



HAL
open science

Stress et inflammation intestinale dans des modèles murins de sclérose en plaques

Erwan Baudron

► **To cite this version:**

Erwan Baudron. Stress et inflammation intestinale dans des modèles murins de sclérose en plaques. Médecine humaine et pathologie. Normandie Université, 2023. Français. NNT : 2023NORMC401 . tel-04050388

HAL Id: tel-04050388

<https://theses.hal.science/tel-04050388>

Submitted on 29 Mar 2023

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

Stress et inflammation intestinale dans des modèles murins de sclérose en plaques

Présentée et soutenue par
ERWAN BAUDRON

Thèse soutenue le 07/03/2023
devant le jury composé de

MME CORINNE BENAKIS	Professeur, Université de MUNICH	Rapporteur du jury
MME CAROLINE POT	Professeur, Université de Lausanne UNIL	Rapporteur du jury
MME ISABELLE BARDOU	Maître de conférences, Université de Caen Normandie	Membre du jury
M. MICHEL NEUNLIST	Directeur de recherche, UNIVERSITE NANTES	Membre du jury
M. GILLES DEFER	Professeur des universités PraticienHosp, Université de Caen Normandie	Président du jury
M. DENIS VIVIEN	Professeur des universités PraticienHosp, Université de Caen Normandie	Directeur de thèse

Thèse dirigée par DENIS VIVIEN (Physiopathologie et imagerie des troubles neurologiques)



UNIVERSITÉ
CAEN
NORMANDIE



Normande de Biologie Intégrative,
Santé, Environnement

PhIND



PHYSIOPATHOLOGY
& IMAGING OF
NEUROLOGICAL DISORDERS

REMERCIEMENTS

Je remercie en tout premier lieu mes deux rapporteurs de thèse, Dr Corinne Benakis et Pr Caroline Pot, de me faire l'honneur d'évaluer ce travail. Je remercie également Pr Gilles Defer et Dr Michel Neunlist d'avoir accepté de faire partie de mon jury.

Je tiens également à remercier Dr Fabian Docagne de m'avoir intégré à son équipe, et de m'avoir proposé ces thématiques de recherches en parfaite adéquation avec mes souhaits premiers. Je te remercie grandement pour la cohésion d'équipe que tu avais su mettre en place, et de la confiance que tu m'as accordée. J'ai beaucoup apprécié ces premières années sous ta direction.

Je remercie également Pr Denis Vivien de son accueil dans son unité de recherche, d'avoir pris la suite de ma direction de thèse et de m'avoir poussé, malgré lui, à donner le meilleur de moi-même.

Je tiens tout particulièrement à remercier Dr Isabelle Bardou qui a encadré ce travail. Tu as été, et te ne le sais certainement pas, ma bouée de sauvetage ! Tu as su t'impliquer dans un sujet à mille lieux de ta thématique. Je te remercie aussi pour tes assistances d'immunisation et pour les week-ends de répit dans le scoring de mes pépettes, et bien évidemment pour ton aide précieuse à la rédaction de ce manuscrit. Je te remercie également d'avoir fait de moi l'expert que je suis aujourd'hui en compétences numériques ! Je te remercie surtout pour toutes ces poilades !!

Je remercie également Dr Maxime Gauberti et Dr Sara Martinez de Lizarrondo pour leur expertise et leurs conseils quant à la réalisation des examens IRM.

Je voudrais aussi remercier celles et ceux qui ont pris soin de mes pépettes quand je n'en étais pas à mesure, et tout particulièrement Claudine Fauchon et Laurine Nicolas.

L'un de mes plus grands remerciements va à ces fameuses pépettes sans qui ces travaux ne seraient pas, mais aussi à tout(e)s les autres dont le sacrifice nous donne à nous, humains, l'espoir de voir nos maux s'estomper.

Je tiens aussi tout particulièrement à remercier Mme Gervais qui a permis, par sa bienveillance et son implication, la réussite de ma reconversion professionnelle. Je n'y serais pas arrivé sans vous !

Mes adipocytes s'associent à moi pour remercier les brasseries d'Achouffe et Tripel Karmeliet, la marque Kinder® et les restaurants Burger King®.

Je tiens également à remercier tous les dépanneurs de clopes, et en particulier Dr Eric Maubert, Louis Fosset et Mathys Bellemain-Sagnard.

A la fauveauté : Jacky, Simba, Bosnie, Mickus, Gris-poil, Magnum, ma belle Terra-foufy, l'insupportable Phineas-fouine, et même vous Yvette et Pet-Qui-Fouette, et à vous Polo, Stouff et Jarv'.

A mes amis, qui ont toujours montré un soutien sans faille, tout particulièrement pour lever le coude. Blague à part, merci d'avoir été là pendant les épreuves !

A Christophe, à qui je voue un profond respect. Je ne sais pas comment tu fais pour nous tolérer !!

A mon frère, à mes sœurs, qui ont toujours été présents pour moi, qui plus est dans les moments difficiles. Merci surtout à « Fortnite Frères » ... Vous êtes de grands malades mentaux !!

A ma femme, l'éminent Dr Charlotte Arnaud, qui me supporte depuis quatre longues années maintenant, et qui, je l'espère, continuera encore longtemps. Merci aussi pour ton expertise de la SEP (pas de la SLA...). *¡Te quiero mi gata! ¡Esta te quieta o te voy a dar una paliza que el nino jesus se acordara! ¡Claro que si! ps : Tu te calmes !!!!*

A ma mère, qui, non contente de me mettre au monde, m'a transmis son insatisfaction perpétuelle qui me pousse chaque jour à repousser mes limites. Merci aussi de ton soutien sans faille dans ma reprise d'études, je n'y serai pas arrivé tout seul. Je te revaudrai ça !!

A mon père, tu aurais été fier de moi...

RESUME

La sclérose en plaques (SEP) est une maladie auto-immune démyélinisante du système nerveux central. Bien que l'étiologie de cette pathologie reste inconnue, de nombreux facteurs de risques ont été identifiés tels que le stress psychologique et une dysbiose intestinale. En effet, des données cliniques montrent que le stress serait associé à un plus grand risque d'apparition et d'aggravation de la pathologie. Cependant, le risque diffère en fonction du type de stress utilisé dans les modèles murins de SEP, et peu d'études se sont intéressées à évaluer des stratégies de réduction du stress dans ceux-ci. De plus, des travaux récents montrent que l'inflammation intestinale serait impliquée dans la mise en place de la réaction auto-immune. Il apparaît donc pertinent de savoir si cette inflammation intestinale (caractérisée par une augmentation de l'expression de la protéine MAdCAM-1 « Mucosal Addressin Cell Adhesion Molecule-1 ») peut prédire l'apparition et l'évolution de la SEP.

Ainsi, les objectifs mon doctorat ont été : 1) de caractériser les effets d'un stress aigu et d'une stratégie de réduction du stress (l'enrichissement environnemental) dans l'évolution d'un modèle murin de SEP ; 2) d'évaluer l'inflammation intestinale en lien avec les symptômes moteurs de la pathologie, dans les deux principaux modèles murins de SEP.

Ces travaux nous ont permis de mettre en évidence un effet délétère d'un stress aigu répété sur l'incidence des rechutes dans un modèle murin de SEP, que l'enrichissement environnemental était en mesure de contrecarrer. Dans la seconde étude, nous avons montré, grâce à de l'imagerie par résonance magnétique moléculaire dirigée contre la protéine MAdCAM-1, une augmentation de l'inflammation intestinale avec les symptômes moteurs dans les modèles animaux de SEP. De plus, une diminution des populations lymphocytaires B et Th dans l'iléon parallèlement à leur augmentation dans la moelle épinière a été observée au cours de l'évolution de la maladie. Enfin, nous avons montré que la persistance d'une inflammation intestinale entraînait des formes récurrentes-rémittentes de la pathologie tandis qu'une diminution de celle-ci était associée à une augmentation du risque de conversion vers une forme secondairement progressive.

Ainsi, ces résultats ouvrent la voie à davantage d'investigations quant aux effets du stress et de l'inflammation intestinale dans la SEP. Des stratégies visant à contrôler ces deux facteurs pourraient à terme permettre d'optimiser la prise en charge de la pathologie.

ABSTRACT

Multiple sclerosis (MS) is an autoimmune disease of the central nervous system. Although the exact etiology of the disease remains unknown, several risk factors have already been identified such as psychological stress and intestinal dysbiosis. Indeed, clinical data support a link between stressful events and the risk of development and/or aggravation of the disease. The stress-induced effects on the disease depends of the stressful event used in animal models of MS and none studies have investigated the consequences of stress reduction strategies on those animal models. Furthermore, recent evidence suggest that an intestinal inflammation could be implicated in the development of the autoimmune reaction. Therefore, studying the impact of intestinal inflammation (characterized by an increased expression of MAdCAM-1 "Mucosal Addressin Cell Adhesion Molecule-1") in the disease course would be pertinent.

Thus, the objectives of my doctorate were to: 1) characterize the impact of acute stress and a stress reduction strategy (environmental enrichment) on the disease course of an animal model of MS; 2) assess the intestinal inflammation according to motor symptoms of the disease, in the two main animal models of MS.

These studies have shown that repeated acute stress increases the relapse incidence in an animal model of MS. Furthermore, environmental enrichment could reverse stress effects. In a second part, we have shown, using molecular magnetic resonance imaging targeting MAdCAM-1, an increase of intestinal inflammation with the motor symptoms in animal models of MS. Furthermore, we observed a decrease in B and Th lymphocytes in the ileum concomitantly with their increase in the spinal cord during the disease. Finally, we showed that a maintenance of intestinal inflammation was associated with relapsing-remitting course of the disease while its decrease was associated with a higher risk of conversion to a secondary-progressive course.

Altogether, these results lead the way for further investigations regarding the effect of stress and intestinal inflammation in MS. Especially, establishing new strategies to modulate the consequences of those two factors could provide better cares of the disease.

SOMMAIRE

INTRODUCTION	- 1 -
I. LA SCLEROSE EN PLAQUES : UNE MALADIE AUTO-IMMUNE DEMYELINISANTE DU SYSTEME NERVEUX CENTRAL	- 1 -
I.1. DEFINITIONS ET CHIFFRES	- 1 -
I.2. LES MODELES ANIMAUX DE SEP	- 5 -
I.2.1. Les modèles d'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE)	- 5 -
I.2.1.1. L'EAE récurrente-rémittente (RR-EAE) chez la souris SJL/J.....	- 7 -
I.2.1.2. L'EAE primaire-progressive (PP-EAE) chez la souris C57BL/6J	- 8 -
I.2.1.3. Les modèles transgéniques	- 9 -
I.2.2. Les modèles viraux de démyélinisation et de dommages axonaux : exemple du virus de l'encéphalomyélite murine de Theiler	- 10 -
I.2.3. Les modèles de démyélinisation par utilisation d'agents chimiques	- 10 -
I.2.3.1. Démyélinisation par la cuprizone	- 11 -
I.2.3.2. Démyélinisation par la lysolécithine.....	- 11 -
I.3. PHYSIOPATHOLOGIE DE LA SEP	- 13 -
I.3.1. Les cellules de l'immunité adaptative impliquées dans la SEP	- 13 -
I.3.1.1. Les lymphocytes T	- 16 -
I.3.1.1.1. Les lymphocytes T effecteurs	- 17 -
I.3.1.1.2. Les lymphocytes T régulateurs	- 19 -
I.3.1.2. Les lymphocytes B	- 21 -
I.3.2. Les cellules de l'immunité innée impliquées dans la SEP	- 23 -
I.3.2.1. Les cellules dendritiques	- 23 -
I.3.2.2. Les mastocytes	- 24 -
I.3.2.3. Les phagocytes mononucléés : Macrophages et cellules microgliales	- 25 -
I.3.2.4. Les neutrophiles	- 26 -
I.4. ETIOLOGIE ET FACTEURS DE RISQUES DE LA SEP	- 27 -
I.4.1. Quelle origine pour la SEP ?	- 27 -
I.4.2. Facteurs de risques de développement d'une SEP	- 30 -
I.4.2.1. Prédispositions génétiques.....	- 30 -

SOMMAIRE

I.4.2.2.	Les facteurs environnementaux.	- 31 -
I.4.2.2.1.	Infection par le virus Epstein-Barr (EBV).....	- 31 -
I.4.2.2.2.	Exposition au soleil / carences en vitamine D.....	- 32 -
I.4.2.2.3.	Tabagisme.....	- 34 -
I.4.2.2.4.	Obésité infantile.	- 35 -
II.	LE STRESS PSYCHOLOGIQUE : UN FACTEUR DE RISQUE DANS LA SEP.	- 35 -
II.1.	STRESS ET SEP.	- 36 -
II.1.1.	<i>Stress et risque de développement d'une SEP.</i>	- 36 -
II.1.2.	<i>Effets du stress sur l'évolution de la SEP.</i>	- 38 -
II.2.	STRESS ET MODELES ANIMAUX DE SEP.	- 40 -
II.2.1.	<i>Stress chronique.</i>	- 40 -
II.2.2.	<i>Stress aigu.</i>	- 43 -
II.3.	MECANISMES PHYSIOPATHOLOGIQUES DE LA REPONSE AU STRESS.	- 46 -
II.3.1.	<i>L'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien</i>	- 46 -
II.3.2.	<i>L'hypothèse de la résolution du stress.</i>	- 48 -
II.3.3.	<i>L'hypothèse de la résistance aux glucocorticoïdes</i>	- 49 -
II.3.4.	<i>L'hypothèse d'une aggravation médiée par les mastocytes et la microglie.</i>	- 50 -
II.4.	STRATEGIES DE REDUCTION DU STRESS.	- 52 -
II.4.1.	<i>L'enrichissement environnemental : une stratégie de réduction du stress chez l'animal ?</i>	- 53 -
II.4.1.1.	Enrichissement environnemental et plasticité cérébrale.	- 55 -
II.4.1.2.	Enrichissement environnemental et stress.	- 56 -
II.4.2.	<i>Enrichissement environnemental dans des modèles animaux de SEP.</i>	- 59 -
III.	INFLAMMATION INTESTINALE ET SEP.	- 64 -
III.1.	ANATOMIE ET PHYSIOLOGIE DU TRACTUS INTESTINAL.	- 64 -
III.1.1.	<i>Anatomie et histologie intestinale.</i>	- 65 -
III.1.1.1.	L'intestin grêle.	- 65 -
III.1.1.2.	Le côlon.	- 66 -
III.1.2.	<i>Physiologie intestinale.</i>	- 68 -
III.2.	SYSTEME IMMUNITAIRE INTESTINAL.....	- 68 -

SOMMAIRE

III.2.1.	<i>La composante innée de l'immunité intestinale.</i>	- 69 -
III.2.1.1.	La barrière muqueuse intestinale	- 69 -
III.2.1.2.	Les cellules de l'immunité innée	- 71 -
III.2.2.	<i>La composante adaptative de l'immunité intestinale.</i>	- 72 -
III.2.2.1.	MAdCAM-1, une molécule d'adhésion vasculaire nécessaire à l'extravasation des cellules immunitaires vers la muqueuse intestinale.	- 73 -
III.2.2.2.	Les lymphocytes T intra-épithéliaux.	- 74 -
III.2.2.3.	Les lymphocytes T de la lamina propria.	- 75 -
III.2.2.4.	Les lymphocytes B intestinaux.	- 76 -
III.2.2.5.	La réaction immunitaire intestinale classique à un agent pathogène.	- 77 -
III.3.	LE MICROBIOTE INTESTINAL	- 79 -
III.3.1.	<i>Présentation du microbiote intestinal.</i>	- 79 -
III.3.2.	<i>Les fonctions du microbiote intestinal.</i>	- 80 -
III.4.	AXE MICROBIOTE-INTESTIN-CERVEAU ET SEP.	- 83 -
III.4.1.	<i>L'axe microbiote-intestin-cerveau.</i>	- 83 -
III.4.2.	<i>Perturbations de l'axe microbiote-intestin-cerveau dans la SEP.</i>	- 85 -
III.5.	L'IRM MOLECULAIRE DE L'INFLAMMATION INTESTINALE	- 93 -
OBJECTIFS		- 97 -
RESULTATS		- 101 -
ETUDE N°1 : EFFETS DU STRESS ET DE L'ENRICHISSEMENT ENVIRONNEMENTAL DANS UN MODELE MURIN DE SEP RECURRENTE-REMITTENTE		- 101 -
ETUDE N°2 : ETUDE DE L'INFLAMMATION INTESTINALE PAR IRM MOLECULAIRE DE MADCAM-1 DANS DES MODELES MURINS DE SEP		- 115 -
DISCUSSION		- 163 -
I.	ETUDE DU STRESS ET DE L'ENRICHISSEMENT ENVIRONNEMENTAL DANS L'EAE-PLP	- 163 -
I.1.	UN STRESS AIGU REPETE PENDANT LA PHASE DE REMISSION DES SYMPTOMES DE L'EAE-PLP PRECIPITE LA SURVENUE DE POUSSEES ET EN AUGMENTE L'INCIDENCE.	- 163 -
I.2.	L'ENRICHISSEMENT ENVIRONNEMENTAL DIMINUE L'INCIDENCE ET LA SEVERITE DE L'EAE-PLP.	- 165 -

SOMMAIRE

I.3.	L'ENRICHISSEMENT ENVIRONNEMENTAL INHIBE LES EFFETS DELETERES D'UN STRESS AIGU REPETE SUR L'INCIDENCE DES RECHUTES.....	- 167 -
II.	ETUDE DE L'INFLAMMATION INTESTINALE DANS L'EAE-MOG ET L'EAE-PLP.....	- 170 -
II.1.	L'EXPRESSION DE MADCAM-1 AUGMENTE AVEC LES SYMPTOMES MOTEURS DANS L'EAE-MOG ET L'EAE-PLP....	- 170 -
II.2.	LE NIVEAU D'EXPRESSION DE MADCAM-1 PENDANT LA PHASE PRESYMPTOMATIQUE INFLUE SUR L'APPARITION DES SYMPTOMES MOTEURS DANS L'EAE-MOG.	- 174 -
II.3.	LE NIVEAU D'EXPRESSION DE MADCAM-1 PENDANT LA PHASE DE REMISSION D'UNE EAE-PLP CONDITIONNE L'EVOLUTION SUBSEQUENTE DES SYMPTOMES MOTEURS.....	- 178 -
III.	STRESS, INFLAMMATION INTESTINALE ET EAE.....	- 182 -
	CONCLUSION.....	- 185 -
	BIBLIOGRAPHIE.....	- 187 -

INDEX DES FIGURES

FIGURE 1 : ECHELLE SIMPLIFIEE D'EVALUATION DES SYMPTOMES NEUROLOGIQUES CHEZ LES PATIENTS ATTEINTS DE SEP (ECHELLE EDSS).	- 2 -
FIGURE 2 : IMAGES IRM D'UN CERVEAU DE PATIENT ATTEINT DE SEP.	- 3 -
FIGURE 3 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES QUATRE PRINCIPALES FORMES DE SEP SELON L'EVOLUTION DES SYMPTOMES NEUROLOGIQUES.	- 3 -
FIGURE 4 : EXEMPLE D'EVOLUTION RECURRENTE-REMITTENTE DES SYMPTOMES MOTEURS (SCORES CLINIQUES) DANS UNE EAE INDUITE PAR IMMUNISATION DE SOURIS DE LA SOUCHE SJL/J CONTRE LE PEPTIDE PLP ₁₃₉₋₁₅₁	- 8 -
FIGURE 5 : EXEMPLE D'EVOLUTION PROGRESSIVE DES SYMPTOMES MOTEURS (SCORES CLINIQUES) DANS UNE EAE INDUITE PAR IMMUNISATION DE SOURIS DE LA SOUCHE C57BL/6J CONTRE LE PEPTIDE MOG ₃₅₋₅₅	- 8 -
FIGURE 6 : OBSERVATION D'AXONES PROVENANT DU CORDON POSTERIEUR DE LA MOELLE EPINIÈRE EN CONDITION BASALE OU APRES TRAITEMENT A LA LYSOLECITHINE PAR MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A TRANSMISSION.	- 11 -
FIGURE 7 : LES PRINCIPAUX TYPES CELLULAIRES DE L'IMMUNITE IMPLIQUES DANS LES DOMMAGES DU SYSTEME NERVEUX CENTRAL.	- 13 -
FIGURE 8 : PRESENTATION SIMPLIFIEE DE L'ACTIVATION D'UN LYMPHOCYTE T NAÏF PAR UNE CELLULE PRESENTATRICE DE L'ANTIGENE.	- 14 -
FIGURE 9 : PRESENTATION SIMPLIFIEE DE L'ACTIVATION D'UN LYMPHOCYTE B PAR UN LYMPHOCYTE T HELPER.....	- 15 -
FIGURE 10 : PRESENTATION SIMPLIFIEE DES MECANISMES D'ACTION D'UN LYMPHOCYTE T CYTOTOXIQUE SUR UNE CELLULE CIBLE.	- 16 -
FIGURE 11 : LES PRINCIPALES POPULATIONS LYMPHOCYTAIRES T AUXILIAIRES ET LEURS FONCTIONS RESPECTIVES.	- 17 -
FIGURE 12 : LES VOIES DE DIFFERENCIATION DES DIFFERENTES SOUS-POPULATIONS DE LYMPHOCYTES B.	- 21 -
FIGURE 13 : STIMULATION DE LYMPHOCYTES T NAÏFS PAR LES CELLULES DENDRITIQUES.....	- 23 -
FIGURE 14 : LE MODELE INTRINSEQUE DE LA PHYSIOPATHOLOGIE DE LA SEP (« INSIDE-OUT »).	- 28 -
FIGURE 15 : LE MODELE EXTRINSEQUE DE LA PHYSIOPATHOLOGIE DE LA SEP (« OUTSIDE-IN »).....	- 29 -
FIGURE 16 : CARTE DES PREVALENCES MONDIALES DE LA SEP.	- 33 -
FIGURE 17 : EFFETS D'UN STRESS CHRONIQUE PAR CONTENTION SUR L'EVOLUTION D'UNE EAE RECURRENTE-REMITTENTE INDUITE PAR IMMUNISATION DE SOURIS B10.PL CONTRE LA PROTEINE MBP ₆₈₋₈₈	- 42 -
FIGURE 18 : COLORATION DE LA MYELINE AU LFB (LUXOL FAST BLUE) DANS LE CORPS CALLEUX D'ANIMAUX CONTROLES (A) ET D'ANIMAUX TRAITES A LA CUPRIZONE NON STRESSES (B), SOUMIS A UN STRESS PHYSIQUE (C) OU PSYCHOLOGIQUE (D) ET LEURS QUANTIFICATIONS RESPECTIVES (E).	- 44 -

INDEX DES FIGURES

FIGURE 19 : AXE HYPOTHALAMO-HYPOPHYSO-SURRENALIEN.....	- 47 -
FIGURE 20 : MECANISMES DE REGULATION DE L'AXE HYPOTHALAMO-HYPOPHYSO-SURRENALIEN SOUS-JACENTS A LA RESOLUTION DU STRESS COMME FACTEUR DE RISQUE D'EXACERBATION DE LA SEP.....	- 49 -
FIGURE 21 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES EFFETS DU STRESS SUR L'INFLAMMATION CEREBRALE ET LA DEMYELINISATION MEDIES PAR LES MASTOCYTES ET LES CELLULES MICROGLIALES.	- 51 -
FIGURE 22 : EFFETS DE L'ENRICHISSEMENT ENVIRONNEMENTAL SUR LES FONCTIONS SENSITIVES, COGNITIVES, MOTRICES ET VISUELLES ET LES DIFFERENTES AIRES CEREBRALES STIMULEES.	- 53 -
FIGURE 23 : EFFETS D'UN STRESS MODERE SUR LES CONCENTRATIONS PLASMATIQUES D'ACTH ET DE CORTICOSTERONE CHEZ DES RATS MALES ET FEMELLES HEBERGES EN CONDITIONS STANDARD OU EN ENVIRONNEMENT ENRICHI.	- 57 -
FIGURE 24 : EFFETS DE L'ENRICHISSEMENT ENVIRONNEMENTAL SUR DES SOURIS IMMUNISEES CONTRE LE PEPTIDE MOG ₃₅₋₅₅ . (A)	- 59 -
FIGURE 25 : EFFETS DE L'ENRICHISSEMENT ENVIRONNEMENTAL SUR LE SCORE CLINIQUE MOYEN (A), SUR LA DEMYELINISATION (B) AINSI QUE SUR L'INFILTRATION LEUCOCYTAIRE (C) AU NIVEAU DE LA MOELLE EPINIÈRE DE SOURIS EAE-MOG ET CONTROLES.	- 61 -
FIGURE 26 : LE TRACTUS INTESTINAL.....	- 64 -
FIGURE 27 : STRUCTURATION ANATOMIQUE DU TRACTUS INTESTINAL.....	- 65 -
FIGURE 28 : COUPE HISTOLOGIQUE D'INTESTIN GRELE.....	- 66 -
FIGURE 29 : ANATOMIE DU COLON.....	- 67 -
FIGURE 30 : COUPE HISTOLOGIQUE DE COLON.....	- 67 -
FIGURE 31 : SYSTEME DE DRAINAGE LYMPHATIQUE GASTRO-INTESTINAL CHEZ LA SOURIS.....	- 69 -
FIGURE 32 : LA BARRIERE EPITHELIALE INTESTINALE.....	- 71 -
FIGURE 33 : TRANSMIGRATION D'UN LYMPHOCYTE T VERS UN TISSU LYMPHOÏDE ASSOCIE A L'INTESTIN.	- 74 -
FIGURE 34 : REGIONALISATION DES PRINCIPALES POPULATIONS LYMPHOCYTAIRES LE LONG DU TRACTUS INTESTINAL DE SOURIS EN ASSOCIATION AVEC LE CONTENU LUMINAL ET LA PRESENCE DE GALT. FIGURE ADAPTEE DE MOWAT ET AGACE, 2014.	- 76 -
FIGURE 35 : SCHEMA SIMPLIFIE D'UNE REACTION IMMUNITAIRE INTESTINALE A UN AGENT PATHOGENE.....	- 78 -
FIGURE 36 : DISTRIBUTION DES PRINCIPAUX GENRES BACTERIENS ET DE LA CHARGE BACTERIENNE LE LONG DU TRACTUS DIGESTIF.-	79
-	
FIGURE 37 : LES PRINCIPALES FONCTIONS DU MICROBIOTE INTESTINAL.	- 81 -

