928.
- Sinmaz N, Amatoury M, Merheb V, Ramanathan S, Dale RC, Brilot F. 2015. Auto-antibodies in movement and psychiatric disorders: updated concepts in detection methods, pathogenicity, and CNS entry. *Annals of the New York academy of sciences*. 1351 (2015) 22-38.
- Slifka, M.K., M. Matloubian; R. Ahmed. 1995. Bone marrow is a major site of long term antibody production after acute viral infection. *Journal of Virology*. 69(3): p. 1895-902.
- Slifka, M.K., et al., Humoral immunity due to long-lived plasma cells. *Immunity*, 1998. 8(3): p. 363-72.
- Smith, K.G., Hewitson, T.D., Nossal, G.J., and Tarlinton, D.M. (1996). T
- Sospedra M, Martin R. 2006. Molecular mimicry in multiple sclerosis. *Autoimmunity*. 39(1):3-8.
- Spooner, C.J., Cheng, J.X.; Pujadas, E.; Laslo, P.; Singh, H. 2009. A recurrent network involving the transcription factors PU.1 and Gfi1 orchestrates innate and adaptive immune cell fates. *Immunity*. 31, 576–586.
- Stangel M. 2008. New advances in the treatment of neurological diseases using high dose intravenous immunoglobulins. *Therapeutic advances in neurological disorders*. 2008 1 (2) 115-124.
- Stetson DB, Voehringer D, Grogan JL, Xu M, Reinhardt L, Scheu S, Kelly B, Locksley RM. 2004. Th2 Cells: Orchestrating Barrier Immunity. 83. 163-189.
- Straser A, Bouillet P. 2003. The control of apoptosis in lymphocyte selection. *Immunological review*. 193, 82-92.
- Strazielle N, Gherzi-Egea JF. 2000. Choroid plexus in the central nervous system: Biology and physiopathology. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2000; 59: 561-74.
- Stuart G. Tangye, David M. Tarlinton. 2009. Memory B cells: Effectors of long-lived immune responses. *European Journal of Immunology*. Volume 39, Issue 8. 2065-2075. <https://doi.org/10.1002/eji.200939531>.
- Stuve, O. et al. 2006. Altered CD4+/CD8+ T-cell ratios in cerebrospinal fluid of natalizumab-treated patients with multiple sclerosis. *Arch. Neurol*. 63, 1383–1387 (2006).
- Su, T.T., Guo, B., Wei, B., Braun, J., and Rawlings, D.J. 2004. Signaling in transitional type 2 B cells is critical for peripheral B-cell development. *Immunol. Rev*. 197, 161–178.
- Sugiyama T, Kohara H, Noda M, Nagasawa T. 2006. Maintenance of the hematopoietic stem cell pool by CXCL12-CXCR4 chemokine signaling in bone marrow stromal cell niches. *Immunity*. 25: 977-988.



- Szaflarska A, Rutkowska-Zapala M, Kowalczyk D. 2015. Immune Tolerance Mechanisms – Biref Review. 2015; 72 (12) : 765-9.
- Tangye, S.G. (2011). Staying alive: regulation of plasma cell survival. *Trends Immunol.* 32, 595–602.
- Tangye SG, Tarlinton DM. 2009. Memory B cells: Effectors of long-lived immune responses. *Eur. J. Immunol.* 39: 2065-2075.
- Taraschenko O, Howard SF, Pittock SJ, Zekeridou A, Gafurova M, Eldridge E, Liu J, Dravid SM, Dingledine R., 2019. A mouse model of seizures in anti-N-methyl-D-aspartate receptor encephalitis. *Epilepsia.* 2019;00:1-12.
- Tellier J, Nutt SL. 2019. Plasma cells: The programming of an antibody-secreting machine. *Eur J Immunol.* 49(1):30-37. doi: 10.1002/eji.201847517. Epub 2018 Oct 15.
  