INDEX DES FIGURES

FIGURE 38 : PERTURBATION DES INTERACTIONS ENTRE LE MICROBIOTE ET L'IMMUNITE INTESTINALE DANS UN CONTEXTE PATHOLOGIQUE.	- 82 -
FIGURE 39 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES DIFFERENTES VOIES DE COMMUNICATIONS BIDIRECTIONNELLES ENTRE LE TRACTUS GASTRO-INTESTINAL ET LE CERVEAU.....	- 83 -
FIGURE 40 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES MODIFICATIONS CEREBRALES OBSERVEES CHEZ DES SOURIS DEPOURVUES DE MICROBIOTE INTESTINAL (« GERM-FREE »).....	- 84 -
FIGURE 41 : EFFET D'UN PRETRAITEMENT ANTIBIOTIQUE SUR LES SCORES CLINIQUES MOYENS D'UNE EAE-MOG (A) ET LES POPULATIONS LYMPHOCYTAIRES Th1 (B) ET Th17 (C) AU NIVEAU DES NŒUDS LYMPHATIQUES MESENTERIQUES.	- 86 -
FIGURE 42 : DES SOURIS DEPOURVUES DE MICROBIOTE INTESTINAL (« GERM-FREE ») SONT HAUTEMENT RESISTANTES A L'INDUCTION D'UNE EAE-MOG (A) ET PRESENTENT UNE DIMINUTION DES POPULATIONS LYMPHOCYTAIRES Th1 ET Th17 (B) AINSI QU'UNE AUGMENTATION DES POPULATIONS TREG (C) AU NIVEAU DE L'INTESTIN GRELE ET DE LA MOELLE EPINIÈRE.	- 87 -
FIGURE 43 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE D'UNE ORIGINE POSSIBLE DE L'ACTIVATION DE LYMPHOCYTES T AUTO-REACTIFS DANS DEUX REGIONS DISTINCTES DU TRACTUS INTESTINAL.	- 89 -
FIGURE 44 : UNE AUGMENTATION DE LA PERMEABILITE INTESTINALE EST OBSERVEE DE MANIERE PRECOCE CHEZ DES ANIMAUX IMMUNISES CONTRE LE PEPTIDE MOG ₃₅₋₅₅ EN ASSOCIATION AVEC UNE AUGMENTATION DES POPULATIONS Th17 ET UNE DIMINUTION DES POPULATIONS TREG INTESTINALES.....	- 90 -
FIGURE 45 : LE BLOCAGE DES INTERACTIONS MAdCAM-1/INTEGRINE A ₄ B ₇ RETARDE LA PROGRESSION D'UNE EAE INDUITE PAR TRANSFERT ADOPTIF DE LYMPHOCYTES Th17 SPECIFIQUEMENT DIRIGES CONTRE LE PEPTIDE MOG ₃₅₋₅₅ (A) ET DIMINUE LEUR MIGRATION VERS LE COLON (B) ET VERS LE SYSTEME NERVEUX CENTRAL (C).	- 92 -
FIGURE 46 : EXEMPLE DE SIGNAUX OBTENUS EN IRM MOLECULAIRE DE L'INFLAMMATION INTESTINALE UTILISANT DES MPIO DIRIGES CONTRE MAdCAM-1 (MPIO-AMAdCAM-1).	- 95 -
FIGURE 47 : COMPARAISON DES RESULTATS DE TROIS ETUDES CONCERNANT LES EFFETS DE L'ENRICHISSEMENT ENVIRONNEMENTAL SUR LES CONCENTRATIONS EN CORTICOSTERONE.....	- 168 -
FIGURE 48 : ANALYSE DES SOUS-POPULATIONS LYMPHOCYTAIRES T PAR CYTOMETRIE EN FLUX AU NIVEAU (A) DU COLON ET (B) DE L'ILEON DE SOURIS EAE-MOG AUX SCORES CLINIQUES (CS) 1 A 4 ET DE SOURIS SHAM.	- 171 -
FIGURE 49 : PROPOSITION D'UNE SUITE TEMPORELLE D'EVENEMENTS QUANT A L'IMPLICATION D'UNE INFLAMMATION INTESTINALE DANS LE DEVELOPPEMENT D'UNE EAE-MOG.	- 176 -

INDEX DES FIGURES

FIGURE 50 : ANALYSES DES POPULATIONS LYMPHOCYTAIRES TH, Tc ET B, AINSI QUE LES SOUS-POPULATIONS LYMPHOCYTAIRES TH1, TH2, TH17 ET TREG PAR CYTOMETRIE EN FLUX AU NIVEAU DE (A) LA MOELLE EPINIERE, (B) DU COLON ET (C) DE L'ILEON DE SOURIS EAE-MOG AUX JOURS 11 ET 12 APRES IMMUNISATION ET DE SOURIS SHAM.....	- 177 -
FIGURE 51 : IMAGES EN IMMUNOHISTOFLUORESCENCE DE LA PROTEINE ZO-1 OBTENUES PAR MICROSCOPIE STED CHEZ UNE SOURIS EAE-MOG AU SCORE CLINIQUE 4 (CS4) ET UNE SOURIS CONTROLE (SHAM).....	- 180 -
FIGURE 52 : EFFETS D'UN STRESS AIGU REPETE (WAS) SUR L'EXPRESSION DE LA PROTEINE MADCAM-1.....	- 183 -

INDEX DES TABLEAUX

TABLE 1 : ECHELLE NUMERIQUE DE SCORES CLINIQUES POUR L'EVALUATION DE L'EAE.	- 7 -
TABLE 2 : CARACTERISTIQUES ET MODES D'INDUCTION DES DIFFERENTS MODELES ANIMAUX DE SEP.....	- 12 -
TABLE 3 : CARACTERISTIQUES DES ETUDES SUR L'IMPLICATION DU STRESS DANS LE DEVELOPPEMENT DE LA SEP.....	- 37 -
TABLE 4 : CARACTERISTIQUES DES ETUDES SUR L'IMPLICATION DU STRESS DANS L'EVOLUTION DE LA SEP.....	- 39 -
TABLE 5 : EFFETS SUPPRESSEURS D'UN PARADIGME DE STRESS CHRONIQUE PAR CONTENTION SUR UNE EAE INDUITE PAR IMMUNISATION DE RATS CONTRE DES HOMOGENATS DE MOELLE EPINIERE.	- 41 -
TABLE 6 : EFFETS DU STRESS CHRONIQUE VARIE SUR L'EVOLUTION DES SYMPTOMES D'UNE EAE INDUITE PAR IMMUNISATION DE RATS CONTRE DE LA MYELINE BOVINE.	- 41 -
TABLE 7 : CARACTERISTIQUES DES ETUDES SUR LES EFFETS D'UN STRESS CHRONIQUE OU AIGU DANS LES MODELES ANIMAUX DE SEP.	- 45 -
TABLE 8 : CARACTERISTIQUES DES ETUDES CONCERNANT LES EFFETS DE L'ENRICHISSEMENT ENVIRONNEMENTAL SUR LA REPOSE AU STRESS CHEZ LES RONGEURS.	- 58 -
TABLE 9 : CARACTERISTIQUES DES ETUDES SUR LES EFFETS DE L'ENRICHISSEMENT ENVIRONNEMENTAL DANS DES MODELES ANIMAUX DE SEP.	- 63 -

LISTE DES ABREVIATIONS

ACTH : *AdrenoCorticoTropic Hormone*

AMPA : *alpha-Amino-3-hydroxy-5-Methyl-4-isoxazolePropionic Acid*

AMPc : Adénosine MonoPhosphate cyclique

APC : *Antigen Presenting Cell*

AVP : *Arginine VasoPressin*

BCR : *B-Cell Receptor*

BDNF : *Brain-Derived Neurotrophic Factor*

BHE : Barrière Hémato-Encéphalique

Breg : Lymphocyte B régulateur

CCK : *Cholecystokinin*

CD : Classe de Différenciation

CFU : *Colony-Forming Unit*

CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité

CNS : *Central Nervous System*

CORT : Corticostérone

CRH : *Corticotropin Releasing Hormone*

DC : *Dendritic Cell*

DSS : *Dextran Sodium Sulfate*

EAE : Encéphalomyélite Auto-immune Expérimentale

EAE-MOG : Encéphalomyélite Auto-immune Expérimentale induite par le peptide MOG₃₅₋₅₅

EAE-PLP : Encéphalomyélite Auto-immune Expérimentale induite par le peptide PLP₁₃₉₋₁₅₁

EBV : *Epstein-Barr Virus*

EC : Environnement Contrôle

EDSS : *Expanded Disability Status Scale*

EE : Environnement Enrichi

EGF : *Epidermal Growth Factor*

FAE : *Follicle-Associated Epithelium*

FasL : *Fas Ligand*

LISTE DES ABREVIATIONS

FMT : *Fecal Microbiota Transplantation*

FoxP3 : *Forkhead box P3*

GALT : *Gut-Associated Lymphoid Tissue*

Gd : Gadolinium

GF : *Germ-Free*

GLP-1 : *Glucagon-Like Peptide-1*

GM-CSF : *Granulocyte Macrophage – Colony Stimulating Factor*

GR : *Glucocorticoid Receptors*

HEV : *High Endothelial Venules*

HLA : *Human Leucocyte Antigen*

HPA : *Hypothalamic-Pituitary-Adrenal axis*

i.c. : *Injection intra-cérébrale*

IEL : *IntraEpithelial Lymphocyte*

IFN- γ : *Interféron gamma*

Ig : *Immunoglobuline*

IL : *InterLeukine*

IRM : *Imagerie par Résonance Magnétique*

JAM : *Junctional Adhesion Molecule*

KGF : *Keratinocyte Growth Factor*

KO : *Knock-Out*

LCR : *Liquide Céphalo-Rachidien*

LMP : *Latent Membrane Protein*

LPL : *Lamina Propria Lymphocyte*

LPS : *LipoPolySaccharide*

LTP : *Long-Term Potentiation*

LT α : *Lymphotoxin alpha*

MAdCAM-1 : *Mucosal Addressin Cell Adhesion Molecule-1*

MBP : *Myelin Basic Protein*

LISTE DES ABREVIATIONS

MHV : *Mouse Hepatitis Virus*

MICI : Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin

MLCK : *Myosin Light Chain Kinase*

MLN : *Mesenteric Lymph Node*

MOG : *Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein*

MPIO : *Microsized Particle of Iron Oxide*

MUNC-18 : *Mammalian UNCoordinated-18*

NGF : *Nerve Growth Factor*

NMDA : N-Méthyl-D-Aspartate

OPC : *Oligodendrocyte Progenitor Cell*

PDL-1 : *Programmed Cell Death-1*

pIgR : *polymeric Immunoglobulin Receptor*

PLP : *ProteoLipid Protein*

PP-EAE : Encéphalomyélite Auto-immune Expérimentale Primaire-Progressive

PP-SEP : Forme Primaire-Progressive de la Sclérose En Plaques

PSA : PolySaccharide A

PVN : *ParaVentricular Nucleus*

PYY : Peptide YY

ROR γ t : *RAR-related Orphan Receptor gamma t*

ROS : *Reactive Oxygen Species*

RR-EAE : Encéphalomyélite Auto-immune Expérimentale Récurrente-Rémittente

RR-SEP : Forme Récurrente-Rémittente de la Sclérose En Plaques

SCFA : *Short-Chain Fatty Acid*

SE : *Standard Environment*

SEP : Sclérose En Plaques

SFB : *Segmented Filamentous Bacteria*

SNAP-25 : *Synaptosomal-Associated Protein-25*

SNC : Système Nerveux Central

LISTE DES ABREVIATIONS

SP-EAE : Encéphalomyélite Auto-immune Expérimentale Secondairement Progressive

SPF : *Specific Pathogen-Free*

SP-SEP : Forme Secondairement Progressive de la Sclérose En Plaques

STD : Environnement Standard

STED : *STimulated-Emission-Depletion*

SVZ : *SubVentricular Zone*

T-bet : *T-box expressed in T cells*

Tc : Lymphocyte T cytotoxique

TCR : *T-Cell Receptor*

TED : *TransEpithelial Dendrites*

TGF- β : *Transforming Growth Factor-Beta*

Th : Lymphocyte T helper

TMEV : *Theiler's Murine Encephalomyelitis Virus*

TNBS : *TriNitroBenzene Sulfonic acid*

TNF α : *Tumor Necrosis Factor alpha*

Tr1 : *Type 1 regulatory T cell*

Treg : Lymphocyte T régulateur

TSPT : Trouble de Stress Post-Traumatique

UV : Rayonnement Ultra-Violet

VEGF : *Vascular Endothelial Growth Factor*

WAS : *Water Avoidance Stress*

ZO-1 : Zonula Occludens-1

INTRODUCTION

INTRODUCTION

I. La sclérose en plaques : une maladie auto-immune démyélinisante du système nerveux central.

I.1. Définitions et chiffres.

La sclérose en plaques (SEP) est une pathologie auto-immune démyélinisante du système nerveux central (SNC). Elle se traduit par l'infiltration à l'intérieur du parenchyme cérébral de cellules immunitaires dirigées contre des peptides constitutifs de la gaine de myéline, entraînant de ce fait sa destruction localisée au niveau des zones infiltrées (les plaques). Une telle destruction de la gaine de myéline, allant parfois jusqu'à engendrer une dégénérescence axonale, pourra ainsi être à l'origine de perturbations motrices (difficultés à la marche, spasticité), sensibles (engourdissements, douleurs neuropathiques, vertiges), visuelles et cognitives (changements émotionnels, dépression) chez les patients.

Cette maladie touche en France environ 110 000 personnes (soit une incidence autour de 150 pour 100 000 habitants) et 2,8 millions dans le monde. Elle constitue la première cause de handicap non traumatique acquis chez le jeune adulte puisque les premiers symptômes de la pathologie apparaissent dans la majorité des cas entre 25 et 35 ans, et touche majoritairement les femmes (sex-ratio 1:3).

Le diagnostic de la pathologie repose sur plusieurs critères initialement publiés par McDonald et ses collaborateurs en 2001 et revus en 2010 (Polman *et al.*, 2011) puis en 2017 (Thompson *et al.*, 2018). Ces critères reposent premièrement sur la présentation de symptômes cliniques évocateurs d'une SEP tels que des perturbations de la motricité, de la sensibilité, des troubles de l'équilibre, des atteintes visuelles. La gravité de ces symptômes initiaux ainsi que leur évolution ultérieure peuvent être évaluées par l'utilisation d'une échelle numérique permettant de leur attribuer un score (score EDSS pour « Expanded Disability Status Scale » ; Figure 1 ; Kurtzke, 1983). Succinctement, ce score permet d'évaluer plusieurs fonctions neurologiques : la fonction pyramidale (troubles moteurs), la fonction

cérébelleuse (équilibre, coordination), la fonction sensitive (sensibilité au toucher, dysesthésies), la fonction du tronc cérébral (dysarthrie, nystagmus), les fonctions sphinctériennes (troubles urinaires et intestinaux), la vision et les fonctions cognitives.

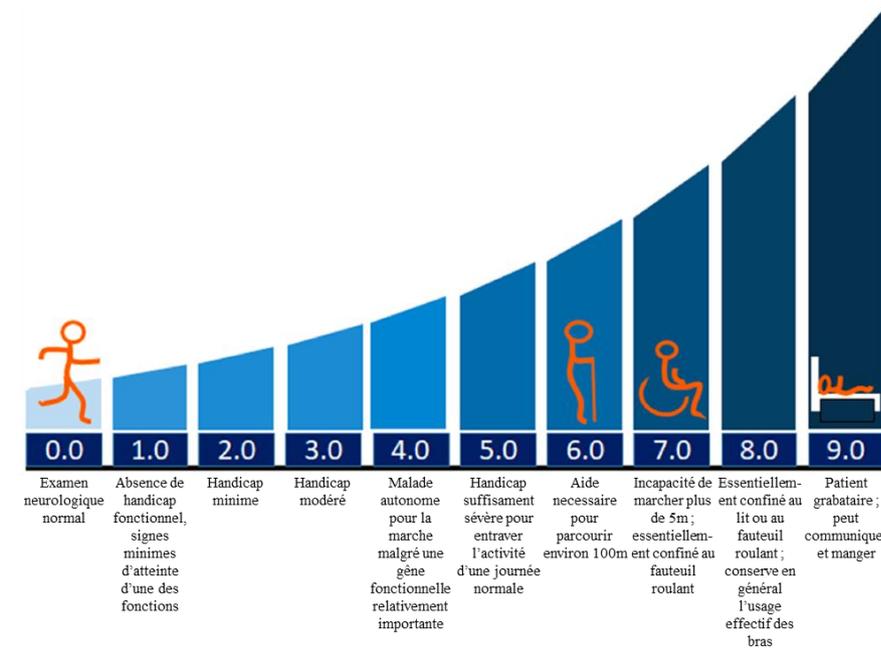


Figure 1 : Echelle simplifiée d'évaluation des symptômes neurologiques chez les patients atteints de SEP (échelle EDSS). Figure adaptée d'une autre figure publiée par l'Institut du Cerveau (ICM) selon les indications de la Société Francophone de la Sclérose En Plaques (SFSEP).

Ces symptômes neurologiques doivent en outre être corrélés à la présence de lésions inflammatoires visibles par imagerie par résonance magnétique (IRM) dans les territoires correspondants au sein du SNC. De surcroît, le diagnostic d'une SEP requiert une dissémination spatiale et temporelle de ces lésions centrales. La dissémination spatiale de ces lésions peut aisément être confirmée par utilisation de séquences IRM pondérées en T2 (Figure 2A). De plus, la présence de lésions actives, prenant le contraste en séquence pondérée en T1 après injection de gadolinium (T1 Gd⁺ ; Figure 2B-C), permet de confirmer une dissémination temporelle de celles-ci. Cependant, la révision de 2017 des critères de McDonald permet de s'affranchir de la détection de telles lésions actives pour attester d'une dissémination temporelle par la seule recherche de bandes oligoclonales dans le liquide céphalo-rachidien (LCR) des patients (Thompson *et al.*, 2018). En effet, la présence d'immunoglobulines dans le LCR des patients suffit à attester d'une installation chronique de la pathologie.

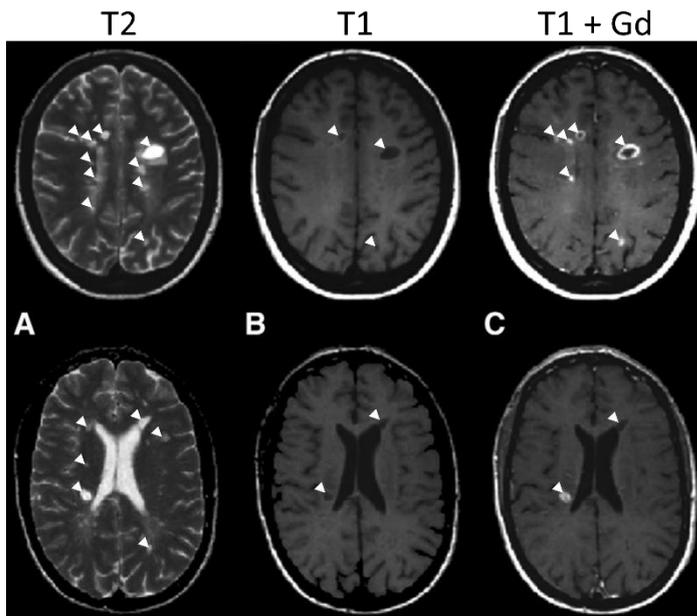


Figure 2 : Images IRM d'un cerveau de patient atteint de SEP. (A) Les images pondérées en T2 montrent de multiples lésions périventriculaires caractéristiques de la SEP. (B) Les images pondérées en T1 montrent un hyposignal de certaines des lésions. (C) Les images pondérées en T1 après injection de gadolinium (T1 + Gd) montrent plusieurs lésions actives. Figure adaptée de Filippi et Rocca, 2011.

Différentes évolutions des symptômes initialement décrites par Lublin et ses collaborateurs en 1996 permettent de distinguer quatre grandes formes de SEP (Figure 3) :

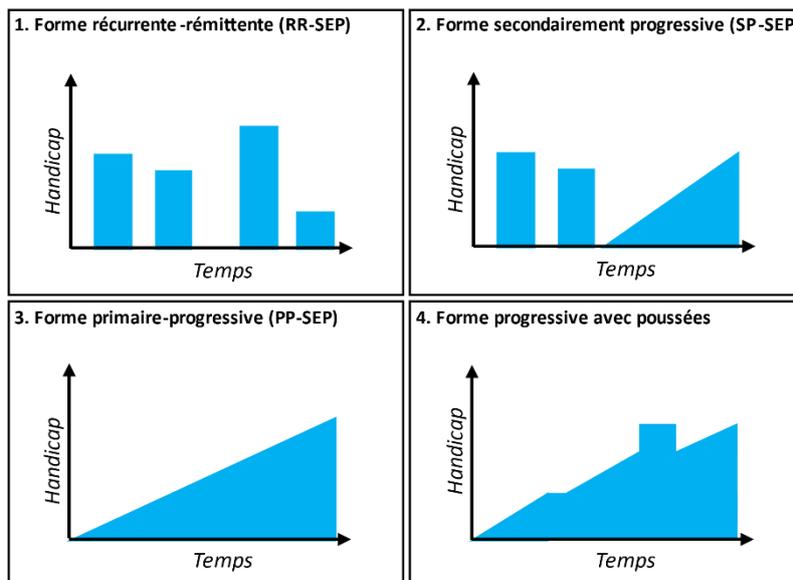


Figure 3 : Représentation schématique des quatre principales formes de SEP selon l'évolution des symptômes neurologiques. Inspiré de Lublin *et al.*, 1996.

- La **forme récurrente-rémittente** (RR-SEP), qui représente environ 85% des formes de début, se traduit par des épisodes aigus d'aggravation des symptômes neurologiques (poussées) suivis de phases de rémission plus ou moins complètes.
- Cette forme évolue progressivement vers des rémissions de moins en moins complètes entraînant alors l'augmentation progressive des symptômes. On parle alors de conversion vers une **forme secondairement progressive** (SP-SEP) de la pathologie. La durée médiane de

conversion est d'environ 20 ans et se trouve être dépendante de nombreux facteurs intrinsèques et extrinsèques. Par exemple, il a été récemment décrit que les patients ayant un score EDSS plus élevé au moment du diagnostic présentaient un plus grand risque de conversion vers une forme secondairement progressive par rapport à des patients avec un score EDSS plus faible (Barzegar *et al.*, 2021). Cette même étude a également mis en exergue qu'un âge plus élevé au moment du diagnostic, que la présentation avec des symptômes moteurs, que la présence de lésions spinales ainsi que des antécédents de tabagisme était autant de facteurs de risques de conversion.

- La **forme primaire-progressive** (PP-SEP), qui correspond à 10-15% des formes de début, présente quant à elle une aggravation progressive des symptômes neurologiques sans phases de rémission. Contrairement à la forme RR-SEP, celle-ci survient majoritairement chez le patient plus âgé avec un âge médian de déclaration de la pathologie autour de 40 ans (contre 30 ans environ pour la forme RR-SEP ; Koch *et al.*, 2009).
- La **forme progressive avec poussées** concerne une faible proportion des cas (moins de 5%) et se caractérise par des phases de poussées (aggravation des symptômes neurologiques) dans une évolution déjà progressive de ces symptômes.

Ces quatre formes historiquement décrites se sont vues révisées en 2013 notamment en raison de la disponibilité de nouveaux outils diagnostics pour la classification des différentes formes de SEP telle que l'IRM (Lublin *et al.* 2013). Ainsi, pour chacune des formes de SEP, a été ajouté un statut actif ou inactif, un statut actif étant défini par l'apparition de nouvelles lésions T1 Gd⁺ et/ou l'apparition de nouvelles lésion T2 et/ou l'élargissement des lésions T2 préexistantes. La forme progressive avec poussées s'est retrouvée quant à elle exclue de la nouvelle classification puisqu'intégrée aux formes PP-SEP (actives ou inactives).

Cette nouvelle classification introduit également une nouvelle forme, à savoir le syndrome cliniquement isolé, qui correspond à un premier épisode inflammatoire démyélinisant du SNC pouvant évoluer par la suite vers une SEP *stricto sensu* à la condition qu'un nouvel événement clinique et/ou que de nouvelles lésions à l'IRM surviennent (Lublin *et al.*, 2013 ; Thompson *et al.*, 2017).

Bien que la classification de 1996 soit aujourd'hui partiellement obsolète dans la catégorisation des différentes formes de SEP, sa définition par la seule évolution des symptômes neurologiques en fait un outil simple pour la transposition aux modèles animaux disponibles pour l'étude de cette pathologie.

En effet, parmi la multitude de modèles pré-cliniques visant à mieux comprendre la physiopathologie de la SEP, deux modèles d'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE) permettent de mimer les deux principales formes de SEP précédemment citées que sont les RR- et PP-SEP. La présentation de ces modèles fera l'objet de la partie suivante.

I.2. Les modèles animaux de SEP.

La caractérisation des processus physiopathologiques d'une affection quelconque ainsi que la recherche de traitements efficaces contre celle-ci requièrent dans la plupart des cas l'utilisation de modèles animaux. Cependant, aucun modèle animal ne saurait à lui seul reproduire à l'identique la pathologie humaine. Les modèles disponibles pour l'étude de la SEP ne dérogent pas à la règle. En effet, la recherche scientifique a su produire divers modèles mimant chacun des versants différents de la maladie. Nous nous proposons dans la prochaine partie de présenter ces principaux modèles ainsi que leurs spécificités respectives.

I.2.1. Les modèles d'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE).

L'histoire des modèles animaux de SEP commence en 1885 avec le vaccin contre la rage développé par Louis Pasteur. En effet, ce vaccin, qui consistait en l'injection d'homogénats de moelle épinière de lapins infectés par la rage, pouvait conduire au développement d'encéphalomyélites post-vaccinales. Quelques cinquante années plus tard, en 1935, Rivers et Schwentker parviennent à induire ce qu'ils nomment une encéphalomyélite expérimentale en injectant de manière répétée par voie intra-musculaire des extraits de cerveaux de lapins sains à des macaques rhésus. Ils émettent alors l'hypothèse que les cas d'encéphalomyélites post-vaccinales précédemment citées pouvaient être le résultat d'une induction involontaire d'une réaction contre la gaine de myéline.

Alors que ces premiers travaux étaient réalisés sur le macaque rhésus, de nombreux autres auteurs se sont intéressés à étudier ce même modèle chez diverses espèces telles que le cochon d'inde (Freund *et al.*, 1947), la souris (Olitsky et Yager, 1949) ou encore le rat (Lipton et Freund, 1952). Ces deux dernières espèces se sont alors trouvées être particulièrement intéressantes pour l'étude des mécanismes physiopathologiques de la SEP du fait de la diversité des formes de la pathologie qu'il était possible d'obtenir (EAE progressive ou récurrente-rémittente). L'efficacité et la reproductibilité de ces modèles ont de plus été optimisés *via* l'utilisation d'adjuvant complet de Freund pour l'émulsion d'extraits de cerveaux de lapins et de toxine pertussique (Kabat *et al.*, 1946 ; Munoz *et al.*, 1984).

D'autres études ont permis par la suite de définir les principaux agents immunogènes contenus dans les extraits de cerveau utilisés jusqu'alors. Ceux-ci semblaient provenir majoritairement de la substance blanche et plus précisément de la myéline, et se trouvaient être des protéines plutôt que des lipides (Olitsky et Tal, 1952 ; Kies *et al.*, 1960). Ces premières études ont permis d'identifier en particulier deux protéines que sont la MBP (pour « Myelin Basic Protein ») et la PLP (pour « ProteoLipid Protein »). Quelques années plus tard, en 1970, Eylar et ses collaborateurs ont pu mettre en évidence que la protéine MBP entière n'était pas indispensable à l'induction d'une encéphalomyélite expérimentale mais qu'un fragment de seulement 9 acides aminés de cette protéine suffisait à l'induire. Enfin, il aura fallu attendre les années 1990s pour identifier un plus grand nombre de peptides susceptibles d'entraîner une encéphalomyélite auto-immune parmi lesquels la MOG (pour « Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein »), l'une des protéines les plus utilisées à ce jour pour l'induction d'EAE (Linington *et al.*, 1993 ; Amor *et al.*, 1994 ; Johns *et al.*, 1995).