- Titulaer MJ, McCracken L, Gabilondo I, Armangué T, Glaser C, Lizuka T, Honig LS, Benseler SM, Kawachi I, Martinez-Hernandez E, Aguilar E, Gresa-Arribas, Ryan-Florance N, Torrents A, Saiz, Rosenfeld MR, Balice-Gordon R, Graus F, Dalmau J. 2013. Treatment and prognostic factors for long-term outcome in patients with anti N-Methyl-D-Aspartate (NMDA) receptor encephalitis: a cohort study. *Lancet Neurology.* 12 (2): 157-165.
- Titulaer MJ, Lang B, Verschuuren JJ. 2011. Lambert-Eaton syndrome: from clinical characteristics to therapeutic strategies. *Lancet Neurology.* 10: 1098-1107.
- Thomas MD, Srivastava B, Allman D. 2006. Regulation of peripheral B cell maturation. *Cell Immunol.* 239(2): 92-102.
- Toda, T., Parylak, S. L., Linker, S. B., and Gage, F. H. (2018). The role of adult hippocampal neurogenesis in brain health and disease. *Mol. Psychiatry.* 24 (1), 67–87. Doi : 10.1038/s41380-018-0036
- Tokoyoda K, Hauser AE, Nakayama T, Radbruch A. 2010. Organization of immunological memory by bone marrow stroma. *Nat Rev Immunol.* 2010;10(3):193–200.
- Tomayko MM, Allman D. 2020. What B cell memories are made of. *Current opinion in immunology.* 2019. 57-64.
- Tomayko MM, Steinel NC, Anderson SM, Shlomchik MJ. 2010. Cutting edge: hierarchy of maturity of murine memory B cell subsets. *Journal of Immunology.* 185 (12) : 7146-7150.
- Traynelis SF, Wollmuth LP, McBrain CJ, Menniti FS, Vance KM, Ogden KK, Hansen KB, Yuan H, Myers S, Dingledine R. 2010. Glutamate Receptor Ion Channel: Structure, regulation, Function. *Pharmacological review.* 62:405-496.
- Treanor B. 2012. B-cell receptor: from resting state to activate. *Immunology.* 136(1): 217.

- Tunyaplin, C., Shaffer, A.L., Angelin-Duclos, C.D., Yu, X., Staudt, L.M., and Calame, K.L. 2004. Direct repression of *prdm1* by Bcl-6 inhibits plasmacytic differentiation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 173, 1158–1165.
- Tüzün E, Zhou L, Baehring JM, Bannykh S, Rosenfeld MR, Dalmau J. 2009. Evidence for antibody-mediated pathogenesis in anti-NMDAR encephalitis associated with ovarian teratoma. *Acta Neuropathologica*. 118(6): 737-743.
- Tyler KL. 2004. Update on herpes simplex encephalitis. *Review in neurologic disease*. 2004;1:169-178.
- Ulbrich, M. H., and E. Y. Isacoff. 2008. “Rules of Engagement for NMDA Receptor Subunits.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105(37): 14163–68. <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0802075105>.
- Ulusoy C, Tuzun E, Kurtuncu M, Turkoglu R, Akman-Demir G, Eraksoy M. 2012. Comparison of the cytokine profiles of patients with neuronal-antibody-associated central nervous system disorders. *Int. J. Neurosci*. 122, 284-289.
- Vale AM, Kearney JF, Nobrega A et al. 2015. Development and function of B cell Subsets, *Molecular Biology of B cells*. Elsevier. 99-119.
- Veciana M, Becerra JL, Fossas P, Muriana D, Sansa D, Santamarina E, Gaig C, Carreno M, Molins A, Escofet C, Ley M, Vivanco R, Pedro J, Miro J, Falip M. 2015. EEG extreme delta brush: An ictal pattern in patients with anti-NMDA receptor encephalitis. *Epilepsy and Behavior*. 49:2015 280-285.
- Venkatesan A, Adatia K. 2017. Anti-NMDA-Receptor Encephalitis: from Bench to clinic. *ACS Chemical Neuroscience*. 8, 2586-2595.
- Venkatesan A, Tunkel AR, Bloch KC, Loring AS, Sejvar J, Bitnum A, Stahl JP, Mailles A, Drebot -M, Rupprecht CE, Yoder J, Cope JR, Wilson MR, Whitley RJ, Sullivan J, Granerod J, Jones C, Eastwood K, Ward KN, Durrheim DN, Solbrig MV, Guo-Dong L, Glaser CA. 2013. Case Definitions, Diagnostic Algorithms, and Priorities in Encephalitis: Consensus Statement of The International Encephalitis Consortium. *Clinical Infectious diseases*. 57(8):1114-28.
- Vettermann, C., and Schlissel, M.S. (2010). Allelic exclusion of immunoglobulin genes: models and mechanisms. *Immunol. Rev*. 237, 22–42.
- Viaccoz, Aurélien et al. 2014. “Clinical Specificities of Adult Male Patients with NMDA Receptor Antibodies Encephalitis.” *Neurology* 82(7): 556–63. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24443452> (March 29, 2015).
- Vitaliani, Roberta et al. 2005. “Paraneoplastic Encephalitis, Psychiatric Symptoms, and Hypoventilation in Ovarian Teratoma.” *Annals of Neurology* 58(4): 594–604.
- Wagnon I, Helie P, Bardou I, Regnauld C, Leseq L, Leprince J, Naveau M, Delaunay B, Toutirais O, Lemauff B, Etard O, Vivien D, Agin V, Macrez M, Maubert E, Docagne F. 2020. Autoimmune encephalitis mediated by B-cell response against N-methyl-d-aspartate-receptor. 2020 Oct 1 ;143(10) : 2957-2972. doi: 10.1093/brain/awaa250.