Ces nouveaux peptides identifiés ont alors permis de standardiser l'induction de ces modèles animaux de SEP. Cependant, afin de pouvoir évaluer de manière fiable et reproductible l'évolution de la pathologie, il a fallu établir une échelle numérique permettant d'évaluer l'intensité des symptômes moteurs observés. Ainsi, McRae et ses collaborateurs ont proposé en 1992 une échelle de score clinique. Malgré l'existence de quelques variantes dans le nombre de grades et leurs définitions, cette échelle reste largement utilisée à ce jour (Table 1 ; McRae *et al.*, 1992).

Grade	Symptômes cliniques
0	Aucune anomalie
1	Queue flasque
2	Queue flasque et faiblesse des membres postérieurs
3	Paralysie partielle des membres postérieurs
4	Paralysie complète des membres postérieurs
5	Animal moribond ou mort

Table 1 : Echelle numérique de scores cliniques pour l'évaluation de l'EAE.

Ainsi, ces nombreux travaux réalisés au XX^{ème} siècle ont permis l'émergence et l'optimisation de divers modèles d'EAE qui furent et seront à l'origine de l'enrichissement de nos connaissances sur la physiopathologie de la SEP.

Cette diversité dans les modèles disponibles permet de répondre à des questionnements tout aussi divers. En effet, certains modèles d'EAE permettent de mimer les formes récurrentes-rémittentes de la SEP tandis que d'autres se rapprochent davantage des formes primaires progressives. D'autres modèles, tels que les modèles transgéniques par exemple, permettent quant à eux de nous affranchir des effets d'une immunisation active. Les prochaines parties auront pour vocation de présenter les principaux modèles murins d'EAE existant à ce jour.

1.2.1.1. L'EAE récurrente-rémittente (RR-EAE) chez la souris SJL/J.

Les premières tentatives d'immunisation de souris de la souche SJL/J remontent aux années 1980s. En effet, Zamvil et ses collaborateurs sont parvenus en 1985 à induire une EAE par immunisation de cette souche contre un peptide de la protéine MBP (immunisation active) mais également par l'intermédiaire d'une introduction de cellules T réactives à cette même protéine (immunisation passive). Les auteurs constatèrent notamment qu'une telle immunisation passive entraînait le développement d'une forme récurrente de la maladie dans les deux tiers des cas et le développement d'une paralysie persistante (forme chronique) dans un tiers des cas.

Par la suite, d'autres études ont permis de mettre en évidence la nature immunogène du peptide PLP₁₃₉₋₁₅₁ dans la souche SJL/J (Whitham *et al.*, 1991 ; McRae *et al.*, 1995). Ces études ont en outre

permis de montrer que la majorité des animaux immunisés par ce peptide présentaient plusieurs phases de rémissions suivies de récurrences des symptômes moteurs après une première phase aiguë de la pathologie (Figure 4).

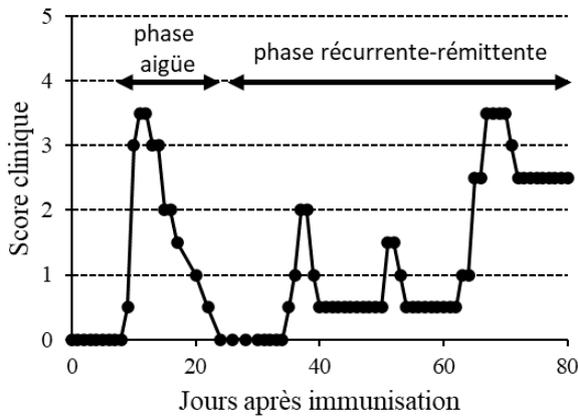


Figure 4 : Exemple d'évolution récurrente-rémittente des symptômes moteurs (scores cliniques) dans une EAE induite par immunisation de souris de la souche SJL/J contre le peptide PLP₁₃₉₋₁₅₁.

Ainsi, ces premières études ont permis d'obtenir un modèle fiable et reproductible de la forme RR-SEP par l'utilisation d'un épitope particulier de la protéine PLP, le peptide PLP₁₃₉₋₁₅₁, dans une souche murine particulière, la souche SJL/J.

1.2.1.2. L'EAE primaire-progressif (PP-EAE) chez la souris C57BL/6J.

Bien que sa nature immunogène ait été identifiée plus tardivement, la protéine MOG s'est rapidement trouvée être un outil majeur dans l'obtention de modèles animaux de SEP. En effet, contrairement au peptide PLP₁₃₉₋₁₅₁, l'immunisation de souris C57BL/6J par des peptides provenant de la protéine MOG, et tout particulièrement le peptide MOG₃₅₋₅₅, permet d'induire une forme progressive chronique de l'EAE (Figure 5 ; Mendel *et al.*, 1995).

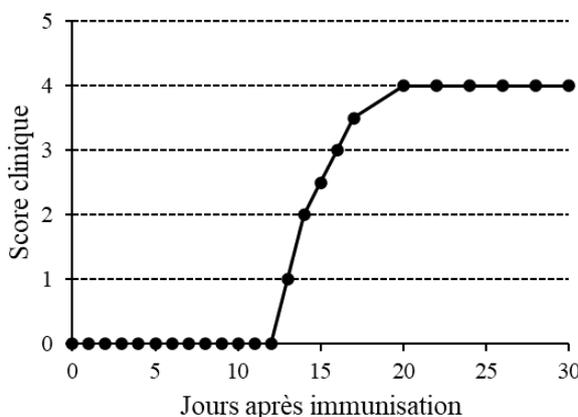


Figure 5 : Exemple d'évolution progressive des symptômes moteurs (scores cliniques) dans une EAE induite par immunisation de souris de la souche C57BL/6J contre le peptide MOG₃₅₋₅₅.

En conclusion, les multiples tentatives d'immunisation de différentes souches murines *via* l'utilisation de nombreux peptides provenant de la gaine de myéline a conduit, dans les années 1990s, à l'émergence de deux principaux modèles, l'EAE-PLP (RR-EAE) et l'EAE-MOG (PP-EAE), mimant respectivement les deux principales formes de SEP à savoir la RR-SEP et la PP-SEP.

Cependant, ces modèles trouvent parfois une utilisation restreinte, notamment du fait du caractère non spontané de la pathologie induite. Ainsi, d'autres modèles tels que l'utilisation d'animaux transgéniques ont vu le jour au cours des années 2000s pour pallier ce manque de spontanéité dans les processus physiopathologiques engagés. Nous nous proposons alors maintenant de présenter rapidement ces modèles.

1.2.1.3. Les modèles transgéniques.

L'utilisation d'animaux transgéniques permet de s'affranchir des effets d'une immunisation directe et notamment des effets potentiellement confondants des adjuvants utilisés (adjuvant complet de Freund et toxine pertussique). De plus, ceci permet de s'approcher davantage de la physiopathologie humaine du fait du caractère spontané du développement de l'auto-immunité. En effet, ce modèle, généré pour la première fois par l'équipe de Bettelli et ses collaborateurs en 2003 repose sur l'utilisation de cellules T CD4⁺ (lymphocytes T auxiliaires ou « helper ») exprimant un TCR (pour « T-Cell Receptor ») spécifiquement dirigé contre le peptide MOG₃₅₋₅₅ (souris 2D2). Dans cette étude, les auteurs ont pu mettre en évidence que plus de 30% de ces souris transgéniques développaient spontanément une neuromyéélite optique. Cependant, seulement 4% d'entre elles avaient développé une EAE spontanée (Bettelli *et al.*, 2003). D'autres auteurs sont quant à eux parvenus à induire une EAE spontanée par le seul intermédiaire d'un transfert de lymphocytes T issus de souris 2D2 réactivés *in vitro* (Jäger *et al.*, 2009).

Ainsi, le développement de ces nouvelles méthodes d'induction d'EAE permet de répondre à de nouveaux questionnements, concernant notamment la genèse même de la pathologie. Cependant, elles présentent, à l'instar des inductions actives précédemment présentées, de fortes limitations quant à l'étude même des mécanismes de dé- et de re-myélinisation par exemple. En effet, ces modèles

présentent des lésions sporadiques touchant l'intégralité du SNC, qu'il est par définition très difficile de localiser avec précision, rendant ce genre de modèle inadapté à de telles études.

Ainsi, d'autres modèles utilisant des agents viraux tel que le virus de l'encéphalomyélite murine de Theiler ou des agents chimiques telles que la cuprizone ou la lysolécithine permettent alors de répondre à ce type de questionnement. Nous allons à présent développer ces différents modèles.

I.2.2. Les modèles viraux de démyélinisation et de dommages axonaux : exemple du virus de l'encéphalomyélite murine de Theiler.

Certaines infections virales du SNC peuvent entraîner chez l'homme (*e.g.* virus JC) et chez l'animal une démyélinisation. Chez la souris, on peut noter certaines souches de coronavirus telle que le virus de l'hépatite murine (MHV) ou encore le virus de l'encéphalomyélite murine de Theiler (TMEV) comme sources de démyélinisation centrale. Le TMEV, décrit pour la première fois par Max Theiler en 1937, est un virus à ARN qui présente un fort tropisme pour les neurones. Les TMEV sont divisés en deux groupes : les virus du groupe GDVII, hautement virulents, entraînent le décès des souris en une à deux semaines, tandis que les virus du groupe TO sont à l'origine de polioencéphalomyélites dès une semaine après l'infection et d'une démyélinisation inflammatoire chronique après un mois d'évolution (phase chronique). Ce sont ainsi les virus de ce deuxième groupe qui constituent, par leur pouvoir de démyélinisation, un modèle murin de SEP (Tsunoda et Fujinami, 1996). Cependant, alors que les dommages axonaux observés dans la SEP et dans ses modèles animaux sont décrits comme secondaires à la démyélinisation, ces mêmes dommages précèdent la pathologie démyélinisante dans le cas d'une infection au TMEV (Tsunoda *et al.*, 2003).

I.2.3. Les modèles de démyélinisation par utilisation d'agents chimiques.

Alors que les différents modèles d'EAE sont particulièrement adaptés à l'étude des mécanismes auto-immuns à l'origine de la SEP, les modèles de démyélinisation par utilisation d'agents chimiques sont les modèles les plus adaptés à l'étude des phénomènes de dé- et de re-myélinisation. Les agents chimiques les plus couramment utilisés pour induire une telle démyélinisation sont la cuprizone et la lysolécithine.

I.2.3.1. Démyélinisation par la cuprizone.

La cuprizone est un chélateur du cuivre qui provoque spécifiquement la mort des oligodendrocytes par apoptose lorsqu'ingérée par les animaux. Cette mort cellulaire provoque par conséquent une démyélinisation des axones, notamment au niveau du corps calleux. Après cette phase de démyélinisation, et après arrêt du traitement à la cuprizone, une phase de remyélinisation se met en place autorisant l'étude des mécanismes impliqués dans ce processus (Ludwin *et al.*, 1978).

I.2.3.2. Démyélinisation par la lysolécithine.

La lysolécithine est un activateur de la phospholipase A2 qui induit des démyélinisations focales au niveau de son site d'injection, généralement réalisée au niveau de la moelle épinière ou du corps calleux des animaux (Hall, 1972). Cette démyélinisation, contrairement à celle observée dans le modèle cuprizone, résulte d'une destruction directe de la gaine de myéline et non de l'apoptose des oligodendrocytes (Figure 6).

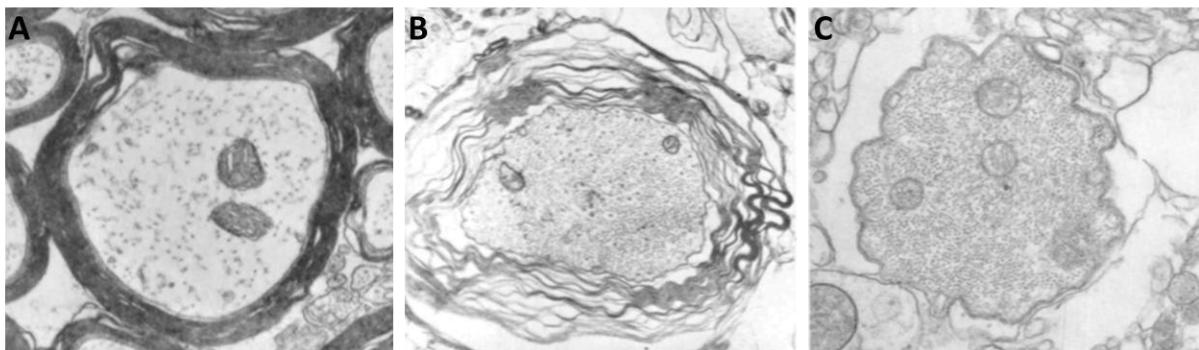


Figure 6 : Observation d'axones provenant du cordon postérieur de la moelle épinière en condition basale ou après traitement à la lysolécithine par microscopie électronique à transmission.

(A) Axone du cordon dorsal en absence d'injection (X 23 250). La gaine de myéline se présente sous forme compacte. (B) Axone du cordon dorsal 30 minutes après injection de lysolécithine (X 19 600). La gaine de myéline apparaît déjà grandement altérée. (C) Axone du cordon dorsal 72 heures après injection de lysolécithine (X 31 500). L'axone n'est plus entouré que par des vestiges de la gaine de myéline. Adapté de Hall, 1972.

De plus, cette démyélinisation aiguë est suivie d'une remyélinisation complète en cinq à six semaines chez l'animal jeune, tandis qu'elle semble être beaucoup plus lente chez l'animal plus âgé (Shields *et al.*, 1999).

Ainsi, le modèle de démyélinisation par la lysolécithine est un modèle rapide et hautement reproductible de démyélinisation centrale permettant d'étudier à la fois les mécanismes de dé- et de re-myélinisation, tout en ne faisant pas intervenir de médiateurs de l'immunité.

Par la présentation, certes non exhaustive, des différents modèles animaux disponibles pour l'étude de la SEP, nous avons pu mettre en lumière à la fois les bénéfices apportés par chacun de ces modèles, mais également leurs limites, en regard du questionnement posé et des mécanismes étudiés (Table 2).

Modèle de SEP	Mode d'induction	Applications
EAE récurrente - rémittente chez la souris SJL/J (RR-EAE)	Immunisation des souris SJL/J avec le peptide PLP ₁₃₉₋₁₅₁	Etude de la neuroinflammation et de l'activation du système immunitaire
EAE primaire - progressive chez la souris C57BL/6J (PP-EAE)	Immunisation des souris C57BL/6J avec le peptide MOG ₃₅₋₅₅	Etude de la neuroinflammation et de l'activation du système immunitaire
EAE chez des souris transgéniques	Introduction dans des souris receveuses de clones de lymphocytes Th (2D2) présentant un TCR spécifiquement dirigé contre le peptide MOG ₃₅₋₅₅	Etude de la neuroinflammation et de l'activation du système immunitaire, en limitant le nombres de facteurs confondants
Virus de l'encéphalomyélite murine de Theiler (TMEV)	Infection des souris avec le virus de l'encéphalomyélite murine de Theiler	Etude des dommages axonaux, ainsi que des mécanismes de dé- et re-myélinisation
Modèle de démyélinisation par la cuprizone	Cuprizone introduite dans la nourriture des souris	Etude des mécanismes de dé- et re-myélinisation
Modèle de démyélinisation par la cuprizone	Injection <i>in situ</i> de lysolécithine dans la moëlle épinière des souris	Etude des mécanismes de dé- et re-myélinisation

Table 2 : Caractéristiques et modes d'induction des différents modèles animaux de SEP. Adapté de Procaccini *et al.*, 2015.

L'utilisation combinée de ces multiples modèles ont permis, au cours des deux dernières décennies, d'apporter de nouvelles connaissances quant à la physiopathologie de la SEP et de proposer, suite à leur acquisition, de nouvelles pistes thérapeutiques dans la prise en charge des patients atteints de SEP. L'objet de la partie suivante sera alors de faire un état des lieux des connaissances actuelles sur la physiopathologie de la SEP.

I.3. Physiopathologie de la SEP.

La SEP, en tant que pathologie auto-immune, fait intervenir un grand nombre d'effecteurs cellulaires de l'immunité innée et adaptative dont les principaux sont résumés dans la figure 7.

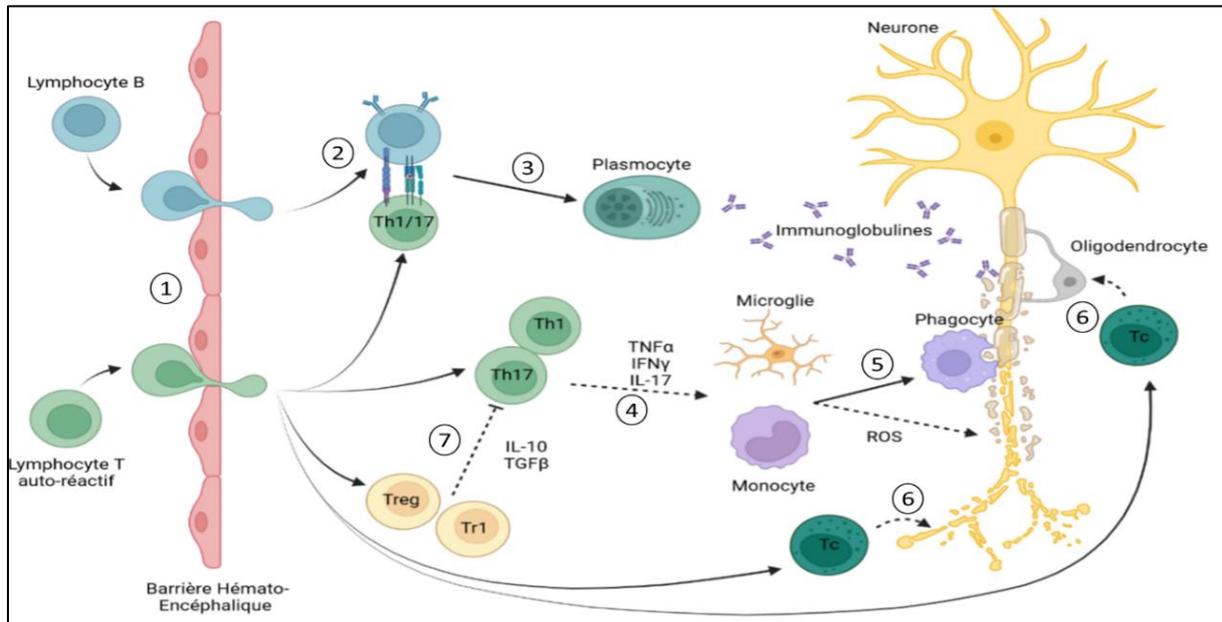


Figure 7 : Les principaux types cellulaires de l'immunité impliqués dans les dommages du système nerveux central.

(1) Les lymphocytes T et B pénètrent dans le parenchyme cérébral à travers la barrière hématoencéphalique. (2) La costimulation entre les lymphocytes B et T conduit à (3) la différenciation des lymphocytes B en plasmocytes sécrétant d'immunoglobulines et participe à la polarisation des lymphocytes T auto-réactifs en Th1 et Th17. (4) La sécrétion de cytokines pro-inflammatoires ($TNF\alpha$, $IFN\gamma$, IL-17) par les lymphocytes Th1 et Th17 permet en outre l'activation des cellules microgliales et des monocytes conduisant à (5) leur différenciation en phagocytes et à la sécrétion de ROS notamment induisant des dommages de la gaine de myéline et des axones. (6) Les lymphocytes Tc participent également à ces dommages en agissant directement sur les neurones et sur les oligodendrocytes. (7) L'inflammation locale du système nerveux central peut être atténuée par les lymphocytes Treg et Tr1 *via* leur sécrétion de cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL-10 et le TGF- β .
Figure créée avec BioRender.com

I.3.1. Les cellules de l'immunité adaptative impliquées dans la SEP.

Les cellules de l'immunité adaptative sont les premières à avoir été étudiées dans la physiopathologie de la SEP. Ces cellules, contrairement aux cellules de l'immunité innée, présentent des mécanismes de réponses spécifiques à des antigènes donnés, notamment par la présence à leurs surfaces de récepteurs spécifiques à ces antigènes.

Deux grandes populations de cellules de l'immunité adaptative sont distinguées, notamment en fonction du type de récepteur exprimé à leur membrane :

- Les lymphocytes T, exprimant à leur surface des récepteurs des cellules T (TCR pour « T Cell Receptor ») associés à la protéine CD3 et à la protéine CD4 (lymphocytes T auxiliaires ou « helper ») ou la protéine CD8 (lymphocytes T cytotoxiques).
- Les lymphocytes B, exprimant à leur surface des récepteurs des cellules B (BCR pour « B Cell Receptor »), des immunoglobulines de surface.

Le schéma classique d'une réponse immunitaire adaptative entend une interaction spécifique de l'antigène étranger, *via* sa présentation par une cellule présentatrice de l'antigène (APC pour « Antigen Presenting Cell ») avec un TCR d'un lymphocyte T naïf lui-même dirigé contre cet antigène. S'en suit alors une activation de ce lymphocyte T naïf lui permettant entre autres de se multiplier (expansion clonale) et de se différencier en lymphocyte T helper (Th) ou T cytotoxique (Tc ; Figure 8).

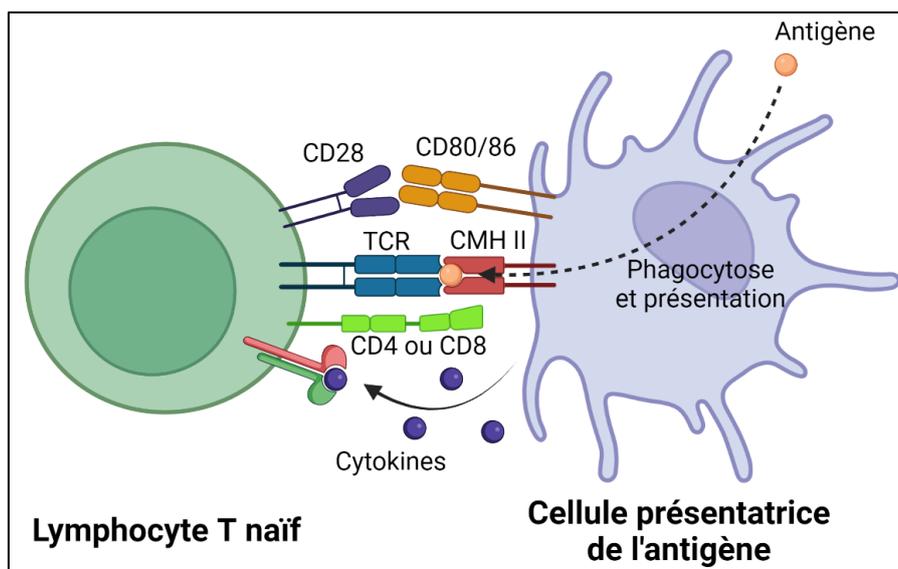


Figure 8 : Présentation simplifiée de l'activation d'un lymphocyte T naïf par une cellule présentatrice de l'antigène. Après phagocytose d'un antigène donné par une cellule présentatrice de l'antigène, celui-ci va être présenté à sa surface en association avec le CMH-II. Un lymphocyte T naïf se fixe spécifiquement, *via* son complexe TCR-CD4 ou TCR-CD8, au CMH-II associé à l'antigène. Cette fixation spécifique, conjointement associée à l'interaction entre les protéines CD28 et CD80/86 ainsi que l'activation des récepteurs aux cytokines situés à la surface du lymphocyte T naïf par des cytokines sécrétées par la cellule présentatrice de l'antigène, provoque sa différenciation en lymphocyte T helper ou cytotoxique. CMH-II : Complexe Majeur d'Histocompatibilité de type II ; TCR : T-Cell Receptor. Figure créée avec BioRender.com.

L'activation conjointe d'un lymphocyte B par ce même antigène et par un lymphocyte Th précédemment activé, par l'intermédiaire notamment d'une interaction entre le complexe TCR-CD4 avec le complexe majeur d'histocompatibilité de type II (CMH-II) associé à l'antigène présent à la surface du lymphocyte B, entrainera alors son activation spécifique (Figure 9). Cette activation,

également sous la dépendance d'autres signaux tels que des interleukines sécrétées par le lymphocyte Th, conduira alors à la multiplication et à la différenciation de ce lymphocyte B en plasmocyte qui sécrètera des immunoglobulines circulantes. Celles-ci permettront alors la neutralisation des antigènes en favorisant notamment leur phagocytose par les cellules de l'immunité innée (opsonisation).

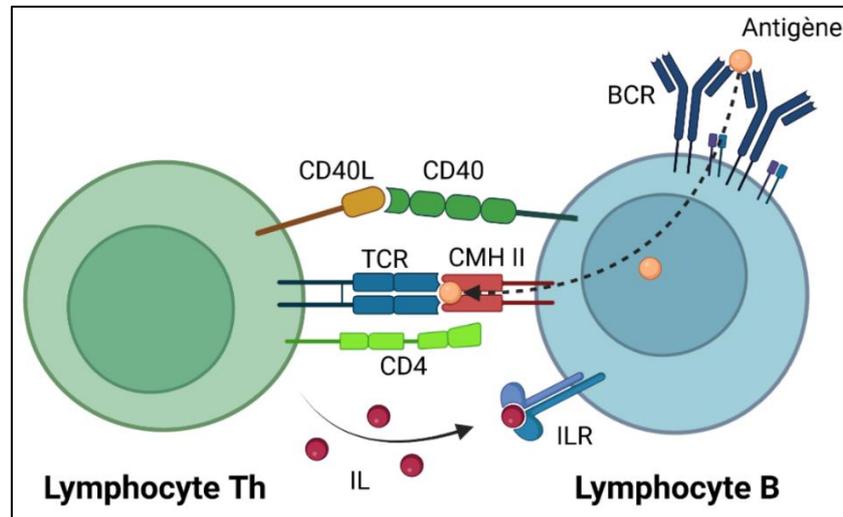


Figure 9 : Présentation simplifiée de l'activation d'un lymphocyte B par un lymphocyte T helper.

La reconnaissance spécifique d'un antigène par le BCR entraîne son internalisation dans le lymphocyte B puis sa présentation en association avec le CMH-II à la membrane de celui-ci. Un lymphocyte Th préalablement activé se fixe spécifiquement, *via* son complexe TCR-CD4, au CMH-II associé à l'antigène. Cette fixation spécifique, conjointement associée à l'interaction entre les protéines CD40 et CD40L ainsi que l'activation des récepteurs aux interleukines (ILR) situés à la surface du lymphocyte B par des interleukines (IL) sécrétées par le lymphocyte Th, provoque l'activation du lymphocyte B. BCR : B-Cell Receptor ; CMH-II : Complexe Majeur d'Histocompatibilité de type II ; TCR : T-Cell Receptor ; ILR : Récepteur aux interleukines ; IL : Interleukines. Figure créée avec BioRender.com.

Les lymphocytes T cytotoxiques (Tc) sont quant à eux impliqués dans la défense contre les infections intra-cellulaires. En effet, leur TCR a la capacité d'interagir avec le CMH de type I (CMH-I) situé à la surface des cellules de l'organisme lorsque celui-ci est associé à un antigène pathogène. Cette interaction entraîne la libération de granules cytotoxiques contenant des perforines formant des pores dans la membrane de la cellule cible et des granzymes ayant une action pro-apoptotique. L'action conjointe des perforines et des granzymes conduira alors à la destruction de la cellule infectée (Figure 10). Les lymphocytes Tc sont en outre capables d'induire l'apoptose de la cellule cible, *via* l'activation de la voie de la caspase, après interaction de la protéine Fas Ligand (FasL) exprimée à leur surface avec le récepteur Fas exprimé à la surface de la cellule cible. Ce processus permet notamment de mettre fin à une réaction immunitaire lorsque celle-ci n'est plus nécessaire.

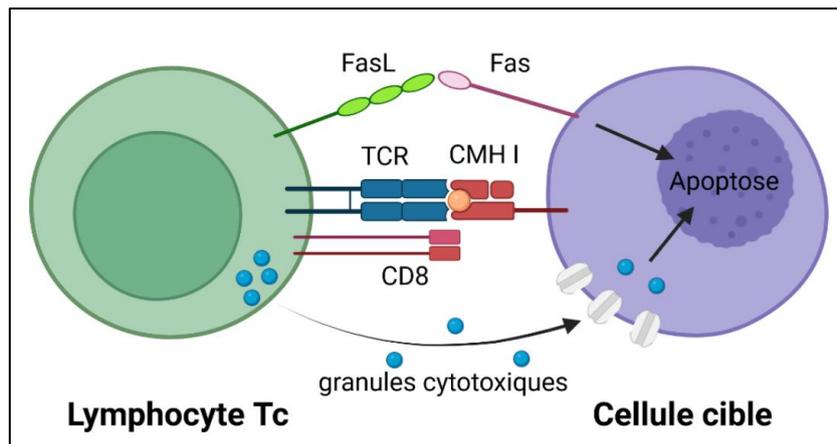


Figure 10 : Présentation simplifiée des mécanismes d'action d'un lymphocyte T cytotoxique sur une cellule cible. La reconnaissance spécifique de l'antigène associé au CMH-I par le TCR du lymphocyte Tc entraîne son activation. Le lymphocyte Tc ainsi activé libère des granules cytotoxiques contenant des perforines, à l'origine de dommages à la membrane plasmique, et des granzymes, qui induiront l'apoptose de la cellule cible. Le lymphocyte Tc peut également exercer ses fonctions cytotoxiques par activation du récepteur Fas à la surface de la cellule cible par la protéine FasL exprimée à sa surface. CMH-I : Complexe Majeur d'Histocompatibilité ; TCR : T-Cell Receptor. Figure créée avec BioRender.com.

Chacune de ces différentes populations lymphocytaires se trouve être associée à la physiopathologie de la SEP. Nous nous proposons donc à présent d'introduire les nouvelles connaissances concernant les fonctions de ces différents types cellulaires dans la pathologie.

1.3.1.1. Les lymphocytes T.

L'implication des lymphocytes T dans la SEP est depuis longtemps investiguée. En effet, la présence de lymphocytes Th et de lymphocytes Tc au niveau des lésions centrales de patients atteints de SEP a été décrite dès les années 1980s (Traugott *et al.*, 1983 ; Hauser *et al.*, 1986). Ces lymphocytes vont, à l'intérieur du parenchyme cérébral, entraîner la destruction de la gaine de myéline, la mort des oligodendrocytes et des dommages axonaux conduisant à l'apparition des symptômes neurologiques observés. Parallèlement, des mécanismes régulateurs se mettent en place pour limiter l'inflammation et initier la remyélinisation conduisant aux rémissions cliniques observées dans les formes RR-SEP (Baecher-Allan *et al.*, 2018).

Cette balance entre phénomènes pro- et anti-inflammatoires reflète une dualité dans les phénotypes de lymphocytes T. En effet, les lymphocytes T peuvent être répartis en deux grandes catégories : les lymphocytes T effecteurs (pro-inflammatoires) et les lymphocytes T régulateurs (anti-inflammatoires).

1.3.1.1.1. Les lymphocytes T effecteurs.

Les lymphocytes T effecteurs comprennent à la fois les lymphocytes Th (CD4⁺) et les lymphocytes Tc (CD8⁺).

Les lymphocytes T CD4⁺ effecteurs (Th) :

Les lymphocytes Th peuvent être subdivisés en sous-catégories en fonction de leur profil d'expression cytokinique (Figure 11 ; Luckheeram *et al.*, 2012) :

- Les lymphocytes Th1, exprimant le facteur de transcription T-bet et produisant l'interféron- γ (IFN- γ) et l'interleukine-2 (IL-2), sont impliqués dans l'élimination des pathogènes intracellulaires et dans certains mécanismes auto-immuns.
- Les lymphocytes Th2, exprimant le facteur de transcription GATA-3 et responsables de la production d'IL-4 et d'IL-13, sont notamment impliqués dans les réponses immunitaires contre les parasites extra-cellulaires.
- Les lymphocytes Th17, exprimant le facteur de transcription ROR γ t et responsables de la production d'IL-17 et d'IL-21, participent à la réponse immunitaire contre des infections bactériennes et fongiques extra-cellulaires et sont impliqués dans l'apparition de pathologies auto-immunes.

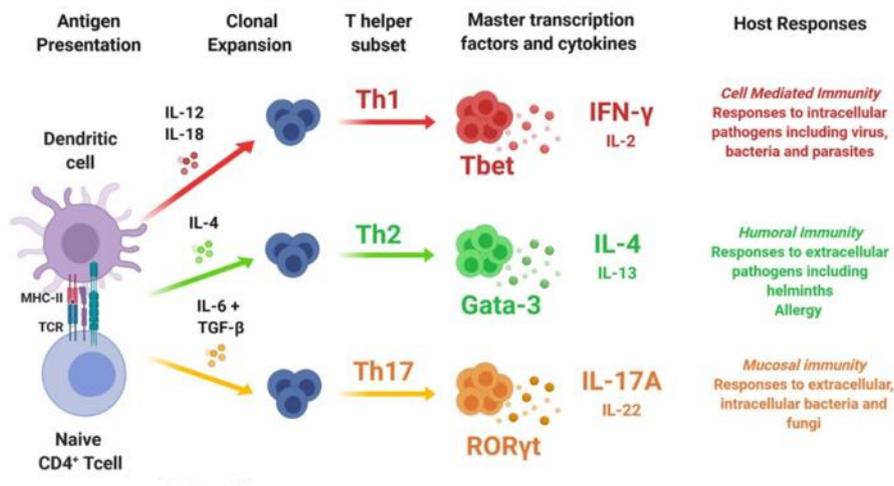


Figure 11 : Les principales populations lymphocytaires T auxiliaires et leurs fonctions respectives. Après activation d'un lymphocyte T naïf par une cellule présentatrice de l'antigène, l'environnement cytokinique va induire son expansion clonale et sa différenciation vers une des sous-populations de lymphocytes Th. Chacune de ces sous-populations présente des profils d'expression cytokinique ainsi qu'une fonction qui lui sont propres. Figure adaptée de Corripio-Miyar *et al.*, 2022.

Des premières observations de l'aggravation des symptômes chez des patients traités par l'IFN γ ont permis de soulever l'idée d'une implication toute particulière des lymphocytes Th1 dans la physiopathologie de la SEP (Panitch *et al.*, 1987). Ces premières observations ont été par la suite corroborées par la démonstration que l'injection de Th1 stimulés par le peptide MOG₃₅₋₅₅ dans des souris naïves suffisait à leur provoquer une EAE (Yura *et al.*, 2001).

Cependant, d'autres études sont venues mettre à mal l'hypothèse selon laquelle la pathologie ne serait médiée que par l'intermédiaire de ces lymphocytes Th1. En effet, Lublin et ses collaborateurs ont pu mettre en évidence en 1993 que l'injection d'anticorps neutralisant l'IFN γ provoquait l'effet inverse que celui escompté, à savoir une augmentation de la sévérité de l'EAE. D'autres études ont par ailleurs permis d'obtenir les mêmes conclusions, en utilisant notamment des souris déficientes en IFN γ ou son récepteur (Ferber *et al.*, 1996 ; Willenborg *et al.*, 1996). Des auteurs se sont par la suite intéressés à l'implication des Th17 dans la SEP. Tout comme ce qui avait été montré concernant les Th1, le transfert adoptif de Th17 spécifiquement dirigés contre des peptides de la gaine de myéline suffisait à induire des EAE chez des souris naïves (Langrish *et al.*, 2005 ; Kroenke *et al.*, 2008).

Aujourd'hui, le rôle conjoint des lymphocytes Th1 et Th17 dans la SEP et dans ses modèles animaux est bien établi. Notamment, il a été montré que le ratio Th17:Th1 détermine la localisation de l'inflammation au sein du SNC. En effet, l'infiltration leucocytaire et l'inflammation semble davantage toucher le parenchyme cérébral lorsque les lymphocytes Th17 sont plus représentés que les Th1. Inversement, la sur-représentation des Th1 semble favoriser l'inflammation de la moelle épinière (Stromnes *et al.*, 2008).

Les lymphocytes T CD8⁺ effecteurs (Tc) :

Les lymphocytes Tc ont été identifiés dès les années 1980s comme étant la population lymphocytaire la plus abondante dans les lésions parenchymateuses chez des patients atteints de SEP (Hauser *et al.*, 1986). Ces lymphocytes Tc sont détectés y compris de manière très précoce dans les lésions corticales (Lucchinetti *et al.*, 2011). De plus, un enrichissement en lymphocytes Tc sécrétant d'IL-17 (ainsi qualifiés de Tc17) a été décrit spécifiquement dans les lésions actives de SEP (Tzartos *et al.*, 2008).

Tel qu'évoqué précédemment, l'activation des lymphocytes Tc se fait par la reconnaissance du CMH-I par le TCR exprimé à sa surface. Cependant, une telle molécule de CMH-I est indétectable dans la majorité des cellules du système nerveux, ou très peu exprimée (à la surface des cellules microgliales par exemple). Cependant, dans certaines conditions inflammatoires telles que celles retrouvées dans la SEP, son expression peut se trouver être augmentée dans les neurones, les oligodendrocytes et les astrocytes (Höftberger *et al.*, 2004). Ainsi, les lymphocytes Tc pourraient être en mesure d'induire directement la mort de ces cellules et être à l'origine de la démyélinisation et des dommages axonaux observés. Cette idée est étayée par le fait que des lymphocytes Tc aient été détectés en contact rapproché avec des oligodendrocytes et des axones démyélinisés au niveau de lésions chez des patients atteints de SEP (Neunmann *et al.*, 2002). De plus, le nombre de ces lymphocytes Tc dans les lésions est positivement corrélé à l'extension des dommages axonaux (Kuhlmann *et al.*, 2002).

Ainsi, l'ensemble des données présentées ci-dessus vont dans le sens non pas d'une action individuelle de chacune de ces catégories lymphocytaires (Th et Tc) mais d'une action concertée entre ces types cellulaires conduisant à la démyélinisation et aux dommages axonaux observés dans la SEP et dans ses modèles animaux.

1.3.1.1.2. Les lymphocytes T régulateurs.

Les lymphocytes T régulateurs présentent la capacité de réguler les fonctions de divers types cellulaires de l'immunité tels que les lymphocytes T CD4⁺ (Th), les lymphocytes T CD8⁺ (Tc) et les cellules présentatrices de l'antigène (macrophages, monocytes et cellules dendritiques ; Lowther et Hafler, 2012). Ils sont à ce titre indispensables au maintien d'une tolérance immunitaire. De telles sous-populations régulatrices ont été identifiées à la fois au sein des lymphocytes Th et des lymphocytes Tc (Jadidi-Niaragh et Mirshafiey, 2011).

Les lymphocytes T régulateurs les plus étudiés dans la SEP sont ceux appartenant à la famille des lymphocytes Th. Parmi ces lymphocytes T régulateurs, on retrouve notamment les lymphocytes T

exprimant le facteur de transcription FoxP3 (Treg) et les lymphocytes T sécrétant l'IL-10 et le TGF- β (Tr1 ; Kleinewietfeld et Hafler, 2014).

Les études dans l'EAE ont mis en évidence le rôle de ses populations régulatrices dans le développement et la sévérité de la maladie. Par exemple, le transfert adoptif de lymphocytes Treg (exprimant FoxP3) dans des souris EAE était suffisant pour prévenir toute survenue de symptômes cliniques (Kohm *et al.*, 2002). Inversement, leur déplétion est en mesure d'induire une EAE à des souches murines qui y sont naturellement résistantes (Reddy *et al.*, 2004). D'autres études ont montré qu'une telle déplétion n'avait aucune influence sur la première phase de rémission dans l'EAE-PLP mais empêchait les rémissions suivantes (Gärtner *et al.*, 2006). De façon similaire, l'injection de lymphocytes T sécrétant d'IL-10 (Tr1) à des souris EAE prévient l'apparition des symptômes de celle-ci (Barrat *et al.*, 2002). Enfin, bien qu'aucune différence dans les proportions de lymphocytes Treg et Tr1 n'ait été observée dans le sang périphérique entre des patients atteints de SEP et des sujets contrôles, ces populations régulatrices montrent une diminution de leurs fonctions immunosuppressives chez les patients (Viglietta *et al.*, 2004).

Bien que beaucoup moins étudiés que les lymphocytes Th régulateurs, des sous-populations de lymphocytes Tc présentant des propriétés régulatrices ont été mis en évidence. Une altération de la fonction de ces lymphocytes Tc régulateurs a été observée, dès les années 1980s, chez des patients atteints de SEP comparativement à des sujets contrôles (Antel *et al.*, 1986). Il a plus tardivement été montré que de tels lymphocytes Tc régulateurs étaient en mesure d'induire la mort de lymphocytes Th spécifiquement dirigés contre certaines protéines constitutives de la gaine de myéline (Correale et Villa, 2008). Des données similaires chez l'animal ont montré que ces lymphocytes Tc régulateurs étaient capables d'inhiber les lymphocytes Th auto-réactifs et ainsi d'atténuer la sévérité de l'EAE (Lu *et al.*, 2008). Cette sous-population de lymphocytes Tc est en outre capable d'inhiber la prolifération de ces mêmes lymphocytes Th auto-réactifs. Une réduction de cette inhibition a par ailleurs été observée chez des patients atteints de SEP en phase active de la maladie en comparaison avec des patients en phase non-active de la pathologie et des sujets contrôles (Baughman *et al.*, 2011).

Les données présentées ci-dessus vont ainsi dans le sens, outre la présence et la prolifération anormale de lymphocytes Th et Tc auto-réactifs, d'une diminution de leur régulation par les populations lymphocytaires régulatrices dans la SEP et ses modèles animaux.

1.3.1.2. Les lymphocytes B.

A l'instar des lymphocytes T, les lymphocytes B peuvent être subdivisés en deux grandes catégories : les lymphocytes B effecteurs et les lymphocytes B régulateurs (Figure 12).

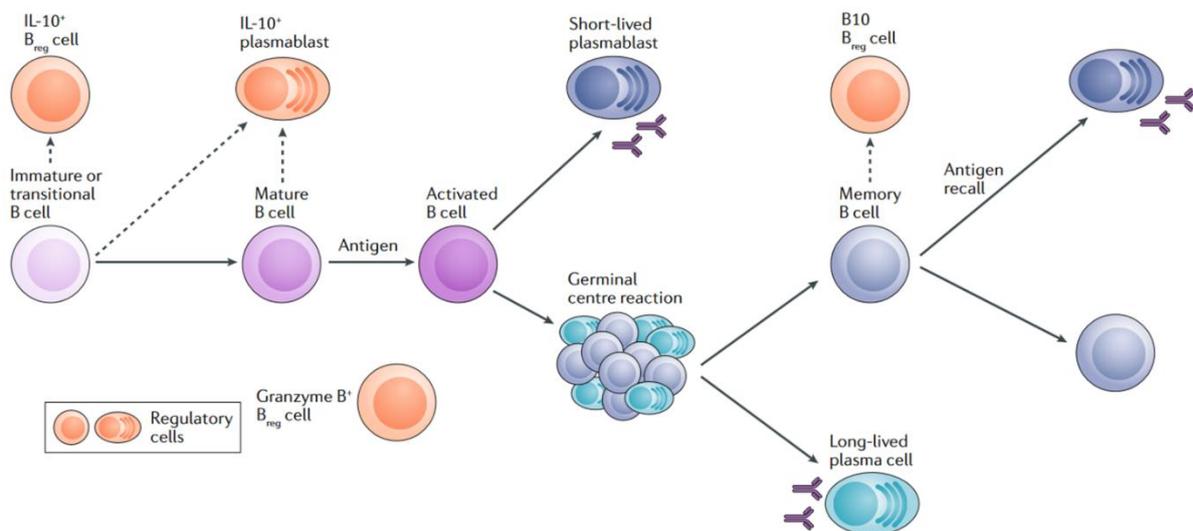


Figure 12 : Les voies de différenciation des différentes sous-populations de lymphocytes B. Des cellules B immatures de la moelle osseuse migrent vers la rate où elles deviennent matures. Après activation par un antigène, les lymphocytes B matures se différencient en plasmocytes à demi-vie courte sécrétors d'immunoglobulines, ou entrent dans la réaction des centres germinatifs qui permet notamment la maturation de leur affinité. Certains lymphocytes B entrèrent dans le réservoir de lymphocytes B mémoires ou de plasmocytes à longue demi-vie. Après une seconde rencontre avec l'antigène, les cellules B mémoires pourront se différencier en plasmocytes sécrétors d'immunoglobulines ou proliféreront pour donner d'autres lymphocytes B mémoires. Les lymphocytes B régulateurs producteurs d'IL-10 (B_{reg}) proviennent majoritairement des lymphocytes B immatures et mémoires. De plus, les lymphocytes B immatures et matures peuvent se différencier en plasmocytes sécrétors d'IL-10. Les précurseurs des cellules B_{reg} productrices de granzymes restent à identifier. Figure adaptée de Oleinika *et al.*, 2019.

Les lymphocytes B effecteurs peuvent eux-mêmes être divisés en deux catégories (Cencioni *et al.*, 2021) :

- Les lymphocytes B sécrétors d'immunoglobulines à savoir les plasmablastes (précurseur des plasmocytes) et les plasmocytes (dernier stade de différenciation des lymphocytes B activés),
- Les lymphocytes B mémoires qui interviennent dans le développement de la réponse immunitaire adaptative en jouant le rôle d'APC, et qui participent ainsi à la différenciation des lymphocytes T effecteurs en Th1 et Th2 notamment (Zouali, 2008). Ceux-ci présentent de plus

la capacité de sécréter diverses cytokines telles que l'IL-6, le facteur de nécrose tumorale- α (TNF α pour « Tumor Necrosis Factor- α »), la lymphotoxine- α (LT α) ainsi que le facteur stimulant les colonies de granulocytes et de macrophages (GM-CSF pour « Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor ») participant à l'activation des lymphocytes T et des cellules de l'immunité innée.

Les lymphocytes B régulateurs (Breg) sont quant à eux capables de réguler la réponse immunitaire par l'intermédiaire d'une sécrétion de cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL-10, l'IL-35, le facteur de croissance transformant- β (TGF- β pour « Transforming Growth Factor- β ») et le granzyme B (Rosser et Mauri, 2015).

L'idée d'une implication des lymphocytes B dans la physiopathologie de la SEP est supportée par la présence de bandes oligoclonales dans le liquide céphalorachidien (LCR) chez plus de 95% des patients atteints de SEP (Link et Huang, 2006). De plus, l'existence de telles bandes oligoclonales chez les patients présentant un syndrome cliniquement isolé est associé à un risque plus élevé de conversion en SEP (Dobson *et al.*, 2013). Par ailleurs, des lymphocytes B sont détectés dans le parenchyme cérébral, les méninges et le LCR de patients atteints de SEP (Lovato *et al.*, 2011).

Des anomalies des populations lymphocytaires B effectrices ont en outre pu être mises en évidence dans la SEP et dans ses modèles animaux. Par exemple, des modifications dans les sécrétions de cytokines par les lymphocytes B naïfs et mémoires ont pu être mis en évidence chez des patients atteints de SEP. En effet, de tels lymphocytes activés montrent une augmentation de leur sécrétion de TNF α , LT α , IL-6 et GM-CSF (Duddy *et al.*, 2007 ; Bar-Or *et al.*, 2010 ; Li *et al.*, 2015). De plus, des lymphocytes B issus de patients atteints de SEP sont en mesure d'induire *in vitro* la mort des oligodendrocytes et des neurones (Lisak *et al.*, 2012 ; Lisak *et al.*, 2017). Enfin, les lymphocytes B mémoires sont en partie responsables de la prolifération des lymphocytes T auto-réactifs chez les patients atteints de SEP du fait que leur déplétion entraîne une diminution de cette prolifération (Jelicic *et al.*, 2018).

A l'instar des anomalies des populations lymphocytaires B effectrices, des observations similaires dans les populations B régulatrices ont été rapportées dans la SEP par de nombreux travaux. En effet, des animaux déficients en lymphocytes B sécrétant de TGF- β montrent une augmentation des réponses Th1 et Th17 au niveau du SNC conduisant à une plus grande susceptibilité à l'EAE (Bjarnadóttir *et al.*, 2016). De plus, des lymphocytes B issus de patients atteints de SEP montrent une plus faible production d'IL-10 lorsqu'ils sont stimulés par le CD40L comparés aux sujets contrôles (Okada *et al.*, 2018). Enfin, ces mêmes lymphocytes B sécrétant d'IL-10 se trouvent être moins nombreux chez les patients SEP pendant les poussées par rapport aux périodes de rémission de la pathologie (Knippenberg *et al.*, 2011).

Ainsi, les lymphocytes B sont impliqués dans la physiopathologie de la SEP non seulement par l'intermédiaire de leurs sécrétions d'immunoglobulines, mais également *via* leur coopération avec les autres médiateurs de l'immunité et une diminution de leur pouvoir régulateur sur ceux-ci.

I.3.2. Les cellules de l'immunité innée impliquées dans la SEP.

I.3.2.1. Les cellules dendritiques.

Les cellules dendritiques (DC pour « Dendritic Cells ») sont des APC professionnelles dont le rôle principal est d'induire l'activation et la différenciation des lymphocytes T naïfs (Figure 13).

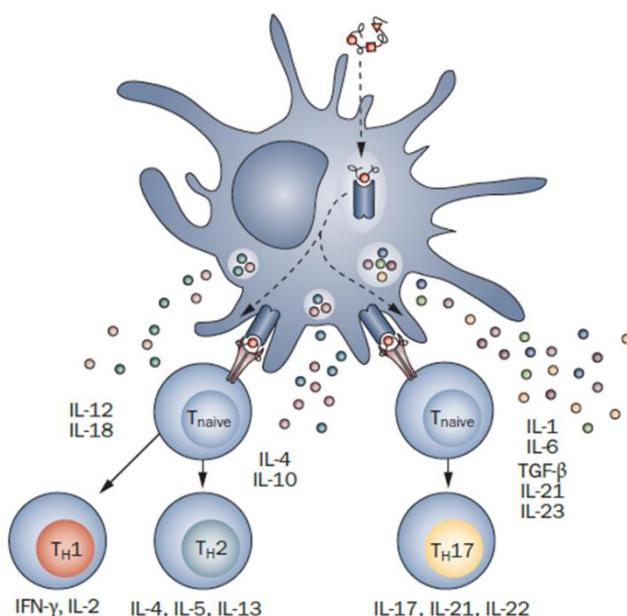


Figure 13 : Stimulation de lymphocytes T naïfs par les cellules dendritiques. La présentation d'un antigène par une cellule dendritique à un lymphocyte T naïf permet sa différenciation vers l'une des diverses sous-populations de lymphocytes Th (Th1, Th2, Th17). Les cellules dendritiques sont également capables d'activer d'autres cellules de l'immunité innée pouvant participer à la différenciation des sous-populations de lymphocytes Th. Figure adaptée de Comabella *et al.*, 2010.

Dans l'EAE, une accumulation de ces DC est observée dans le SNC des animaux. Celles-ci promeuvent la différenciation des lymphocytes T naïfs en lymphocytes Th17 spécifiquement. (Bailey *et al.*, 2007). Chez les patients atteints de SEP, des DC issues de la circulation périphérique montrent une augmentation de l'expression de la protéine CD40, reflet de leur activation, à la fois chez les patients RR- et SP-SEP. Cependant, les patients SP-SEP se distinguent des patients RR-SEP dans le sens où leurs DC présentent une diminution de l'expression du ligand de mort programmée-1 (PDL-1 pour « Programmed Cell Death-1 »), une molécule jouant un rôle majeur dans la tolérance immunitaire, et une augmentation de leur production d'IL-12 et de TNF α . De plus, les DC issues de patients RR-SEP induisent des réponses de type Th1 et Th2 du fait d'une augmentation de la sécrétion d'IL-4, IL-13, IFN γ et TNF α tandis que celles issues des patients SP-SEP se limitent à induire une réponse de type Th1 (Karni *et al.*, 2006).

Ainsi, les DC jouent un rôle important dans l'induction d'une réponse immunitaire pro-inflammatoire médiée par les lymphocytes T dans la SEP et pourraient, au moins en partie, constituer un des facteurs favorisant la conversion vers une forme SP-SEP.

1.3.2.2. Les mastocytes.

Les mastocytes sont des cellules impliquées dans les réactions allergiques du fait de leur capacité à synthétiser et sécréter de l'histamine. Cependant, ils présentent un rôle dans l'activation et la différenciation des lymphocytes T naïfs en Th1, Th2 ou Th17. En effet, les mastocytes expriment des cytokines capables de promouvoir de façon directe leur différenciation en Th1 (IL-12) ou en Th17 (IL-6 et TGF- β) ou indirectement, via l'activation des DC par l'IL-4, en Th2 (Christy and Brown, 2007). De plus, les mastocytes sont doués de phagocytose et peuvent ainsi intervenir dans la destruction de la gaine de myéline, à l'instar des macrophages et de la microglie dont il sera sujet dans la prochaine partie (Medic *et al.*, 2008).

Des études chez l'animal ont montré que des animaux déficients en mastocytes présentaient une EAE moins sévère avec une incidence de déclaration plus faible et une diminution de la réponse des lymphocytes T auto-réactifs (Secor *et al.*, 2000 ; Gregory *et al.*, 2005). Cependant, d'autres études ont

montré que des souris déficientes en mastocytes présentaient la même susceptibilité à l'EAE que des souris contrôles (Bennett *et al.*, 2009).

Chez les patients atteints de SEP, des accumulations de mastocytes au niveau des plaques, mais également au niveau de la matière blanche « saine », ont été mises en évidence (Toms *et al.*, 1990). De plus, des taux plus élevés de tryptase, une enzyme spécifique des mastocytes, ont été observés dans le LCR de patients atteints de SEP (Rozniecki *et al.*, 1995). Cette enzyme, ainsi que l'histamine et d'autres cytokines sécrétées par les mastocytes telles que l'IL-1, l'IL-16 ou le TNF α participent à l'ouverture de la barrière hématoencéphalique (BHE ; voir partie [II.3.4.](#) ; Sospedra et Martin, 2005).

1.3.2.3. Les phagocytes mononucléés : Macrophages et cellules microgliales.

Les phagocytes mononucléés tels que les macrophages et les cellules microgliales constituent la population immunitaire la plus abondante au niveau des lésions centrales des patients atteints de SEP. Ceux-ci peuvent moduler la réponse immunitaire adaptative *via* leur interaction avec les cellules la constituant (lymphocytes B et T) mais sont également directement impliqués dans la démyélinisation et les dommages axonaux. Les phagocytes sont également responsables de la clairance des débris de myéline (Hemmer *et al.*, 2015). De plus, leur quantité au sein d'une lésion est positivement corrélée à la progression des dommages axonaux (Bitsch *et al.*, 2000). Ces phagocytes sont en outre en mesure de produire des espèces réactives de l'oxygène (ROS) capables d'induire la démyélinisation et les dommages axonaux observés chez les patients atteints de SEP (Fischer *et al.*, 2012). L'implication de ces cellules dans la démyélinisation et les dommages axonaux est corroborée par des études dans l'EAE montrant que leur présence induit une dégénérescence axonale et que l'inhibition de leur activation ou l'inhibition de la libération de ROS diminue les dommages axonaux observés (Nikić *et al.*, 2011).