- Walter BA, Valera VA, Takahashi S, Matsuno K, Ushiki T. 2006. Evidence of antibody production in the rat cervical lymph nodes after antigen administration into the cerebrospinal fluid. *Arch. Histol. Cytol.* 69, 37–47 (2006).
- Watkins, J C. 1981. "Pharmacology of Excitatory Amino Acid Transmitters." *Advances in 139 biochemical psychopharmacology* 29: 205–12.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6114621> (July 11, 2017).
- Wandinger KP, Saschenbrecker S, Stoecker W, Dalmau J. 2011. Anti-NMDA-receptor encephalitis: a severe multistage treatable disorder presenting with psychosis. *Journal of Neuroimmunology.* 231, 86-91.
- Wardemann H, Yurasov S, Schaefer JW, Meffre E, Nussenzweig MC. 2003. Predominant autoantibody production by early human B cell precursors. *Sciences.* 301, 1374-1377.
- Welinder E, Mansson R, Mercer EM, Bryder D, Sygvardsson M, Murre C. 2011. The transcription factors E2A and HEB act in concert to induce the expression of FOXO1 in the common lymphoid progenitor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 108(42): 17402-7.
- Wei, C., Anolik, J., Cappione, A., Zheng, B., Pugh-Bernard, A., Brooks, J., Lee, E. H. *et al.*, 2007. A new population of cells lacking expression of CD27 represents a notable component of the B cell memory compartment in systemic lupus erythematosus. *J. Immunol.* **178**: 6624–6633.
- Winkler TH, Martensson IL. 2018; The Role of the Pre-B Cell Receptor in B Cell Development, Repertoire Selection, and Tolerance. *Front. Immunol.* 9 : 2423.
- Winter, O., Moser, K., Mohr, E., Zotos, D., Kaminski, H., Szyska, M., Roth, K., Wong, D.M., Dame, C., Tarlinton, D.M., et al. (2010). Megakaryocytes constitute a functional component of a plasma cell niche in the bone marrow. *Blood* 116, 1867–1875.
- Wolburg H, Lippoldt A. 2002. Tight junctions of the blood-brain barrier: development, composition and regulation, *Vascular Pharmacology.* 38 (2002) 323-337.
- Wols HAM. 2005. Plasma Cells. *Encyclopedia of life science.* 10.1038/npg.els.0004030.
- Wolf SD, Dittel BN, Hardardottir F, Janeway CA Jr. 1996. Experimental autoimmune encephalomyelitis induction in genetically B cell-deficient mice. *J. Exp. Med.* 184(6): 2271-8.
- Wright S, Hashemi K, Stasiak L, Bartram J, Lang B, Vincent A, Upton AL. 2015. Epileptogenic effects of NMDAR antibodies in a passive transfer mouse model. *Brain a journal of neurology.* 138 (11): 3159-67.
- Xu X, Lu Q, Huang Y, Fan S, Zhou L, Yuan J, et al. Anti-NMDAR encephalitis: a single-center, longitudinal study in China. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm.* (2020) 7:e633. doi: 10.1212/NXI.0000000000000633.
- Yam-Puc JC, Zhang L, Zhang Y, Toellner KM. 2018. Role of B-cell receptors for B-cell development and antigen-induced differentiation. *F1000Research.*

- Yanaka K, Bouaziz JD, Haas KM, Poe JC, Fujimoto M, Tedder TF. 2008. A regulatory B cell subset with a unique CD1d hi CD5+ phenotype controls T cell-dependent inflammatory responses. *Immunity*. 28(5): 639-50.
- Zekeridou, Anastasia et al. 2015. "Treatment and Outcome of Children and Adolescents with N-Methyl-D-Aspartate Receptor Encephalitis." *Journal of Neurology* 262(8): 1859–66.
- Zhou Q, Sheng M. 2013. NMDA receptor in central nervous system diseases. *Neuropharmacology* 74, 69-75.
- Zouali M. 2009. Natural antibodies. *Encyclopedia of life sciences*.
- Zouali M; Richard Y. 2011. Marginal zone B-cells, a gatekeeper of innate immunity. *Frontiers of immunology*. 2, 63.