Inversement, des études sur l'animal utilisant le modèle de démyélinisation par injection de lysolécithine ont montré qu'un certain phénotype de phagocyte immunorégulateur était impliqué dans les mécanismes de remyélinisation en promouvant la différenciation des précurseurs d'oligodendrocytes en oligodendrocytes matures (Miron *et al.*, 2013).

Cette dualité entre effets pro-dégénératifs et effets pro-remyélinisants des phagocytes semble être liée à leur origine même. En effet, les phagocytes dérivés de monocytes seraient à l'origine de la démyélinisation tandis que ceux dérivés de cellules microgliales seraient en mesure de promouvoir la remyélinisation par l'intermédiaire de la clairance des débris de myéline (Yamasaki *et al.*, 2014).

1.3.2.4. Les neutrophiles.

Les neutrophiles constituent la population cellulaire la plus abondante des leucocytes circulants chez l'humain (Opdenakker *et al.*, 1998). Cependant, ils ont pendant longtemps été mis de côté dans l'étude de la SEP notamment en raison de leur faible demi-vie, rendant de ce fait leur étude plus complexe. Bien qu'ils ne soient pas retrouvés abondamment dans le SNC des patients atteints de SEP, des études chez l'animal suggèrent qu'ils pourraient bel et bien être impliqués dans sa physiopathologie (De Bondt *et al.*, 2020). Par exemple, ceux-ci s'accumulent au niveau des méninges de souris EAE dès 24 heures après l'induction du modèle, et leur nombre augmente encore par la suite pendant les phases pré-symptomatiques et au maximum de la maladie (Christy *et al.*, 2013). De plus, la déplétion sélective des neutrophiles retarde voire abolit l'apparition des symptômes moteurs dans l'EAE (McColl *et al.*, 1998).

Les mécanismes d'action des neutrophiles dans la physiopathologie de la SEP peuvent être multiples. Tous d'abord, ils présentent des capacités de phagocytose. Ainsi, certains auteurs émettent l'hypothèse qu'ils pourraient agir de manière conjointe avec les macrophages et les cellules microgliales dans la clairance des débris de myéline (Yamasaki *et al.*, 2014). De plus, les neutrophiles sécrètent de nombreux médiateurs de l'immunité. Par exemple, il a été montré dans l'EAE qu'ils étaient en mesure de sécréter le propeptide de l'IL-1 β (pro-IL-1 β) et que l'activation de récepteurs à l'IL-1 exprimé à la surface des cellules endothéliales entraînait une EAE plus sévère (Paré *et al.*, 2017). Les neutrophiles sont en outre impliqués dans la rupture de la BHE. En effet, l'apparition de neutrophiles dans le SNC est concomitante à l'ouverture de la BHE et, inversement, leur déplétion augmente son intégrité dans l'EAE. De plus, leur présence a été observée dans des lésions actives de SEP dans lesquelles la BHE est altérée (Aubé *et al.*, 2014). La rupture de la BHE par les neutrophiles pourrait également être médiée par la sécrétion de divers médiateurs dont la myéloperoxydase. En effet, l'utilisation d'un inhibiteur de cette enzyme dans l'EAE entraîne une diminution de l'infiltration des leucocytes et une diminution de la sévérité de la

maladie, en lien avec une augmentation de l'intégrité de la BHE (Yu *et al.*, 2018). Enfin, les neutrophiles semblent intervenir dans la maturation des monocytes, des cellules microgliales et des DC, augmentant ainsi leur capacité de présentation des auto-antigènes aux lymphocytes T auto-réactifs. De plus, leur déplétion sélective perturbe la maturation des APC et le recrutement des DC au sein du SNC (Steinbach *et al.*, 2013).

Ainsi, nos connaissances sur la physiopathologie de la SEP se sont grandement enrichies au cours des deux dernières décennies. Cependant, bien que de nombreux facteurs de risques aient été identifiés, l'origine de la pathologie, s'il en est une unique, reste encore aujourd'hui largement à découvrir. L'objet de la partie suivante sera alors de présenter les différentes hypothèses soulevées à ce jour quant à l'origine de la maladie ainsi que les différents facteurs de risque identifiés.

I.4. Etiologie et facteurs de risques de la SEP.

I.4.1. Quelle origine pour la SEP ?

Bien que l'origine de la pathologie n'ait pas encore été totalement élucidée, deux hypothèses concernant l'origine de l'auto-immunité coexistent. Elles se distinguent notamment par la spatialité et la temporalité des événements conduisant à l'apparition des lésions centrales. Nous allons présenter ici ces deux hypothèses :

- Le modèle intrinsèque (modèle « Inside-Out ») :

Le modèle intrinsèque postule qu'un premier événement au sein du SNC entraîne par la suite le recrutement des cellules de l'immunité innée et adaptative à l'origine d'une réaction immunitaire secondaire (Figure 14 ; Henderson *et al.*, 2009). Cette hypothèse veut qu'une dégénérescence spontanée d'oligodendrocytes survienne, libérant des produits de dégradation (antigènes spécifiques de la myéline notamment) en mesure d'activer les cellules microgliales résidentes. Ceci est en accord avec une étude de Barnett et Prineas selon laquelle une perte d'oligodendrocytes ainsi qu'une activation des cellules microgliales étaient observées dans des lésions nouvellement formées en l'absence d'infiltration

significative de lymphocytes ou de phagocytes (Barnett et Prineas, 2004). Les antigènes issus de cette dégradation primaire d'oligodendrocytes rejoignent ensuite, par des mécanismes encore non totalement élucidés, les ganglions lymphatiques cervicaux où ils activent la réponse immunitaire adaptative secondaire. Cependant, l'origine de cette dégradation primaire des oligodendrocytes n'est pas connue, fragilisant ainsi cette hypothèse (Hemmer *et al.*, 2015).

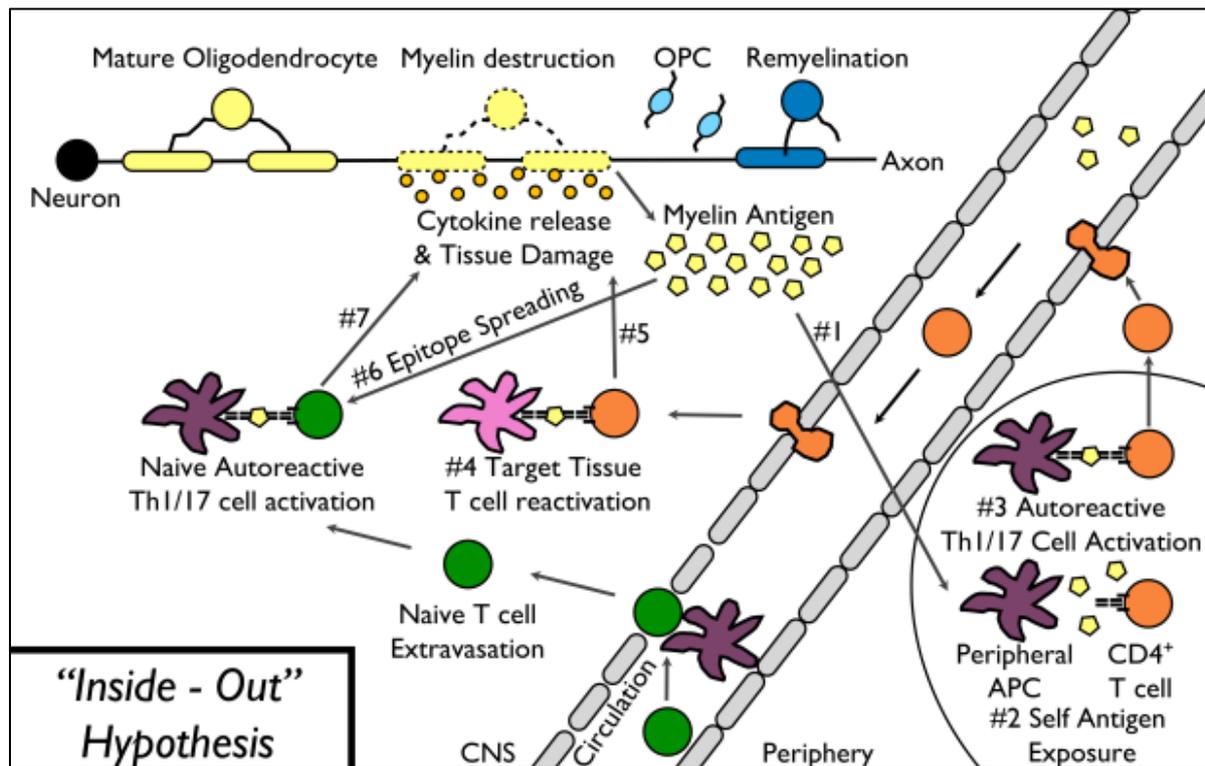


Figure 14 : Le modèle intrinsèque de la physiopathologie de la SEP (« Inside-Out »). Le modèle intrinsèque débute avec une dégénérescence d'oligodendrocytes qui conduit à la libération d'antigènes de la myéline hors du système nerveux central (1) suivie de leur présentation par des APC (2) à des lymphocytes T auto-réactifs provoquant leur activation et leur polarisation en lymphocytes Th1 et Th17 (3). Les lymphocytes T auto-réactifs vont ensuite migrer à travers la BHE vers le parenchyme cérébral où ils seront réactivés par les APC résidentes du SNC (4) puis vont sécréter des cytokines pro-inflammatoires à l'origine de dommages directs ou indirects causés à la gaine de myéline, notamment par l'intermédiaire des phagocytes et des lymphocytes B (5). La production de nouveaux épitopes par la destruction de la gaine de myéline peut induire l'activation de nouveaux lymphocytes T auto-réactifs spécifiques de ces épitopes (« epitope spreading ») (6) participant à l'expansion de la démyélinisation (7). APC : Cellule présentatrice de l'antigène ; BHE : Barrière Hémato-Encéphalique ; CNS : Système Nerveux Central ; OPC : Cellules progénitrices d'oligodendrocytes. Source : Titus *et al.*, 2020.

- Le modèle extrinsèque (modèle « Outside-In ») :

Le modèle extrinsèque postule quant à lui que la réponse auto-immune spécifique d'un antigène du SNC débute en périphérie avant d'être transféré au SNC jusqu'alors non affecté (Figure 15). L'activation des lymphocytes T auto-réactifs dans les organes périphériques tels que les poumons ou la muqueuse

intestinale pourrait être une conséquence d'une réactivité croisée ou d'un mimétisme moléculaire avec des antigènes d'autres agents infectieux (Olson *et al.*, 2001 ; Harkiolaki *et al.*, 2009). Après leur migration vers les ganglions lymphatiques, ces lymphocytes T auto-réactifs ainsi que des lymphocytes B vont rejoindre le SNC (Henderson *et al.*, 2009) où ils seront en mesure, par l'intermédiaire de la sécrétion de divers médiateurs inflammatoires, d'induire le recrutement de monocytes et d'autres lymphocytes, notamment par le biais de l'ouverture de la BHE, conduisant au développement des lésions démyélinisantes (Hemmer *et al.*, 2015).

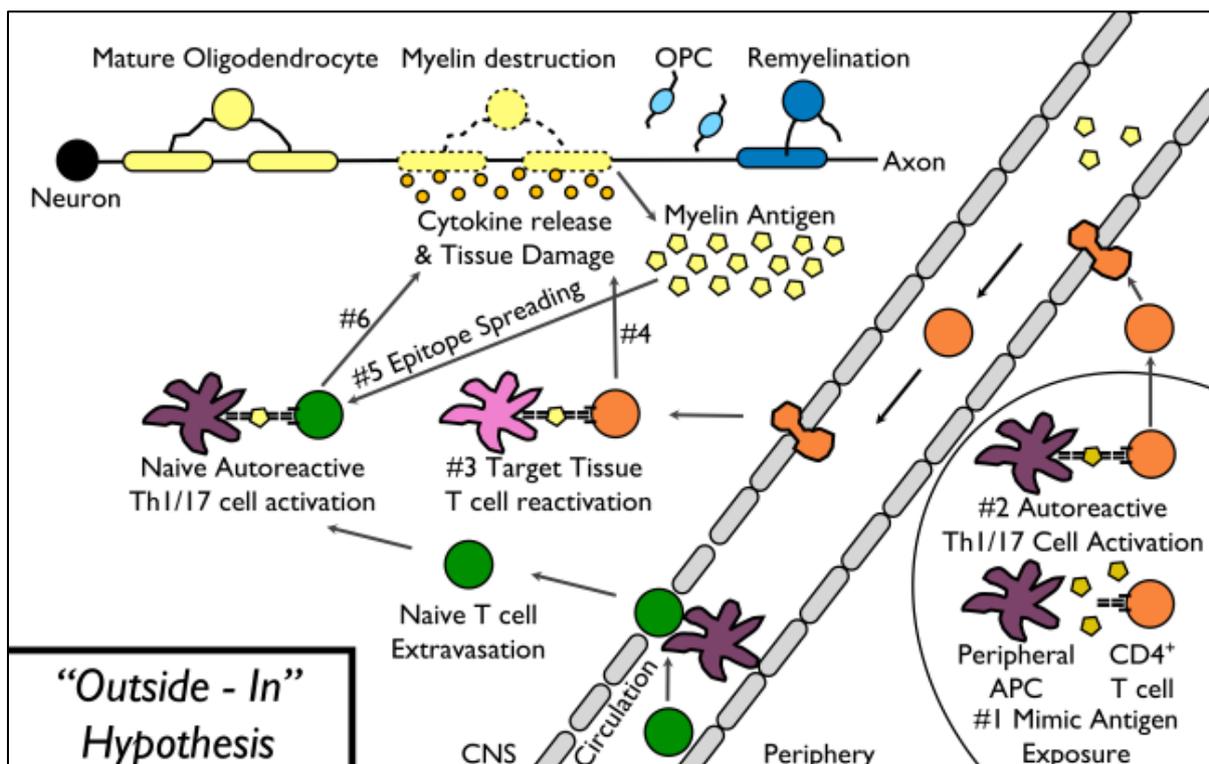


Figure 15 : Le modèle extrinsèque de la physiopathologie de la SEP (« Outside-In »). Le modèle extrinsèque débute avec une activation de lymphocytes T auto-réactifs dirigés contre des antigènes de myéline à la suite de la reconnaissance d'un peptide mimétique à la surface d'un organisme pathogène (1-2). Les lymphocytes T auto-réactifs ainsi activés se différencient en Th1 et Th17 puis migrent vers le parenchyme cérébral à travers la BHE où ils seront réactivés par des APC résidentes du SNC (3), puis vont sécréter des cytokines pro-inflammatoires à l'origine de dommages directs ou indirects causés à la gaine de myéline, notamment par l'intermédiaire des phagocytes et des lymphocytes B (4). La production de nouveaux épitopes par la destruction de la gaine de myéline peut induire l'activation de nouveaux lymphocytes T auto-réactifs spécifiques de ces épitopes (« epitope spreading ») (5) participant à l'expansion de la démyélinisation (6). APC : Cellule présentatrice de l'antigène ; BHE : Barrière Hémato-Encéphalique ; CNS : Système Nerveux central ; OPC : Cellules progénitrices d'oligodendrocytes. Source : Titus *et al.*, 2020.

Ainsi, la cinétique de l'installation de la réponse auto-immune reste encore aujourd'hui débattue. Cependant, certains auteurs émettent l'idée que, devant la grande hétérogénéité de la SEP, une combinaison de ces deux hypothèses pourrait permettre de mieux comprendre les origines et les formes

multiples de la pathologie (Titus *et al.*, 2020). Cependant, quelle que soit l'origine intrinsèque ou extrinsèque des lésions centrales, de nombreux facteurs de risques de déclenchement de la pathologie ont été identifiés. Nous nous proposons à présent d'en exposer les principaux.

I.4.2. Facteurs de risques de développement d'une SEP.

I.4.2.1. Prédispositions génétiques.

Les premiers arguments en faveur de l'existence de prédispositions génétiques dans le déclenchement de la SEP repose sur des études de la prévalence de la maladie chez des familles dont au moins un individu est atteint de la pathologie. Par exemple, les membres au premier degré d'une famille présentant un individu atteint de la SEP présentent un risque de 3% de développer une SEP au cours de leur vie (5% pour les frères et sœurs, 2% pour les parents et 2% pour les enfants) en comparaison avec un risque estimé de 0.1% dans la population générale (Compston et Coles, 2008). Ces susceptibilités génétiques sont notamment portées par des variabilités alléliques codant pour le CMH (ou HLA pour « Human Leucocyte Antigen »). Une association entre le sérotype HLA-DR2 et la SEP a été mise en évidence dès les années 1970s (Jersild *et al.*, 1972). D'autres études sont venues par la suite confirmer l'implication de ce sérotype. Par exemple, les porteurs de l'allèle HLA DRB1*15:01 présentent trois fois plus de risque de développer une SEP que les individus non porteurs de cet allèle (Patsopoulos *et al.*, 2013). Des études d'associations pangénomiques ont par ailleurs permis de mettre en évidence plus de 200 variants génétiques prédisposant à la SEP (IMSGC, 2019), dont nombre d'entre eux sont impliqués dans les réponses immunitaires.

Néanmoins, les prédispositions génétiques ne peuvent expliquer qu'environ 30% des risques de développer une SEP (IMSGC, WTCCC2 et IIBDGC, 2013). En effet, des études réalisées chez des jumeaux ont montré que des jumeaux monozygotes, qui partagent par conséquent un patrimoine génétique identique, ne présentent qu'un risque autour de 30% de développer la maladie si l'un d'eux est déjà atteint (Compston et Coles, 2008). Ainsi, d'autres facteurs, en particulier environnementaux, œuvreraient de concert avec les prédispositions génétiques dans le développement de la maladie.

1.4.2.2. Les facteurs environnementaux.

De nombreux facteurs environnementaux ont montré un impact dans le développement de la SEP. Nous détaillerons les plus documentés d'entre eux.

1.4.2.2.1. Infection par le virus Epstein-Barr (EBV).

Plusieurs agents infectieux ont été suspectés de jouer un rôle dans le développement de la pathologie. Cette idée est confortée par les deux hypothèses soulevées précédemment quant à l'origine de la pathologie, à savoir une activation par mimétisme moléculaire de lymphocytes T périphériques ou une infection virale centrale à l'origine d'une dégénérescence d'oligodendrocytes. L'infection par l'EBV est depuis longtemps suspectée comme un déclencheur probable de la pathologie. En effet, des études ont montré une augmentation de la quantité d'anticorps dirigés contre l'EBV chez des patients atteints de SEP (Ascherio *et al.*, 2001). De plus, des individus affichant des antécédents de mononucléose infectieuse avec manifestations cliniques présentent deux fois plus de risques de développer la pathologie (Handel *et al.*, 2010). D'autres études ont montré une séropositivité à l'EBV dans environ 99.5% des patients SEP contre environ 94% des sujets contrôles (Ascherio et Munger, 2007). De plus, l'association entre la présence du variant génétique HLA-DRB1*15 et une séropositivité à l'EBV est associée à un risque 16 fois plus élevé de développer une SEP (Sundqvist *et al.*, 2012). Enfin, une étude récente propose qu'une infection par l'EBV augmente d'un facteur 32 le risque de développement de la maladie (Bjornevik *et al.*, 2022). En effet, dans cette étude, les auteurs ont montré que, parmi les 35 patients atteints de SEP initialement séronégatifs à l'EBV (sur un total de 801 patients), 34 avaient été infectés par l'EBV avant le début de la pathologie. Cette nouvelle étude conforte ainsi l'implication de l'EBV comme déclencheur potentiel de la SEP. Les mécanismes d'action d'une telle infection à l'EBV dans la physiopathologie de la SEP restent cependant largement à découvrir. Néanmoins, il semblerait que ceux-ci impliquent notamment les lymphocytes B. En effet, une plus grande proportion de lymphocytes B infectés par l'EBV a été observée dans le cerveau de patients atteints de SEP par rapport à des sujets contrôles (Moreno *et al.*, 2018). L'EBV pourrait ainsi induire une transformation des lymphocytes B conduisant à l'expansion clonale de populations auto-réactives *via* l'expression de deux protéines virales, LMP1 et LMP2A (pour « Latent Membrane Protein 1 » ou « 2A »), mimant

respectivement le marqueur CD40, responsable de la costimulation entre lymphocytes B et T, et le BCR exprimé à la surface des lymphocytes B (Kang et Kieff, 2015). L'implication de l'EBV dans le déclenchement de la SEP pourrait également être médiée par des lymphocytes Tc. En effet, la présence de lymphocytes Tc spécifiques de l'EBV dans le cerveau de patients atteints de SEP appuie l'idée qu'une infection par ce virus pourrait stimuler la réponse lymphocytaire Tc et promouvoir les dommages centraux observés dans la SEP (Serafini *et al.*, 2019). Enfin, l'infection par l'EBV pourrait engendrer la réponse auto-immune par mimétisme moléculaire qui veut que certaines des protéines virales imitent des protéines constitutives de la gaine de myéline (Alfredsson et Olsson, 2019.)

Bien que le risque de développer une SEP à la suite d'une infection par l'EBV présenté par Bjornevik et ses collaborateurs soit très élevé, une telle infection ne peut expliquer seule les risques de développement de la pathologie. Par exemple, il a été montré qu'une telle infection par l'EBV était certes associée à une augmentation du risque de développer une SEP si l'infection avait eu lieu pendant l'adolescence ou plus tard, mais n'augmentait pas ce risque si l'infection avait eu lieu pendant l'enfance (Ascherio et Munger, 2015).

1.4.2.2.2. Exposition au soleil / carences en vitamine D.

L'implication de l'ensoleillement et d'une carence en vitamine D dans la physiopathologie de la SEP est appuyée par l'observation d'un gradient géographique concernant la prévalence de la maladie (Figure 16 ; Simpson *et al.*, 2011). En effet, les régions du monde situées les plus au nord semblent présenter une prévalence plus importante que les régions situées plus au sud. Un tel gradient géographique est également retrouvé à l'échelle de la France (Ha-Vinh *et al.*, 2016).

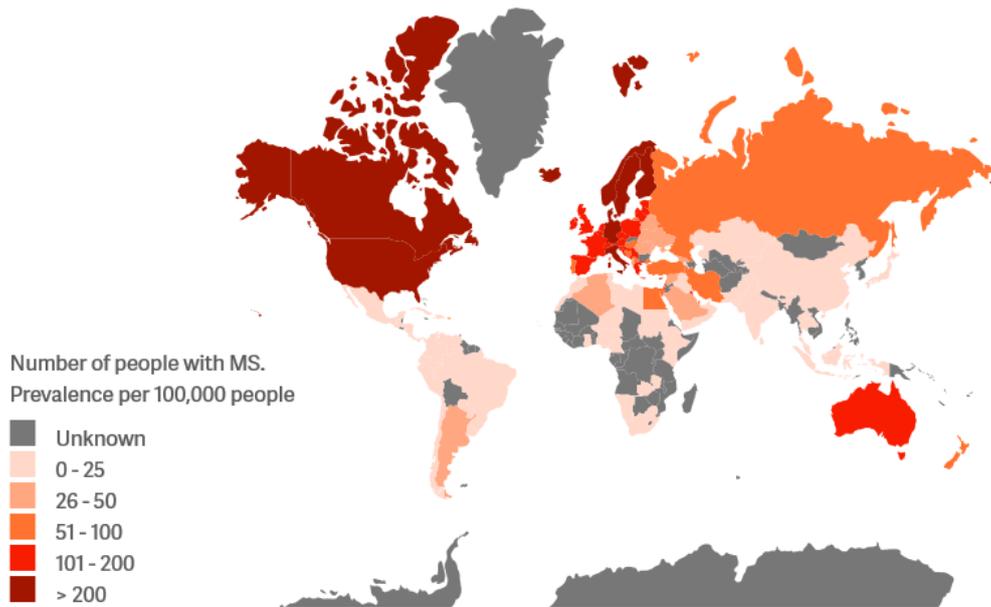


Figure 16 : Carte des prévalences mondiales de la SEP. Source : Atlas of MS, MS international federation.

Les rayonnements ultra-violet (UV) et en particulier les UV-B sont indispensables à la conversion de la provitamine D₃ en prévitamine D₃ puis en vitamine D₃ (Wacker et Holick, 2013). Ainsi, il est difficile de distinguer les effets directs des rayonnements UV de ceux de la vitamine D (Alfredsson et Olsson, 2019). Certaines études ont en effet montré qu'une plus grande exposition aux rayonnements UV était liée à un risque plus faible de développer la SEP. Cependant, après ajustement aux niveaux de vitamine D, une association persistait entre rayonnements UV et risques de SEP, suggérant de ce fait un effet protecteur indépendant des rayonnements UV dans la SEP (Bäärnhielm *et al.*, 2012). Ces données sont en accord avec des études réalisées chez l'animal. Par exemple, il a été montré que l'exposition de souris EAE à des rayonnements UV réduisait considérablement la sévérité de l'EAE (Becklund *et al.*, 2010) en augmentant notamment l'activation des lymphocytes Treg *via* l'atténuation des fonctions des DC (Breuer *et al.*, 2014).

Bien que l'exposition aux rayonnements UV présente des effets intrinsèques dans les risques de SEP, ils y participent également par l'intermédiaire de la production de vitamine D. En effet, des études ont mis en évidence qu'un taux élevé de vitamine D, en particulier avant l'âge de 20 ans, permettait de diminuer les risques de développer une SEP (Munger *et al.*, 2006). De manière équivalente, il a été

montré qu'un régime alimentaire riche en vitamine D diminuait le risque de développer une SEP (Bäärnhielm *et al.*, 2014). De plus, des taux élevés de vitamine D sont associés avec une diminution des dommages axonaux et de l'activité de la maladie chez des patients atteints de SEP (Ascherio *et al.*, 2014 ; Sandberg *et al.*, 2016).

Ainsi, le manque d'exposition aux rayonnements UV, notamment par l'intermédiaire d'une diminution de la synthèse de vitamine D, permet d'expliquer au moins en partie le gradient géographique observé dans la prévalence de la SEP. Cependant, les rayonnements UV ne sont pas en mesure à eux-seuls d'expliquer ce gradient. En effet, d'autres facteurs de risque associés à la SEP, tels que le tabagisme ou l'obésité infantile, peuvent expliquer ces différences de prévalence entre les régions du nord et les régions du sud.

I.4.2.2.3. Tabagisme.

Le tabagisme entraîne une augmentation du risque de développer une SEP. En effet, il existe un lien fort entre l'intensité du tabagisme et l'augmentation du risque de SEP (Hedström *et al.*, 2009). Le tabagisme passif est lui aussi associé à une augmentation du risque de SEP, suggérant que des irritations modérées du tissu pulmonaire suffiraient à augmenter le risque de développer une SEP (Hedström *et al.*, 2011). Ces études sur le tabagisme ne permettent cependant pas de distinguer les effets de la nicotine des effets de la fumée sur le tissu pulmonaire. Cependant, des études réalisées chez des individus consommant du tabac par voie orale ont montré une diminution du risque de SEP de façon dose-dépendante, suggérant un effet protecteur de la nicotine (Hedström *et al.*, 2009). Ainsi, les effets délétères du tabagisme seraient liés aux dommages causés au tissu pulmonaire. Cette idée est confortée par de récentes études sur l'impact de la pollution atmosphérique dans les risques de SEP. En effet, certains agents polluants présents dans l'air montrent un effet pro-inflammatoire dans la SEP possiblement par l'induction de lymphocytes Th17 auto-réactifs au niveau pulmonaire (Cortese *et al.*, 2020).

1.4.2.2.4. Obésité infantile.

L'obésité à l'adolescence augmente le risque de développer une SEP tandis que l'obésité au moment du diagnostic semble n'exercer aucune influence. Ce risque est d'autant plus élevé que l'indice de masse corporelle l'est également (Hedström *et al.*, 2014). L'obésité est également associée à une augmentation du risque de formes pédiatriques de SEP et de syndromes cliniquement isolés chez l'enfant (Langer-Gould *et al.*, 2013).

Les effets de l'obésité sur l'augmentation du risque de SEP pourraient être liés à deux phénomènes pouvant agir de concert. Tout d'abord, l'obésité provoque une inflammation modérée persistante. En effet, le tissu adipeux est en mesure de sécréter diverses molécules pro-inflammatoires telles que l'IL-6, le TNF α et la leptine (Frübeck, 2004). Tout particulièrement, le nombre de lymphocytes Treg est inversement proportionnel aux quantités de leptines sécrétées, suggérant un rôle de cette molécule dans le contrôle des populations lymphocytaires régulatrices. Il a été en outre démontré que l'inhibition des effets de la leptine diminuait la sévérité d'une EAE-PLP (Matarese *et al.*, 2005). Additionnellement, l'obésité diminue la biodisponibilité de la vitamine D, pouvant ainsi expliquer au moins partiellement les effets observés sur le risque de développer une SEP (Wortsman *et al.*, 2000).

Ainsi, de nombreux facteurs de risque de développement d'une SEP ont été identifiés. Nous avons précédemment présenté les plus couramment étudiés d'entre eux. Cependant, d'autres facteurs de risque ont été identifiés tels que le stress psychologique et les altérations de l'homéostasie intestinale qui ont fait l'objet des travaux présentés dans le présent manuscrit. Nous présenterons un état des lieux des connaissances de l'implication de ces deux facteurs dans la physiopathologie de la SEP.

II. Le stress psychologique : un facteur de risque dans la SEP.

L'implication du stress psychologique (nommé simplement « stress » dans la suite de ces propos) dans les risques d'apparition et dans l'évolution de la SEP avait été proposée par Jean-Martin Charcot

dès 1877 dans sa première description de la pathologie. Depuis, de nombreuses études ont tenté de mieux comprendre l'implication du stress dans la maladie. Cependant, celles-ci sont rendues compliquées du fait de la difficulté à mesurer de manière fiable et reproductible la nature stressante d'un évènement, notamment en raison de la subjectivité inhérente à de tels évènements stressants. Un évènement stressant est défini par un évènement interne ou externe mettant à l'épreuve l'homéostasie d'un organisme. Ainsi, le stress peut être défini comme un état dans lequel l'homéostasie est altérée ou perçue comme l'étant (Chrousos, 2009). Ces modifications de l'homéostasie, et la nécessité de rétablir l'équilibre originel, implique divers systèmes tels que le système nerveux autonome, l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien et le système vasculaire qui se trouvent être notamment impliqués dans la réponse immunitaire (Lovera et Reza, 2013). Ainsi, un déséquilibre dans un de ces systèmes, par la survenue d'évènements stressants, pourrait être au moins en partie liée à la physiopathologie de la SEP.

Nous proposons dans cette partie de présenter les effets du stress dans la SEP et dans ses modèles animaux, ainsi que les mécanismes d'action associés. Nous présenterons enfin les résultats d'études de stratégies de réduction du stress sur l'évolution de la SEP et des stratégies similaires chez l'animal, tel que l'enrichissement environnemental.

II.1. Stress et SEP.

II.1.1. Stress et risque de développement d'une SEP.

Les premières études sur les impacts du stress dans la SEP remontent aux années 1980s. Il s'agit d'études cas-témoins rétrospectives qui s'intéressaient à élucider l'association possible entre stress et déclenchement de la pathologie. Dans une première étude comparant 100 patients atteints de SEP avec 100 patients témoins, les auteurs ont montré que 79% des patients atteints de SEP déclaraient avoir vécu des évènements de vie entraînant un stress inhabituel dans les deux années précédant l'apparition de leurs symptômes contre 54% chez les patients contrôles durant les deux années précédant l'interview. Ils en ont conclu que le stress multipliait par 3.2 le risque de développement de la pathologie (Warren *et al.*, 1982 ; Table 3). Dans une autre étude comparant 39 patients atteints de SEP avec 40 volontaires sains, il a été montré que la survenue d'un évènement marquant dans les six mois avant la déclaration

de la pathologie était déclarée chez 77% des patients contre 35% chez les volontaires sains dans les six mois précédant l'interview (Grant *et al.*, 1989 ; Table 3). De plus, 62% des patients avaient déclaré avoir vécu un évènement stressant sévère contre 15% des sujets témoins. De surcroît, 30% des patients ont réporté avoir expérimenté un tel évènement sévère durant les 6 mois précédant l'apparition de la maladie contre environ 5% des individus contrôles. Ceci suggère ainsi que le stress aurait un effet presque immédiat dans le risque de développer la pathologie. Bien que ces deux études arrivent aux mêmes conclusions, leur méthode, notamment basée sur des déclarations individuelles potentiellement subjectives et leur caractère rétrospectif, laisse présager d'un certain nombre de biais. Ainsi, des auteurs ont mis en place une étude prospective sur une plus grande cohorte (Li *et al.*, 2004 ; Table 3). Dans cette étude danoise, 21 062 parents ayant perdu un enfant avant l'âge de 18 ans ont été comparés à 293 745 parents n'ayant pas connu un tel évènement. Les auteurs ont ainsi pu montrer que, après 17 années de suivi de chaque population, le risque de développer une SEP était multiplié par 1.56 chez les parents ayant perdu un enfant. De plus, ce risque était multiplié par 2.1 lorsque le décès de l'enfant était survenu de manière inattendue. Ainsi, cette étude semble confirmer le stress comme étant un facteur de risque de développement d'une SEP. Cependant, une étude plus récente publiée en 2011 effectuée sur deux cohortes d'infirmières (Nurses' Health Studies – NHS I et II) n'a pas permis de confirmer ces résultats (Riise *et al.*, 2011 ; Table 3). En effet, les auteurs n'ont pas réussi à mettre en évidence de lien entre la survenue d'évènements stressants et le développement de la pathologie.

Etude	Participants	Age	Femmes (%)	Type d'étude	Odds Ratio (OR) ou Hazard Ratio (HR)	Effets sur la SEP
Warren <i>et al.</i> , 1982	100 patients SEP ; 100 patients contrôles	20-39	69.7	Cas-témoin	OR = 3.2	↑
Grant <i>et al.</i> , 1989	39 patients SEP ; 40 volontaires sains	35.65	74.7	Cas-témoin	1 évènement : OR = 6.19 Évènement sévère : OR = 9.07	↑
Li <i>et al.</i> , 2004	21 062 parents ayant perdu un enfant ; 293 745 parents contrôles	ND	ND	Prospective	Décès d'un enfant : HR = 1.56 Décès inattendu : HR = 2.13	↑
Riise <i>et al.</i> , 2011	NHS I : 94 185 NHS II : 68 505	NHS I : 30-55 NHS II : 25-42	100	NHS I : prospective NHS II : rétrospective	NHS I – stress sévère : HR = 0.87 NHS II – violences physiques : OR = 0.68 (enfance) et 0.77 (adolescence) NHS II – abus sexuels : OR = 1.47 (enfance) et 1.21 (adolescence)	=

Table 3 : Caractéristiques des études sur l'implication du stress dans le développement de la SEP.

ND : Non Disponible ; ↑ : augmentation du risque de développement de la SEP ; = : pas d'effet du stress sur le développement de la SEP.

Ainsi, l'association entre stress et déclaration de la pathologie reste encore aujourd'hui débattue, bien que la plupart des études semblent aller dans le sens d'un effet délétère de celui-ci. D'autres études se

sont quant à elles intéressées, non pas aux effets du stress sur le développement de la SEP, mais sur l'évolution de la pathologie une fois celle-ci installée.

II.1.2. Effets du stress sur l'évolution de la SEP.

La plupart des études réalisées semblent aller dans le sens d'un effet délétère du stress sur l'évolution de la pathologie, et plus particulièrement dans la survenue de nouvelles poussées dans la forme RR-SEP. Par exemple, dans une méta-analyse publiée en 2004, Mohr et ses collaborateurs ont montré que 13 études sur 14 avaient conclu à une augmentation du risque d'exacerbation des symptômes à la suite d'un stress (Mohr *et al.*, 2004). L'une d'entre elles avait cependant à l'inverse conclu à un effet protecteur du stress sur l'évolution de la pathologie (Table 4 ; Nisipeanu et Korczyn, 1993). Dans cette étude, les auteurs ont évalué les effets du stress lié au bombardement de la ville de Tel Aviv en 1991 pendant la première guerre du Golfe sur l'évolution des symptômes chez des patients atteints de SEP. Les auteurs ont, de manière inattendue, observé une diminution de la fréquence des poussées pendant la guerre et pendant les deux mois suivants par rapport à la fréquence calculée sur les deux années précédentes. Par la suite, deux autres études se sont intéressées aux effets du stress induit par les périodes de guerre, et en particulier au cours du conflit qui a opposé le Liban et Israël en juillet 2006. Ces deux études ont mis en évidence une augmentation du nombre de poussées pendant les 33 jours de conflit et dans le mois suivant la résolution de celui-ci (Table 4 ; Golan *et al.*, 2008 ; Yamout *et al.* 2010). Les auteurs de la deuxième étude ont de plus observé que 33% des patients soumis au stress de la guerre présentaient des lésions T1 Gd⁺ en IRM contre seulement 13% des patients contrôles (Table 4 ; Yamout *et al.*, 2010).

Des études plus récentes sont venues appuyer ces observations d'un lien entre la survenue d'évènements stressants et le risque de poussées de la pathologie. Parmi elles, Mitsonis et ses collaborateurs ont montré que la survenue d'un évènement stressant (*e.g.* perte d'un proche, difficultés financières, etc.) entraînant des conséquences psychologiques durables (plus de 10 jours) conduisait à une augmentation du risque de poussée d'un facteur 3 dans les 4 semaines suivant la survenue de cet évènement. Ce risque de poussée était par ailleurs multiplié par 12 si deux évènements de ce type étaient

survenus et par 16 pour trois évènements ou plus (Table 4 ; Mitsonis *et al.*, 2008). Une autre étude publiée en 2022 a mis en évidence que le stress engendré par la pandémie de COVID-19 multipliait par 4 environ le risque de survenue de poussées (Table 4 ; Sparaco *et al.*, 2022).

Etude	Participants	Age	Femmes (%)	Type d'étude	Odds Ratio (OR) ou Hazard Ratio (HR)	Effets sur la SEP
Nisipeanu et Korczyn, 1993	32 patients RR-SEP	38.2	56.3	Prospective	ND	↓
Golan <i>et al.</i> , 2008	156 patients RR-SEP	ND	77.5	Prospective	ND	↑
Yamout <i>et al.</i> , 2010	216 patients RR-SEP	39.6	60.2	Prospective	Apparition de lésion Gd+ : OR = 3.27	↑
Mitsonis <i>et al.</i> , 2008	21 patients RR-SEP	33.5	100	Prospective	1 évènement de longue durée : HR = 3.03 2 : HR = 12.12 ≥ 3 : HR = 16.12	↑
Sparaco <i>et al.</i> , 2022	154 patients RR-SEP	43.8	70.8	Prospective	OR = 1.09 Stress très sévère : OR = 3.80	↑
Burns <i>et al.</i> , 2014	118 patients RR-SEP 2 patients SP-SEP	42.7	84.2	Prospective	Evènement négatif majeur : - Lésion Gd+ : OR = 1.77 - Lésion T2 (nouvelle ou élargissement) : OR = 1.57 Evènement positif : - Lésion Gd+ : OR = 0.53 - Lésion T2 (nouvelle ou élargissement) : OR = 0.74	Négatif : ↑ Positif : ↓
Leekoff <i>et al.</i> , 2022	96 patient SEP-TSPT 95 patients SEP-Contrôle	ND	ND	Prospective	ND	↑

Table 4 : Caractéristiques des études sur l'implication du stress dans l'évolution de la SEP.

TSPT : Trouble de Stress Post-Traumatique ; ND : Non Disponible ; ↑ : augmentation et ↓ : diminution du risque de poussées.

Bien que la plupart des études aillent dans le sens d'un effet délétère du stress dans l'évolution de la pathologie, la seule utilisation de la survenue de poussées (à l'exception de l'étude de Yamout *et al.*, 2010) comme reflet de l'exacerbation de la maladie semble parfois insuffisante, notamment du fait que la définition même d'une poussée diffère d'une étude à l'autre. Ainsi, certaines équipes ont utilisé des critères d'imagerie, bien plus sensibles, afin d'étudier les effets du stress sur l'activité de la SEP. A l'instar des observations de Yamout et de ses collaborateurs pendant le conflit israélo-libanais de 2006, il a été montré que la survenue d'un évènement stressant majeur augmentait le risque d'apparition de lésions actives (T1 Gd⁺) et le risque d'apparition de nouvelles lésions T2 ou l'élargissement de lésions T2 préexistantes (Table 4 ; Burns *et al.*, 2014). De manière intéressante, les auteurs ont à l'inverse montré que la survenue d'évènements stressants qualifiés par les patients comme bénéfiques induisaient une diminution du risque d'apparition de lésions T1 Gd⁺ et d'apparition ou d'élargissement de lésions T2. Une étude réalisée récemment sur des vétérans militaires américains souffrant de troubles de stress post-traumatiques et atteints de la SEP a montré des résultats très similaires à savoir une augmentation du nombre moyen de lésions T1 Gd⁺ et de nouvelles lésions T2 chez ces patients (Table 4 ; Leekoff *et al.*, 2022). Ces auteurs ont par ailleurs mis en évidence que ces patients souffrant de troubles de stress

post-traumatique en comorbidité de la SEP évoluaient plus rapidement vers l'acquisition d'un handicap très important ($EDSS \geq 6$) que les patients n'en souffrant pas (23.7 contre 29.5 années respectivement).

Ainsi, bien que des études anecdotiques ne montrent aucun effet ou un effet protecteur du stress dans le développement de la SEP ou l'aggravation des symptômes, la grande majorité d'entre elles appuient à l'inverse un lien fort entre stress et SEP. D'autres auteurs ont ainsi essayé de reproduire ces observations dans les modèles animaux de SEP, notamment dans l'espoir d'en élucider les mécanismes sous-jacents, voire de proposer des pistes de remédiation contre les effets délétères du stress. Par conséquent, nous ferons un état des lieux des études des effets du stress dans les modèles animaux de SEP dans la partie suivante.

II.2. Stress et modèles animaux de SEP.

Alors que la plupart des études chez l'humain semblent converger vers un effet délétère du stress sur le développement et l'aggravation de la SEP, les données obtenues chez l'animal semblent moins unanimes. En effet, il apparaît que les conséquences du stress dans les modèles animaux de SEP puissent différer notamment en fonction du paradigme de stress utilisé. Ainsi, des auteurs ont proposé une définition des types d'évènements stressants utilisés permettant de distinguer ce qu'ils ont défini comme un stress chronique (d'une durée supérieure à une heure par jour pendant plus de cinq jours) d'un stress aigu (d'une durée inférieure à une heure par jour pendant moins de cinq jours ; Heesen *et al.*, 2007). Nous proposons ici d'utiliser les mêmes définitions afin de présenter les résultats contradictoires obtenus dans les modèles animaux de SEP.

II.2.1. Stress chronique.

Les premières études sur les effets du stress dans l'EAE remontent aux années 1960s. Le paradigme de stress majoritairement utilisé consistait alors en une contention et une isolation des animaux pendant des temps souvent très longs. Une des premières études publiées à ce sujet est arrivée à la conclusion qu'un stress chronique répété (contention de 3h par jour) diminuait très fortement l'incidence de déclaration de l'EAE chez des rats femelles immunisés avec des homogénats de moelle épinière quand ce paradigme était appliqué du jour 6 avant immunisation jusqu'aux jours 14 ou 28 après celle-ci (14%

ou 7% respectivement contre 57% chez les animaux contrôles ; Levine *et al.*, 1962). De manière étonnante, le même paradigme semble augmenter l'incidence de déclaration (78%) de l'EAE lorsque celui-ci est appliqué du 9^e au 28^e jours après immunisation, bien que les auteurs de l'étude aient conclu à une absence d'effet de cette exposition plus tardive (Table 5).

Stressful procedure	No. of rats	Clinical EAE	Histo-logic EAE
		%	%
None	28	57 (1.2)†	61 (1.5)
Restraint D-6* to D+28	42	7 (.2)	21 (.4)
" D-6 to D+14	7	14 (.1)	29 (.4)
" D+9 to D+28	9	78 (1.6)	67 (1.3)

Table 5 : Effets supprimeurs d'un paradigme de stress chronique par contention sur une EAE induite par immunisation de rats contre des homogénats de moelle épinière.

*Compté à partir du jour de l'immunisation ; †Les chiffres entre parenthèse représentent les scores cliniques moyens des animaux. Table extraite de Levine *et al.*, 1962.

D'autres études se sont par la suite intéressées aux effets d'un tel stress chronique après induction de la pathologie. Dans une étude publiée en 1994, Kuroda et ses collaborateurs ont pu mettre en évidence qu'une contention de 12h pendant 3 nuits consécutives entraînait une diminution de l'incidence de déclaration, une augmentation du délai de déclaration, ainsi qu'une diminution des scores cliniques moyens chez des rats immunisés par des homogénats de moelle épinière lorsque ce protocole était appliqué au 8^e jour après immunisation. Néanmoins, l'application de la même procédure immédiatement après immunisation n'avait aucun effet sur l'EAE (Kuroda *et al.*, 1994). D'autres auteurs se sont intéressés aux différences dans les conséquences d'un stress chronique en fonction de la temporalité de l'exposition à de tels événements stressants. Par exemple, l'exposition de rats à un stress chronique varié (paradigme combinant divers agents stressants tels que l'exposition à des odeurs de prédateurs, le surpeuplement, une déprivation d'eau, la contention) diminue la sévérité de l'EAE lorsqu'elle survient avant l'induction de la pathologie (Table 6 ; « Pre ») tandis qu'elle en augmente les symptômes lorsqu'elle se déroule immédiatement après l'induction (Table 6 ; « Post » ; Correa *et al.*, 1998).

Groups	Incidence	Number of rats with clinical signs						Clinical score ^a ($X \pm SD$)	Day of onset ^b ($X \pm SD$)
		0	I	II	III	IV	V		
EAE	(11/14)	3	4	1	2	4	—	2.5 ± 1.4	12 ± 1.6
Control EAE	(0/8)	8	—	—	—	—	—	—	—
Pre	(9/14)	5	7	—	—	2	— ^d	1.7 ± 1.3	12.6 ± 1.3
Control pre	(0/8)	8	—	—	—	—	—	—	—
Post	(10/15)	5	1	1	4	3	1	3.2 ± 1.0	11.6 ± 1.8
Control post	(0/8)	8	—	—	—	—	—	—	—

Table 6 : Effets du stress chronique varié sur l'évolution des symptômes d'une EAE induite par immunisation de rats contre de la myéline bovine.

^a Score clinique maximal moyen des rats ayant présenté des symptômes cliniques dans chaque groupe.

^b Jour de déclaration de la maladie

^d Significativement différent du groupe « Post » (p<0.05).

Table extraite de Correa *et al.*, 1998.

D'autres études se sont quant à elles intéressées aux effets d'un stress chronique dans la survenue de poussées dans des modèles animaux récurrents-rémittents. Parmi elles, une étude publiée par Levine et Saltzman en 1987 a montré qu'une contention de 7h pendant 5 jours appliquée pendant la phase de rémission d'une EAE chez des rats immunisés par des homogénats de moelle épinière entraînait une abolition quasi-totale des poussées suivantes. De plus, les rares poussées observées par les auteurs se trouvaient être moins sévères. En outre, les auteurs de cette étude ont pu montrer que l'injection de corticostérone ou de dexaméthasone (un puissant stéroïde synthétique) aux mêmes temps que l'application du paradigme de stress chronique permettait de reproduire les mêmes résultats, suggérant ainsi que les effets observés seraient au moins en partie liés à une augmentation des concentrations plasmatiques de glucocorticoïdes (Levine et Saltzman, 1987). Une autre étude réalisée en 1998 dans un autre modèle récurrent-rémittent (souris immunisées avec le peptide MBP₆₈₋₈₈) n'a cependant pas permis de confirmer ces résultats. En effet, bien que les auteurs aient pu mettre en évidence une abolition quasi-totale de la survenue de tout symptôme lorsqu'un stress chronique de contention était réalisé pendant 12 à 14 heures par jour entre l'immunisation et le 14^e jours post-immunisation (Figure 17A), la réalisation du même protocole entre le 20^e et le 35^e jour après immunisation n'avait aucun effet (Figure 17B ; Whitacre *et al.*, 1998). Cependant, l'étonnante absence d'évolution récurrente des symptômes à la fois dans le groupe stressé et dans le groupe contrôle pour le second protocole de stress chronique ne permet pas de conclure de façon certaine quant aux effets d'un tel stress dans la survenue de poussées. De plus, l'utilisation d'un groupe d'animaux soumis à une déprivation d'eau et de nourriture comme groupe contrôle pose des questions quant au bien-fondé de ces comparaisons.

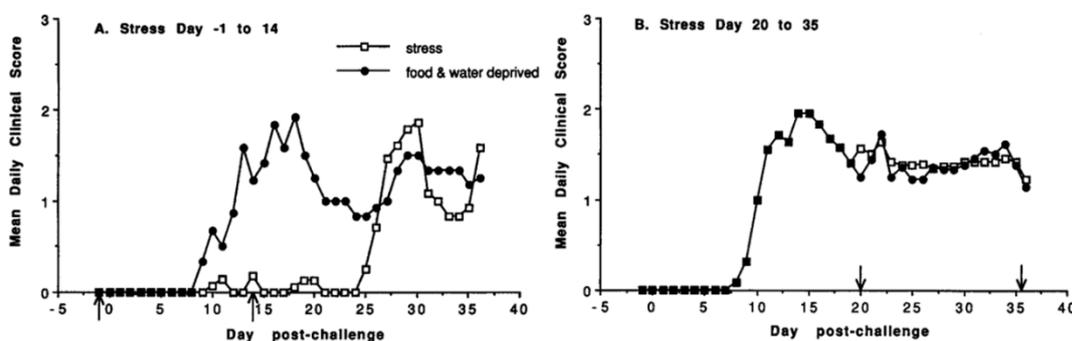


Figure 17 : Effets d'un stress chronique par contention sur l'évolution d'une EAE récurrente-rémittente induite par immunisation de souris B10.PL contre la protéine MBP₆₈₋₈₈.

Scores cliniques moyens des animaux soumis à un stress chronique par contention appliquée depuis le jour précédant l'induction du modèle jusqu'au jour 14 (A) ou du 20^e au 35^e jours après immunisation (B) et des animaux contrôles correspondants (déprivation d'eau et de nourriture). Les flèches indiquent le début et la fin du protocole de stress ou de déprivation d'eau et de nourriture. Figure extraite de Whitacre *et al.*, 1998.

D'autres études plus récentes semblent à l'inverse présenter un stress chronique comme un facteur aggravant la maladie. Par exemple, une étude publiée en 2010 par Pérez-Nievas et ses collaborateurs a montré qu'un stress chronique par contention quotidienne de 6 heures commençant le même jour que l'immunisation entraînait une apparition plus précoce des symptômes moteurs chez des rats immunisés contre le peptide MOG₃₅₋₅₅ (jours 5-8 contre jours 12-15 chez les animaux contrôles). Le score clinique moyen de ces animaux restait plus élevé en comparaison des animaux contrôles jusqu'au 20^e après immunisation (Pérez-Nievas *et al.*, 2010). Une autre étude publiée en 2017 vient corroborer l'idée d'un effet délétère d'un stress chronique. En effet, dans cette étude, une contention quotidienne de 20 minutes pendant 37 jours, et débutant 7 jours avant l'induction du modèle, aggravait les symptômes moteurs chez des rats immunisés contre le peptide MBP₆₉₋₈₈ (Gerrard *et al.*, 2017).

Ainsi, de fortes variabilités entre les études, probablement dûes à un manque de standardisation dans les paradigmes de stress utilisés et à l'utilisation de divers modèles animaux, sont observées quant aux effets d'un stress chronique chez l'animal. De plus, très peu d'études ont été réalisées chez la souris, qui est cependant l'une des espèces les mieux caractérisée comme modèle animal de SEP.

II.2.2. Stress aigu.

Alors que de nombreuses études sur les effets du stress dans les modèles animaux de SEP ont utilisé des paradigmes de stress chronique, les travaux ayant utilisé des paradigmes plus ponctuels (à l'origine d'un stress défini comme aigu) sont beaucoup moins abondants. Une des premières études ayant utilisé un tel protocole remonte aux années 1990s. Celle-ci s'est intéressée aux effets d'un stress sonore, réalisé pendant la période néonatale, sur la sévérité d'une EAE (Dimitrijević *et al.*, 1994). Dans cette étude, les auteurs ont exposé des ratons (de la souche Lewis et Dark Agouti) à un son intense pendant 60 minutes aux jours postnataux 15, 18 et 21. Une EAE a ensuite été induite cinq semaines après la dernière exposition au stress chez ces mêmes animaux. Les auteurs ont conclu à une augmentation de la sévérité de l'EAE chez les rats Lewis soumis au stress aigu en comparaison avec les animaux non-stressés. Aucune différence significative n'a cependant été observée chez la souche Dark Agouti suggérant un effet de la souche dans la susceptibilité au stress. Une étude plus récente publiée en 2002 s'est quant à

elle intéressée aux effets d'une contention aigüe en phase présymptomatique sur l'évolution d'une RR-EAE (Chandler *et al.*, 2002). Dans ces travaux, les auteurs ont soumis des souris SJL/J précédemment immunisées contre le peptide PLP₁₃₉₋₁₅₁ à une contention d'une heure aux jours 2 et 3 post-immunisation. Les animaux soumis à ce paradigme présentaient une apparition plus précoce des symptômes moteurs par rapport aux animaux non-stressés (jours moyens de déclaration : 14.7 vs 19.0 respectivement). De plus, les auteurs ont observé une augmentation de la perméabilité de la BHE (évaluée par l'extravasation de gluceptate marqué au ⁹⁹Technétium) chez les animaux stressés par rapport aux animaux non-stressés. Les auteurs proposent ainsi, dans le contexte des études jusqu'alors publiées chez l'humain et l'animal, qu'un stress chronique diminuerait la sévérité de la pathologie par l'intermédiaire d'une immunosuppression induite notamment par les glucocorticoïdes, tandis qu'un stress aigu semblerait l'augmenter, notamment par l'intermédiaire de l'ouverture de la BHE (voir partie [II.3.4.](#)).

Une étude plus récente s'est intéressée aux effets d'un stress aigu sur les processus de démyélinisation induite par la cuprizone (Meknatkhah *et al.*, 2019). Pour ce faire, les auteurs ont exposé des rats 10 minutes par jour pendant 5 jours à un stress physique (chocs électriques) ou psychologiques (exposition au comportement stressé du rat subissant les chocs électriques). Les auteurs ont ainsi pu montrer que les deux paradigmes de stress entraînaient une augmentation similaire des concentrations plasmatiques de corticostérone et potentialisaient la démyélinisation induite par la cuprizone, avec un effet cependant étonnamment plus marqué du stress psychologique comparativement au stress physique (Figure 18).

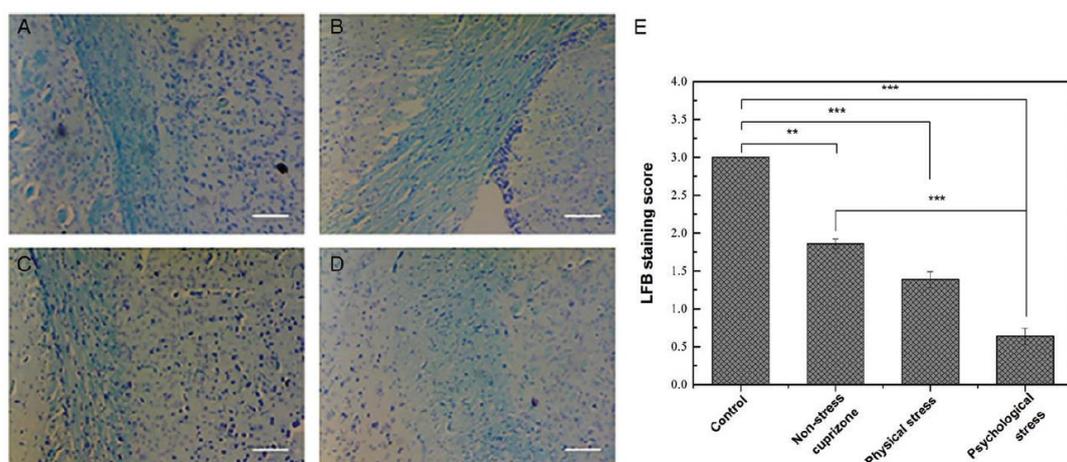


Figure 18 : Coloration de la myéline au LFB (Luxol Fast Blue) dans le corps calleux d'animaux contrôles (A) et d'animaux traités à la cuprizone non stressés (B), soumis à un stress physique (C) ou psychologique (D) et leurs quantifications respectives (E). **P<0.01, ***P<0.001. Figure extraite de Meknatkhah *et al.*, 2019.

Ainsi, malgré le faible nombre de publications relatives aux effets d'un stress aigu sur les modèles animaux de SEP, il semble qu'un tel stress soit, à l'instar des observations faites chez les patients, un facteur aggravant la sévérité de ces modèles, qu'ils fassent intervenir des médiateurs de l'immunité (EAE) ou non (cuprizone). Cependant, ces données mériteraient davantage d'investigations, et notamment concernant l'étude des poussées dans les formes RR-EAE.

Les diverses études des effets du stress dans différents modèles animaux de SEP n'ont pas su parvenir à un consensus quant à ses effets sur la pathologie. Cependant, deux effets contradictoires du stress sur la sévérité de la maladie semblent émerger en fonction qu'il s'agisse d'un stress chronique ou d'un stress aigu. En effet, les études ayant utilisés des paradigmes de stress chroniques semblent pour la plupart converger vers un effet protecteur du stress dans ces modèles tandis que celles ayant appliqué des protocoles de stress aigus semblent à l'inverse montrer des effets délétères de celui-ci (Table 7).

Etude	Espèce/souche (sexe/immunogène)	Paradigme de stress	Stress chronique		Stress aigu	
			Avant induction	Après induction	Avant induction	Après induction
Levine <i>et al.</i> , 1962	Rat/Sprague-Dawley (♀/Homogénat moëlle épinière)	Contention	↓↓	↑		
Levine et Saltzman, 1987	Rat/Lewis (♀/Homogénat moëlle épinière)	Contention		↓↓(poussées)		
Kuroda <i>et al.</i> , 1994	Rat/Lewis (♀/Homogénat moëlle épinière)	Contention		↓↓ (Jour 8) = (Jour 1)		
Correa <i>et al.</i> , 1998	Rat/Wistar (♀/MBP)	Stress Chronique Varié	↓	↑		
Whitacre <i>et al.</i> , 1998	Rat/Lewis (♂ et ♀/MBP ₆₈₋₈₈) ou Souris/B10.PL (ND/MBP ₆₈₋₈₈)	Contention	↓ (rats ♂) ↓↓ (rats ♀)	↓ (souris/jours 1-14) = (souris/jours 20-35)		
Pérez-Nievas <i>et al.</i> , 2010	Rat/Dark Agouti (♀/MOG ₃₅₋₅₅)	Contention		↑ (jours 0-20) ↓ (jour 21)		
Gerrard <i>et al.</i> , 2017	Rat/Lewis (♀/MBP ₆₈₋₈₈)	Contention	↑			
Dimitrijević <i>et al.</i> , 1994	Rat/Lewis ou Dark Agouti (♂ et ♀/Homogénat moëlle épinière)	Son			↑ (Lewis) = (Dark Agouti)	
Chandler <i>et al.</i> , 2002	Souris/SJL/J (♀/PLP ₁₃₉₋₁₅₁)	Contention				↑
Meknathkiah <i>et al.</i> , 2019	Rat/Wistar (♀/Cuprizone)	Physique ou Psychologique			↑ (physique) ↑↑ (psychologique)	

Table 7 : Caractéristiques des études sur les effets d'un stress chronique ou aigu dans les modèles animaux de SEP.

ND : Non Disponible ; ↑ : augmentation ; ↑↑ : forte augmentation ; ↓ : diminution et ↓↓ : forte diminution de la sévérité de la pathologie ; = : pas d'effet du stress sur la sévérité de la pathologie (incidence et/ou scores cliniques).

De plus, la dichotomie observée entre stress chronique et stress aigu soulève des questions quant aux divers processus physiologiques impliqués dans la réponse au stress.

II.3. Mécanismes physiopathologiques de la réponse au stress.

Les mécanismes d'action du stress dans la physiopathologie de la SEP ne sont aujourd'hui toujours pas complètement élucidés. Il semble cependant qu'ils soient particulièrement liés à des dérégulations du système hypothalamo-hypophyso-surrénalien et des cibles de ce système. Après avoir exposé les grandes lignes du fonctionnement physiologique de cet axe, nous présenterons les différentes hypothèses soulevées par la littérature scientifique quant aux effets du stress sur la SEP et ses modèles animaux.

II.3.1. L'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien

Le stress est connu de longue date comme étant à l'origine d'une augmentation de l'activité de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien (HPA pour « Hypothalamic-Pituitary-Adrenal axis » ; Figure 19). En effet, la survenue d'évènements stressants entraîne une augmentation de la production hypothalamique (par les neurones des noyaux paraventriculaires) de CRH (pour « Corticotropin Releasing Hormone ») et d'AVP (pour « Arginine VasoPressin »). La CRH libérée dans la circulation sanguine au niveau de l'éminence médiane permet la stimulation de la production d'ACTH (pour « AdrenoCorticoTropic Hormone ») par le lobe antérieur de l'hypophyse (adénohypophyse), production potentialisée par l'AVP. A son tour, l'ACTH libérée dans la circulation générale stimule la production de glucocorticoïdes (cortisol chez l'humain, corticostérone chez le rongeur) par la zone corticale des glandes surrénales. Les corticostéroïdes ainsi synthétisés exercent un rétrocontrôle négatif sur les neurones hypothalamiques et les cellules sécrétrices d'ACTH permettant de ce fait de contrôler leur propre production et de revenir à l'activité basale de l'axe (Figure 19). Cependant, lorsque le stress perdure (stress chronique), une dérégulation de ce rétrocontrôle, notamment par l'intermédiaire d'une altération dans le nombre et/ou la fonctionnalité des récepteurs aux glucocorticoïdes (GR), induit *in fine* une augmentation des concentrations plasmatiques des corticostéroïdes, bien que d'autres auteurs décrivent des hypocortisolémies dans certaines circonstances de stress important (Chrousos, 1995 ; Heim *et al.*, 2000).

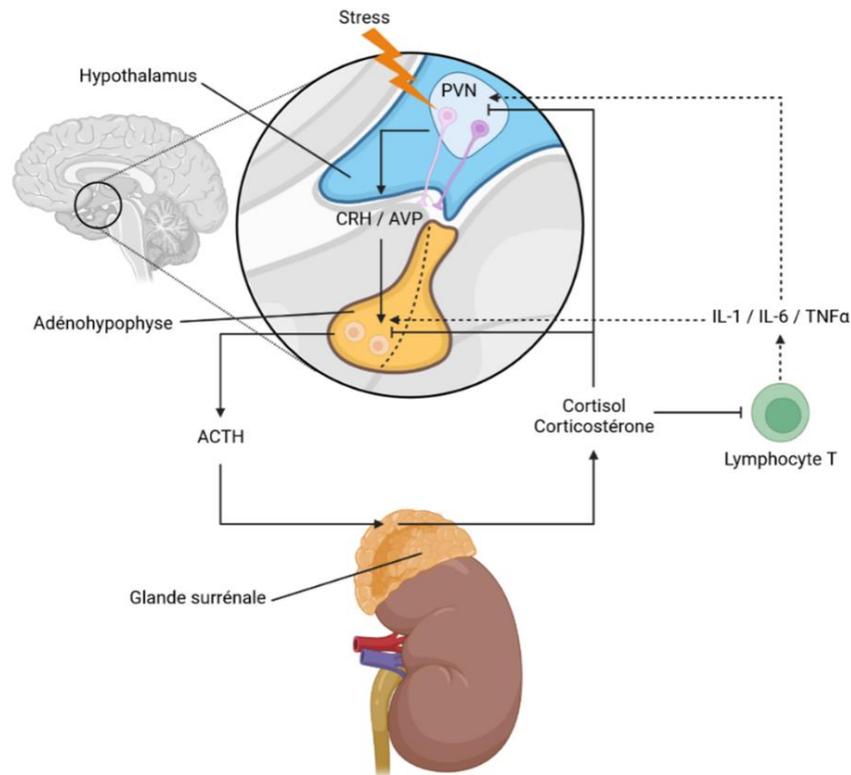


Figure 19 : Axe hypothalamo-hypophysio-surrénalien.

PVN : Paraventricular Nucleus ; CRH : Corticotropin Releasing Hormone ; AVP : Arginine-Vasopressin ; ACTH : Adrenocorticotropin Hormone ; IL-1 et 6 : Interleukines 1 et 6 ; TNF α : Tumor Necrosis Factor- α . Figure créée avec BioRender.com.

L'axe HPA peut également être modulé par un état inflammatoire. En effet, certaines cytokines telles que l'IL-1, l'IL-6 et le TNF α augmentent l'activité de l'axe, notamment en stimulant la production d'ACTH par l'adénohypophyse (Figure 19 ; Akira *et al.*, 1990). A l'inverse, les glucocorticoïdes circulants modulent les réponses inflammatoires du fait notamment de l'expression de GR par de nombreux types cellulaires de l'immunité. Par exemple, les corticostéroïdes sont capables d'inhiber l'activation des lymphocytes T (et tout particulièrement les Th1), la production de cytokines ainsi que l'expression de certaines molécules d'adhésion et leurs récepteurs (Chrousos, 1995). De plus, la CRH est capable à elle seule de limiter la réponse inflammatoire. En effet, le traitement par de la CRH de rats immunisés contre le peptide MBP₇₁₋₉₀ dont les glandes surrénales ont été retirées induit une abolition de l'occurrence de symptômes cliniques et une diminution de la prolifération des lymphocytes T auto-réactifs, suggérant un effet de la CRH indépendant de la production de corticostéroïdes (Poliak *et al.*, 1997).

De ce fait, l'activation de l'axe HPA par le stress et par conséquent l'augmentation des concentrations plasmatiques de glucocorticoïdes devrait limiter la réponse immunitaire et être protecteur dans la SEP. Bien qu'observé dans la plupart des études chez l'animal utilisant des paradigmes de stress chronique (voir partie [II.2.1.](#)), l'effet immunosuppresseur du stress n'est pas retrouvé dans les études chez l'animal utilisant des protocoles de stress aigu ni dans la plupart des études réalisées chez l'humain.

Ainsi, plusieurs hypothèses ont été émises pour expliquer les phénomènes d'aggravation de la pathologie observés chez les patients SEP soumis à un stress. Bien qu'indépendantes, ces différentes hypothèses ne sont pas exclusives, et peuvent être impliquées de concert pour expliquer les effets délétères du stress observés dans la SEP.

II.3.2. L'hypothèse de la résolution du stress.

Cette hypothèse suggère que les effets délétères du stress observés chez les patients atteints de SEP seraient induits non pas par le stress en lui-même mais par sa résolution (Mohr et Pelletier, 2006). En effet, l'exposition à un événement stressant induit une activation de l'axe HPA et par conséquent une augmentation des concentrations plasmatiques de glucocorticoïdes. Du fait de leurs propriétés anti-inflammatoires, cette augmentation de concentration de corticostéroïdes entraîne une augmentation du contrôle des réactions inflammatoires auto-immunes. Cependant, lors de la résolution de l'évènement stressant, l'activité de l'axe revient à son état basal, induisant de ce fait une diminution de la production de corticostéroïdes et une levée d'inhibition des effecteurs de l'auto-immunité, augmentant ainsi le risque d'exacerbation de la pathologie (Figure 20).

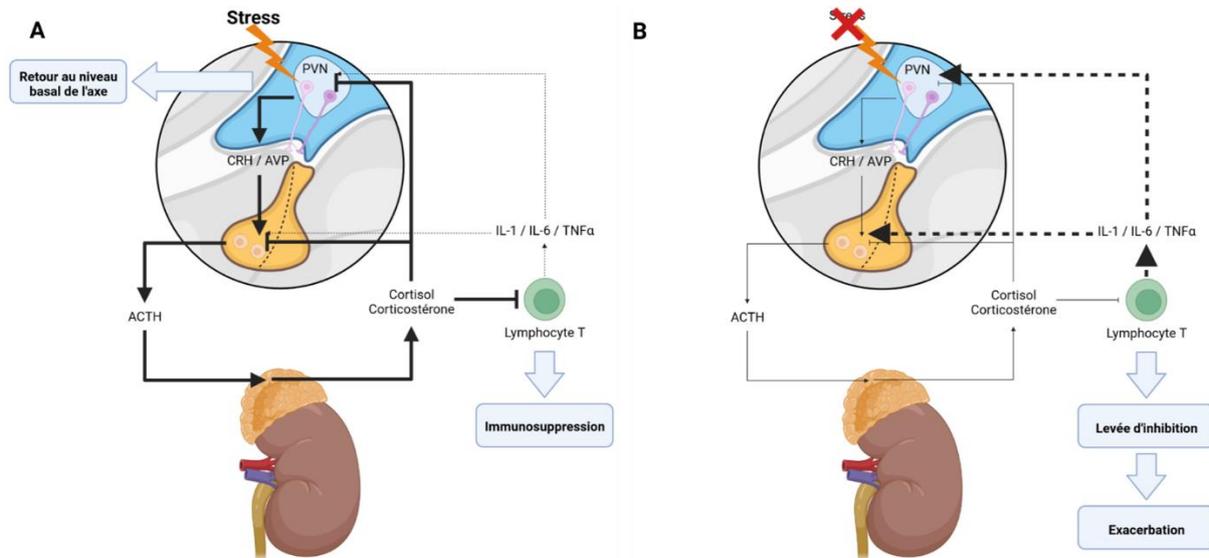


Figure 20 : Mécanismes de régulation de l'axe hypothalamo-hypophysé-surrénalien sous-jacents à la résolution du stress comme facteur de risque d'exacerbation de la SEP.

A : Lors de l'exposition à l'agent stressant, l'axe HPA est activé. Ceci se traduit par une augmentation de la synthèse de CRH, d'ACTH et de glucocorticoïdes. Ces derniers induisent une immunosuppression par l'intermédiaire de l'inhibition des cellules immunitaires et notamment des lymphocytes T. Les glucocorticoïdes circulants augmentent également le rétrocontrôle négatif de l'axe permettant son retour à un niveau basal. B : Lorsque l'évènement stressant cesse, dans les nouvelles conditions de stabilité de l'axe, il en découle une diminution de la synthèse de CRH, d'ACTH et de glucocorticoïdes. Celle-ci lève alors l'inhibition de la réaction auto-immune permettant l'exacerbation de la pathologie. Figure créée avec BioRender.com.

Bien qu'aucun argument en faveur de cette hypothèse n'ait pu être mis en évidence dans les études chez l'humain, quelques données chez l'animal semblent aller dans ce sens. Par exemple, dans les travaux précédemment cités de Whitacre et ses collaborateurs, les auteurs ont observé qu'environ 10 jours après l'arrêt du paradigme de stress chronique, les souris EAE voyaient apparaître des symptômes moteurs similaires voire plus intenses que ceux de leurs homologues non stressées (Whitacre *et al.*, 1998). Cependant, aucune autre étude à notre connaissance n'a permis de confirmer ces résultats, notamment du fait que, dans la plupart des cas, les animaux aient été mis à mort immédiatement après la fin du paradigme de stress.

II.3.3. L'hypothèse de la résistance aux glucocorticoïdes.

Cette hypothèse suggère que l'exposition chronique à un stimulus stressant entraîne une résistance des cellules immunitaires au contrôle par les glucocorticoïdes (Walsh *et al.*, 2021). Cette résistance pourrait être la résultante d'une perte de fonctionnalité et/ou d'une diminution du nombre de GR exprimés par cellules de l'immunité à la suite d'une exposition prolongée à des taux de corticostéroïdes anormalement élevés. Une telle résistance aux glucocorticoïdes a par ailleurs été observée chez des souris exposées à des évènements stressants tels que leur domination par un congénère (Avitsur *et al.*,

2001). De plus, certains travaux ont mis en évidence l'existence d'une telle résistance aux glucocorticoïdes chez les patients atteints de SEP en comparaison avec des individus témoins (DeRijk *et al.*, 2004). Les auteurs de cette étude ont par ailleurs observé une plus forte résistance aux glucocorticoïdes chez les patients atteints de RR-SEP par rapport aux patients atteints de SP-SEP suggérant un lien avec la phase la plus inflammatoire de la pathologie. Une autre étude plus récente appuie ces observations. En effet, il y a été mis en évidence une diminution de l'expression des GR dans les lymphocytes T provenant de souris EAE et de patients atteints de RR-SEP comparativement à des individus contrôles (Gold *et al.*, 2012). Ces auteurs ont par ailleurs observé l'absence d'une telle résistance chez des patientes pendant la grossesse, période pendant laquelle le risque de poussées est réduit, et un retour de cette résistance *postpartum*, période associée avec une augmentation de ce risque.

Ainsi, des auteurs ont proposé que cette résistance aux glucocorticoïdes observée chez les patients SEP avait deux origines (Mohr et Pelletier, 2006). Premièrement, les patients ayant vécu un évènement stressant sont plus à même d'avoir connu une élévation des concentrations plasmatiques de glucocorticoïdes capables d'induire une résistance à ceux-ci (Miller *et al.*, 2002). Deuxièmement, l'inflammation chronique modérée observée chez les patients atteints de SEP serait responsable d'une hypercortisolémie modérée conduisant à l'apparition de la résistance aux glucocorticoïdes (Then Bergh *et al.*, 1999 ; Tortorella *et al.*, 1999). Ainsi, dans ces conditions de résistance aux glucocorticoïdes, la survenue d'une augmentation de la réaction auto-immune, aussi faible soit elle, échapperait au contrôle par l'axe HPA offrant la possibilité à l'exacerbation de la pathologie.

II.3.4. L'hypothèse d'une aggravation médiée par les mastocytes et la microglie.

Les mastocytes, tout particulièrement par l'intermédiaire de leur production de tryptase, d'histamine et de TNF α , favorisent l'ouverture de la BHE (Zappulla *et al.*, 2002). De plus, il a été montré qu'un stress aigu entraînait une augmentation de la perméabilité de la BHE (Esposito *et al.*, 2001). Ces auteurs ont également pu mettre en évidence que le traitement des animaux avec du cromoglycate sodique, un « stabilisateur des mastocytes », inhibait l'effet du stress aigu sur l'ouverture de la BHE, suggérant de ce fait un rôle des mastocytes dans cette dernière. L'implication de ces cellules a été appuyée par d'autres

travaux de cette équipe ayant mis en évidence, chez des souris stressées déficientes en mastocytes, une absence d'augmentation de la perméabilité de la BHE (Esposito *et al.*, 2002). De plus, alors qu'un traitement par injection localisée de CRH au niveau de l'hypothalamus entraînait une augmentation de l'ouverture de la BHE, un prétraitement au cromoglycate sodique semblait inhiber cet effet suggérant un rôle de cette neurohormone dans l'activation des mastocytes. Outre l'augmentation de leur activation induite par le stress, il a été observé un nombre de mastocytes plus élevé dans de nombreuses régions cérébrales chez des souris soumises à un stress de défaite sociale (Figure 21 ; Cirulli *et al.*, 1998).

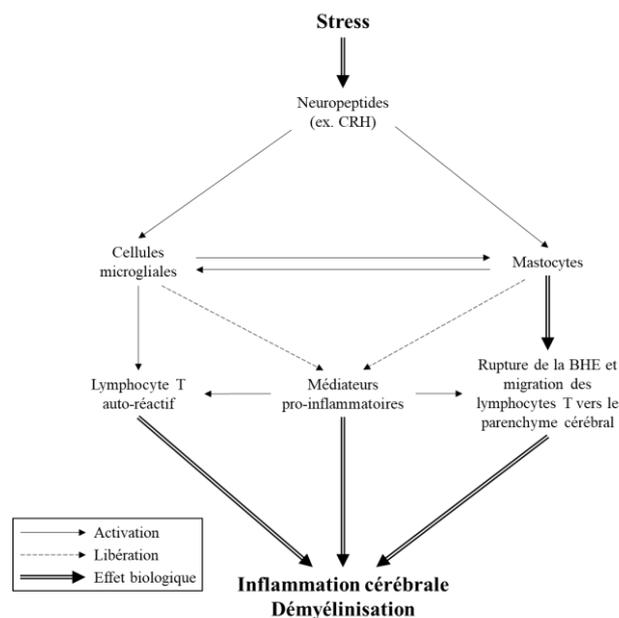


Figure 21 : Représentation schématique des effets du stress sur l'inflammation cérébrale et la démyélinisation médiés par les mastocytes et les cellules microgliales. BHE : Barrière Hémato-Encéphalique ; CRH : Corticotropin Releasing Hormone. Adaptée de Karagkouni *et al.*, 2013.

De manière similaire, le stress est capable d'activer les cellules microgliales. En effet, des rats soumis à un stress d'exposition au froid montrent une activation de leurs cellules microgliales qui peut être directement induite par l'augmentation des concentrations de CRH (Sugama *et al.*, 2011). En effet, le traitement de cellules microgliales en culture avec de la CRH induit leur prolifération et leur sécrétion de TNF α (Wang *et al.*, 2003). De plus, la tryptase produite par les mastocytes est capable d'activer les cellules microgliales et ainsi de permettre leur production de certaines cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1, l'IL-6 et le TNF α (Zhang *et al.*, 2012).

Ainsi, l'activation par le stress des mastocytes et des cellules microgliales participerait au moins en partie à l'augmentation du risque d'exacerbation de la SEP observée chez les patients par l'intermédiaire à la fois d'une rupture de la BHE et de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (Figure 21).

II.4. Stratégies de réduction du stress.

L'application de stratégies de réduction de stress dans la modulation de la SEP connaît un véritable essor depuis une dizaine d'années. David C. Mohr, ayant été impliqué dans de nombreuses études sur les effets du stress dans la SEP dans les années 2000s, fût l'un des premiers à proposer un programme standardisé de gestion du stress pour des patients atteints de SEP (Mohr, 2010). Par la suite, Mohr et ses collaborateurs ont pu montrer que le suivi de ce programme par des patients atteints de SEP diminuait à la fois le stress ressenti par les patients mais également le nombre de nouvelles lésions actives en IRM (23.2% des patients suivant ce programme avaient présenté de nouvelles lésions T1 Gd⁺ en IRM pendant la thérapie contre 45.3% chez les patients contrôles ; Mohr *et al.*, 2012). De plus, seulement 30.5% des patients suivant le programme avaient présenté de nouvelles lésions T2 contre 57.3% des patients contrôles. Cependant, les effets d'une telle thérapie de gestion de stress ne s'avèrent pas être durables du fait qu'aucun bénéfice de celle-ci n'ait pu être observé six mois après la fin du programme.

D'autres études se sont récemment intéressées aux effets d'une réduction du stress basée sur la méditation pleine conscience. En effet, il a été montré que la méditation pleine conscience permettait d'augmenter la fraction d'anisotropie en imagerie par tenseur de diffusion, reflet d'une plus grande connectivité fonctionnelle et d'une meilleure qualité de la gaine de myéline (Tang *et al.*, 2012). D'autres auteurs sont parvenus à mimer les effets de la méditation chez la souris. En effet, celle-ci induit chez l'humain une augmentation des rythmes thêta (4-8 Hz) en électroencéphalogramme (EEG) notamment au niveau du cortex cingulaire antérieur (Cahn et Polich, 2006). Ainsi, ces auteurs sont parvenus à réduire l'anxiété chez des souris dont le cortex cingulaire antérieur était stimulé par des ondes lentes (entre 1 et 8 Hz ; Weible *et al.*, 2017). Dans une autre étude, le même groupe a pu mettre en évidence que de telles stimulations chez la souris permettaient d'augmenter la prolifération des oligodendrocytes et diminuer le g-ratio, reflet d'une meilleure compaction de la gaine de myéline, au niveau du corps

calles (Piscopo *et al.*, 2018). Ainsi, la méditation pleine conscience, du fait de l'augmentation de l'activité thêta, pourrait permettre, chez les patients atteints de SEP, la mobilisation et la prolifération des oligodendrocytes et ainsi réduire la survenue de symptômes neurologiques. Cependant, bien que de très nombreuses études aient montré un effet bénéfique de thérapies de gestion du stress basées sur la méditation pleine conscience sur la qualité de vie des patients (réduction du stress perçu, de l'anxiété, de la fatigue, de la douleur, etc. ; Simpson *et al.*, 2017 ; Agland *et al.*, 2018 ; Kolahkaj *et al.*, 2018 ; Senders *et al.*, 2019), aucune à notre connaissance ne s'est réellement intéressée aux conséquences cliniques et physiopathologiques de telles stratégies chez les patients atteints de SEP.

II.4.1. L'enrichissement environnemental : une stratégie de réduction du stress chez l'animal ?

L'enrichissement environnemental correspond à des conditions d'hébergement des animaux permettant d'augmenter les stimulations sensibles, cognitives, motrices et sociales par rapport aux conditions standard d'hébergement des animaux de laboratoire (Figure 22 ; Nithianantharajah et Hannan, 2006). Ce paradigme est décrit comme étant un parallèle d'une augmentation de l'activité sociale, physique et intellectuelle chez l'humain (Li et Tang, 2005).

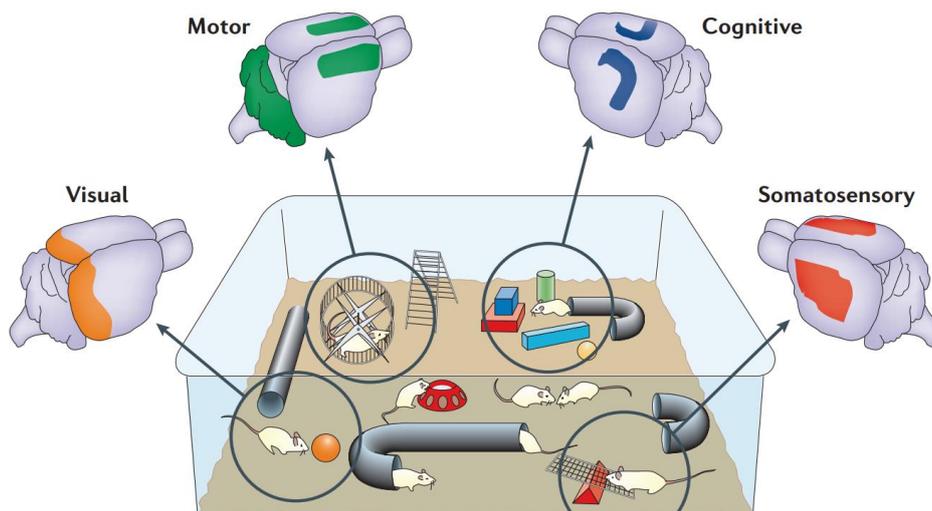


Figure 22 : Effets de l'enrichissement environnemental sur les fonctions sensibles, cognitives, motrices et visuelles et les différentes aires cérébrales stimulées. L'enrichissement environnemental promeut l'activation et la plasticité neuronale dans de multiples régions cérébrales par l'intermédiaire d'une grande diversité d'objets permettant de stimuler les activités sensibles, cognitives, motrices et visuelles des animaux. L'activité sociale est elle aussi augmentée du fait du grand nombre d'individus hébergés dans ce type d'environnement. Figure extraite de Nithianantharajah et Hannan, 2006.

Cependant, il n'existe toujours pas à ce jour de consensus quant à la nature exacte du paradigme utilisé pour étudier les effets de cet enrichissement environnemental. En effet, les conditions d'enrichissement varient parfois beaucoup entre les études. Cependant, la plupart d'entre elles ont en commun le souhait d'apporter de la complexité à l'environnement, par l'ajout de nombreux objets capables d'augmenter les stimulations visuelles, olfactives et somatosensorielles. De plus, la majorité des études s'intéresse à apporter de la nouveauté grâce au changement des objets et/ou de leur positionnement dans l'environnement. Enfin, les paradigmes utilisés varient également quant à l'âge auquel les animaux sont placés dans cet environnement particulier ainsi que la durée de leur hébergement. Ces deux facteurs peuvent en effet fortement influencer sur les bénéfices de ces conditions d'hébergement. Par exemple, il semble que des animaux soumis à l'enrichissement environnemental avant l'âge adulte (avant l'âge de 8 semaines) présenteraient une augmentation de la plasticité cérébrale supérieure à celle observée chez des animaux hébergés dans les mêmes conditions plus tardivement (Nithianantharajah et Hannan, 2006). De plus, de telles études sur les effets d'un environnement enrichi peuvent présenter des différences quant aux conditions contrôles utilisées. Par exemple, certains auteurs estiment que la condition d'hébergement contrôle la plus adaptée consiste à héberger un animal seul dans sa cage, sans accès à un quelconque enrichissement tels que des objets permettant sa nidification. Cependant, l'évolution des mœurs quant au respect du bien-être des animaux de laboratoire a amené progressivement à utiliser des conditions contrôles moins drastiques permettant le maintien de quelques interactions sociales et une présence minimale de matériel d'enrichissement.

Malgré les grandes variabilités quant aux paradigmes d'enrichissement environnemental utilisés, de nombreux effets, parfois drastiques, ont pu être mis en évidence à la fois dans des conditions physiologiques et dans des modèles de nombreuses pathologies. Nous exposerons dans la prochaine partie les grands effets d'un tel enrichissement de l'environnement sur la plasticité cérébrale (dans des conditions physiologiques). Ensuite, nous nous intéresserons aux effets de ces conditions d'hébergement sur les stress avant de discuter des effets observés dans les modèles animaux de SEP.

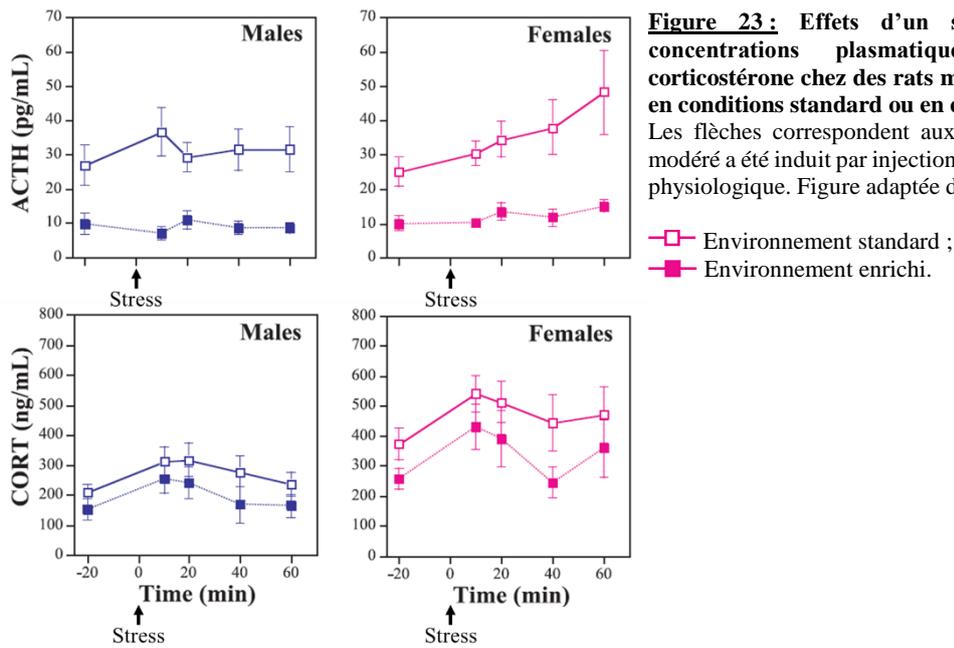
II.4.1.1. Enrichissement environnemental et plasticité cérébrale.

Les premières études s'intéressant aux effets de l'enrichissement environnemental sur la plasticité cérébrale remontent à la fin des années 1960s et au début des années 1970s. Dans l'une d'elles, les auteurs ont utilisé un paradigme d'enrichissement souvent retrouvé dans les études plus récentes, à savoir un hébergement dans des groupes sociaux plus importants (10 à 12 animaux), la présence d'objets divers modifiés quotidiennement (tunnels, balançoires, échelles) ainsi que l'utilisation quotidienne d'un labyrinthe pendant 30 minutes (Diamond *et al.*, 1972). Dans ces travaux, les auteurs ont mis en évidence une augmentation de la masse corticale et de l'épaisseur du cortex de rats hébergés dans de telles conditions enrichies comparativement à des animaux hébergés dans un environnement appauvri. De plus, l'enrichissement environnemental augmente la ramification et la longueur des dendrites ainsi que leur nombre dans diverses régions cérébrales (Greenough et Volkmar, 1973 ; Connor *et al.*, 1982 ; Faherty *et al.*, 2003). L'enrichissement environnemental stimule également la neurogénèse hippocampique notamment par l'intermédiaire d'une augmentation de la production locale de VEGF (pour « Vascular Endothelial Growth Factor ») mais également par l'intermédiaire du recrutement de lymphocytes T et de l'activation de cellules microgliales (Kempermann *et al.*, 1998 ; During *et al.*, 2006 ; Ziv *et al.*, 2006). L'enrichissement environnemental induit de plus une augmentation de la synthèse de facteurs neurotrophiques tels que le BDNF (pour « Brain-Derived Neurotrophic Factor ») et le NGF (pour « Nerve Growth Factor ») dans de multiples régions cérébrales (Ickes *et al.*, 2000). De plus, des animaux hébergés dans de telles conditions présentent une potentialisation à long terme (LTP) plus efficiente permise par l'augmentation de l'expression des récepteurs au NMDA (pour « N-Methyl-D-Aspartate ») et des récepteurs à l'AMPA (pour « alpha-Amino-3-hydroxy-5-Methyl-4-isoxazolePropionic Acid » ; Foster et Dumas, 2001 ; Tang *et al.*, 2001 ; Naka *et al.*, 2005). L'augmentation globale de la plasticité cérébrale par l'enrichissement environnemental telle qu'illustrée par les études citées ci-dessus se traduit notamment par une augmentation des capacités d'apprentissage et de mémoire chez les animaux (Tang *et al.*, 2001). Enfin, l'enrichissement de l'environnement permet de réduire le niveau d'anxiété des animaux et d'atténuer leurs réponses à des événements stressants (Benaroya-Milshtein *et al.*, 2004). Cependant, les données de la littérature sur les effets de tels

environnements enrichis sur le stress ne sont pas unanimes. La prochaine partie s'intéressera à approfondir ce point.

II.4.1.2. Enrichissement environnemental et stress.

L'enrichissement environnemental semble dans la majorité des études être associé à une diminution de la réponse à un évènement stressant. Par exemple, dans une étude publiée en 2002, les auteurs ont montré que des rats hébergés à mesure de 8 individus dans une grande cage contenant divers objets tels que des roues, des échelles, des tunnels et des balles étaient par la suite moins affectés par un stress psychologique (réexposition à un environnement aversif précédemment conditionné par des chocs électriques) que des animaux ayant été hébergés dans un environnement appauvri (1 animal par cage en l'absence de tout objet potentiellement stimulant ; Larsson *et al.*, 2002). Cependant, les auteurs de cette étude ne se sont pas intéressés aux mécanismes physiologiques sous-jacents. Ainsi, une autre étude publiée un an plus tard s'est intéressée aux concentrations plasmatiques des hormones du stress (*i.e.* ACTH et corticostérone) chez des animaux hébergés en conditions standard ou enrichies (Belz *et al.*, 2003). Dans cette étude, les auteurs ont observé une diminution des concentrations basales d'ACTH et de corticostérone chez des rats hébergés dans un environnement enrichi par rapport à des animaux hébergés en conditions standard (Figure 23). De plus, les animaux hébergés dans des conditions d'enrichissement de l'environnement présentaient une augmentation moindre des concentrations plasmatiques d'ACTH en réponse à un stress modéré (injection intra-péritonéale de sérum physiologique) comparativement aux animaux hébergés dans un environnement standard. Cependant, aucune différence significative dans la réponse au stress n'était observée entre les animaux hébergés en environnement enrichi et ceux hébergés en environnement standard en termes de concentrations plasmatiques de corticostérone (Figure 23).



Ainsi, l'enrichissement environnemental semble diminuer la réactivité de l'axe HPA. Cependant, les conditions d'enrichissement dans cette étude étaient très sommaires, puisqu'il ne s'agissait que de la mise à disposition aux animaux de matériel de nidification et d'un jouet. D'autres auteurs ont étonnamment montré à l'inverse que des rats hébergés en environnement enrichi (par nombre de 5 dans une grande cage avec accès à des échelles, des tunnels et des roues) présentaient des concentrations plasmatiques basales de corticostérone plus élevées que leurs homologues hébergés en conditions contrôles (10 animaux par cage dépourvue de tout objet ; Benaroya-Milshtein *et al.*, 2004). De plus, alors que l'exposition des animaux contrôles à un stress psychologique (réexposition à un environnement aversif précédemment conditionné par des chocs électriques) entraînait une augmentation des concentrations plasmatiques de corticostérone, une telle augmentation n'était pas observée chez les animaux hébergés dans un environnement enrichi. Ainsi, d'autres auteurs ont émis une hypothèse selon laquelle, pour les animaux, vivre dans un environnement complexe et interagir de manière non agressive avec leurs conspécifiques pouvait être considéré comme un stress chronique modéré, réduisant leur susceptibilité à des événements stressants subséquents (Crofton *et al.*, 2015). Cette hypothèse semble appuyée par une étude plus récente dans laquelle aucune différence dans les concentrations plasmatiques basales de corticostérone n'était observée entre des rats hébergés en environnement enrichi et des rats hébergés en condition standard (Novaes *et al.*, 2017). De plus, aucune

différence dans les concentrations plasmatiques de corticostérone n’était observée à la suite d’un stress aigu de contention entre des animaux soumis à un enrichissement environnemental et des animaux contrôles, bien que les animaux hébergés en environnement enrichi étaient résistants à l’anxiété induite par un tel stress. Les auteurs ont cependant observé une diminution de la translocation nucléaire des GR exprimés par les neurones de l’amygdale basolatérale chez ces animaux, suggérant le développement d’une résistance aux glucocorticoïdes induite par l’enrichissement environnemental. D’autres études réalisées chez l’humain semblent corroborer cette hypothèse de résilience au stress par une exposition préalable à des événements modérément stressants (Seery *et al.*, 2013). Cependant, il est nécessaire de noter que ce phénomène de résilience n’est permis que par une exposition préalable à des stress modérés tandis que des événements stressants sévères pendant l’enfance semblent à l’inverse augmenter la susceptibilité au stress à l’âge adulte (Parker et Maestripiéri, 2011).

Ainsi, bien que les mécanismes sous-jacents suggérés diffèrent en fonction des auteurs, l’ensemble des études présentées précédemment semble converger vers une diminution des effets du stress par l’enrichissement environnemental (Table 8).

Etude	Espèce/souche (sexe/âge)	Conditions d’hébergement	Durée	Stress	Principaux résultats
Larsson <i>et al.</i> , 2002	Rat/Sprague-Dawley (♂/12 semaines)	<u>Environnement enrichi</u> : 8 animaux par cage (100 x 60 x 35 cm). Roues, échelles, tunnels et balles. Renouvellement quotidien. <u>Environnement appauvri</u> : 1 animal par cage (16.5 x 22.5 x 13.5 cm). Aucun objet.	30 jours	Réexposition à un environnement aversif conditionné.	<u>Tests comportementaux</u> (Openfield, Morris Water Maze) : Les rats hébergés en EE sont moins affectés par le stress que les animaux hébergés en conditions appauvries.
Belz <i>et al.</i> , 2003	Rat/Sprague-Dawley (♀ et ♂/8 semaines)	<u>Environnement enrichi</u> : 1 animal par cage (24 x 46 x 20 cm). King Toy et Nestlets. Nestlets renouvelés tous les 3 jours. <u>Environnement contrôlé</u> : 1 animal par cage (24 x 46 x 20 cm). Aucun objet.	ND	Injection intrapéritonéale de sérum physiologique	<u>Concentrations plasmatiques d’ACTH et de CORT</u> : - ↓ ACTH et CORT basales chez animaux hébergés en EE. - Stress : ↑ ACTH et CORT chez animaux hébergés en EC. - Stress : = ACTH chez animaux hébergés en EE ; pas d’effet sur CORT.
Benaroya-Milshtein <i>et al.</i> , 2004	Souris/C3H/eB (♂/4 semaines)	<u>Environnement enrichi</u> : 5 animaux par cage (47 x 30 x 22.5 cm). Roues, échelles et tunnels. Renouvellement hebdomadaire. <u>Environnement contrôlé</u> : 10 animaux par cage (31 x 22 x 15 cm). Aucun objet.	3 mois	Réexposition à un environnement aversif conditionné.	<u>Tests comportementaux</u> : - ↑ locomotion (Staircase test), - ↓ freezing (Réexposition à l’environnement aversif), - ↓ anxiété (Elevated Plus Maze) chez animaux hébergés en EE. <u>Concentrations plasmatiques de CORT</u> : - ↑ CORT basale chez animaux hébergés en EE. - Stress : ↑ CORT chez animaux hébergés en EC. - Stress : = CORT chez animaux hébergés en EE.
Novaes <i>et al.</i> , 2017	Rat/Wistar (♂/8 semaines)	<u>Environnement enrichi</u> : 2 animaux par cage (30 x 45 x 25 cm). Jouets, balles, objets en bois, tunnels, escaliers, plate-forme surélevée, matériels de nidification. Renouvellement tous les 2 jours. <u>Environnement contrôlé</u> : 2 animaux par cage (30 x 37 x 18 cm). Aucun objet.	14 jours	Stress aigu de contention (1 session / 1h)	<u>Tests comportementaux</u> (Elevated Plus Maze, Light-dark box) : ↓ anxiété chez animaux hébergés en EE. <u>Concentrations plasmatiques de CORT</u> : - Pas d’effet de l’EE sur les concentrations basales de CORT, - Ni sur les concentrations de CORT après le stress. <u>Western blot GR</u> : - Stress : ↑ translocation nucléaires des GR chez animaux hébergés en EC, - Pas d’effets chez les animaux hébergés en EE.

Table 8 : Caractéristiques des études concernant les effets de l’enrichissement environnemental sur la réponse au stress chez les rongeurs. ND : Non Disponible ; EE : Environnement Enrichi ; EC : Environnement Contrôlé ; ACTH : AdrenoCorticoTropic Hormone ; CORT : Corticostérone ; GR : Récepteurs aux Glucocorticoïdes ; ↑ : augmentation ; ↓ : diminution ; = : pas d’évolution.

Ainsi, l'enrichissement environnemental pourrait présenter des effets protecteurs dans les modèles animaux de SEP par deux mécanismes distincts : l'augmentation de la plasticité cérébrale et la diminution de la susceptibilité au stress. Cependant, peu d'études se sont intéressées aux effets d'un tel environnement dans les modèles animaux de SEP. Nous présenterons les principaux résultats de celles-ci dans la partie suivante.

II.4.2. Enrichissement environnemental dans des modèles animaux de SEP.

La première étude, à notre connaissance, s'étant intéressée aux effets de l'enrichissement environnemental dans des modèles animaux de SEP a été publiée en 2007 (Table 9 ; Magalon *et al.*, 2007). Dans celle-ci, les auteurs se sont intéressés aux effets de telles conditions d'hébergement dans deux modèles distincts : une démyélinisation focale par injection de lysolécithine dans le corps calleux de souris CD1 et une EAE par immunisation de souris C57BL/6J contre le peptide MOG₃₅₋₅₅. Ces auteurs ont dans un premier temps observé que l'enrichissement environnemental tendait à retarder l'apparition des symptômes moteurs dans l'EAE par rapport à des animaux hébergés en conditions contrôles (Figure 24A ; jour 18.1 ± 0.8 contre 16.2 ± 0.5 respectivement). De plus, l'enrichissement environnemental permet aux animaux une récupération complète des symptômes moteurs contrairement aux animaux hébergés dans un environnement standard (Figure 24B).

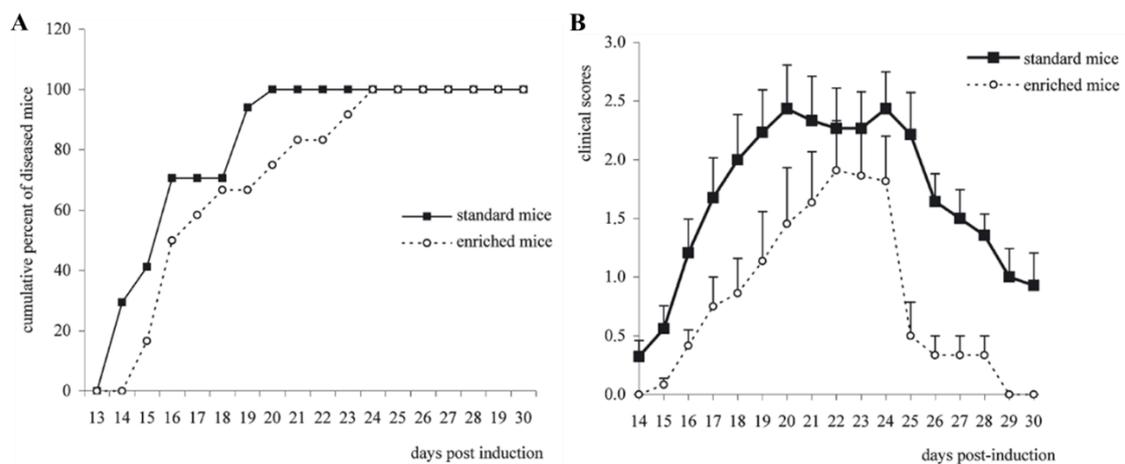


Figure 24 : Effets de l'enrichissement environnemental sur des souris immunisées contre le peptide MOG₃₅₋₅₅. (A) Les souris hébergées en environnement enrichi montrent un retard d'apparition des premiers signes cliniques de la maladie par rapport aux animaux hébergés dans un environnement standard. (B) Evolution des scores cliniques moyens montrant une récupération complète des symptômes moteurs chez des souris hébergées en environnement enrichi contrairement à des souris hébergées en environnement standard. Figure adaptée de Magalon *et al.*, 2007.

En outre, les auteurs de cette étude ont mis en évidence une potentialisation par l'enrichissement environnemental de la prolifération des progéniteurs neuraux de la zone sous-ventriculaire (SVZ) dans l'EAE comparativement aux animaux hébergés dans un environnement contrôlé (+79% contre +42% respectivement). Enfin, l'enrichissement environnemental augmente le recrutement des progéniteurs neuraux de la SVZ vers les lésions de la substance blanche et promeut leur engagement dans un phénotype oligodendrocytaire. Des résultats similaires ont été obtenus dans le cadre des lésions focales par injection de lysolécithine. Ainsi, l'enrichissement environnemental semble bénéfique dans ces deux modèles animaux de SEP, et notamment dans la récupération fonctionnelle par le biais d'un recrutement accru des progéniteurs neuraux de la SVZ.

Une étude plus récente a également permis de mettre en évidence un effet protecteur de l'enrichissement environnemental dans l'EAE. Dans cette étude, les auteurs ont montré que, bien qu'il n'y ait pas de différence dans le jour moyen d'apparition des symptômes moteurs, des souris immunisées contre le peptide MOG₃₅₋₅₅ et hébergées dans un environnement enrichi présentaient des scores cliniques cumulés bien inférieurs à ceux des souris hébergées dans un environnement standard (3.41 ± 0.348 contre 16.27 ± 0.53 respectivement ; Figure 25A ; Table 9 ; Bonfiglio *et al.*, 2019). De plus, alors que les animaux EAE hébergés dans de telles conditions standards montrent une diminution de leur activité motrice spontanée, cet effet semble inhibé chez les animaux hébergés en environnement enrichi. Enfin, les auteurs ont mis en évidence une diminution de la démyélinisation dans la moelle épinière des souris EAE hébergées en environnement enrichi par rapport à des souris hébergées en environnement standard (Figure 25B), sans pour autant observer de différences dans le nombre de cellules mononucléées infiltrées (Figure 25C). Seule une diminution de la production *in situ* d'IL-1 β chez les souris EAE hébergées en environnement enrichi a été observée (Bonfiglio *et al.*, 2019).

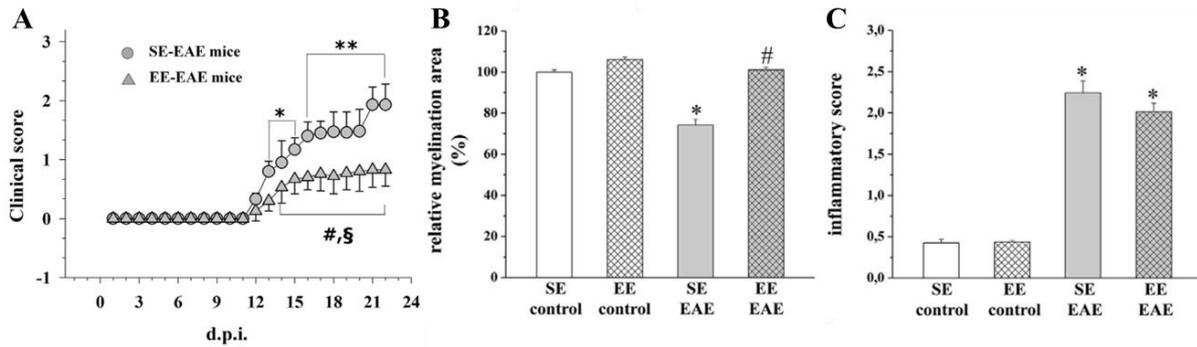


Figure 25 : Effets de l'enrichissement environnemental sur le score clinique moyen (A), sur la démyélinisation (B) ainsi que sur l'infiltration leucocytaire (C) au niveau de la moelle épinière de souris EAE-MOG et contrôles.

A : * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs score clinique au jour 1 post-immunisation chez les animaux du groupe SE-EAE ; # $P < 0.05$ vs score clinique au jour 1 post-immunisation chez les animaux du groupe EE-EAE ; § $P < 0.05$: SE-EAE vs EE-EAE. B-C : * $P < 0.05$ vs SE-control ; # $P < 0.05$ vs SE-EAE. SE : Environnement Standard ; EE : Environnement Enrichi. Figure adaptée de Bonfiglio *et al.*, 2019.

Une autre étude publiée la même année a également pu mettre en évidence une diminution de la sévérité de l'EAE induite par le peptide MOG₃₅₋₅₅ et une diminution de la démyélinisation chez des animaux hébergés en environnement enrichi par rapport à leurs homologues hébergés en environnement standard, mais a également montré une diminution des infiltrats de cellules immunitaires dans la moelle épinière de ces mêmes animaux (Table 9 ; Xiao *et al.*, 2019). Les auteurs de cette étude ont également pu mettre en évidence que l'effet protecteur de l'enrichissement environnemental résultait d'une diminution de la prolifération et de la différenciation des thymocytes, notamment par l'intermédiaire d'une augmentation des productions hypothalamiques de BDNF et de CRH, et des concentrations plasmatiques de corticostérone. En effet, une surexpression de BDNF au niveau de l'hypothalamus d'animaux contrôles était à elle seule capable de reproduire les effets de l'enrichissement environnemental sur le nombre et la différenciation des thymocytes. A l'inverse, le blocage spécifique de l'expression de BDNF chez des animaux hébergés en environnement enrichi inhibait les effets thymiques de celui-ci, et diminuait également la production de CRH de l'ordre de 40%. Les auteurs se sont alors intéressés au rôle de l'axe HPA dans les effets immuno-régulateurs observés de l'enrichissement environnemental. Une adrénalectomie réalisée chez des animaux hébergés en environnement enrichi inhibait les effets thymiques de celui-ci. Des résultats identiques étaient obtenus par un knockout conditionnel des GR exprimés par les thymocytes, suggérant que les effets protecteurs de l'enrichissement environnemental étaient médiés par l'augmentation des concentrations plasmatiques de corticostérone et de son action immuno-régulatrice directe sur les thymocytes. De plus,

l'enrichissement environnemental entraîne une diminution des populations de lymphocytes Th1 et Th17 et une augmentation des populations Th2 et Treg au niveau du SNC des animaux EAE, entraînant de ce fait la diminution de sa sévérité. Cependant, un tel knockout conditionnel des GR abroge la majorité de ces changements, et réduit de ce fait l'atténuation de l'EAE par l'enrichissement environnemental. Enfin, de manière intéressante, les auteurs de cette étude ont montré que le transfert adoptif de thymocytes issus de souris hébergées dans un environnement enrichi à des souris hébergées en conditions standard permettait de réduire la sévérité de l'EAE, suggérant que l'enrichissement environnemental procure aux thymocytes un phénotype immunosuppresseur durable.

Une autre étude publiée en 2020 s'est quant à elle majoritairement intéressée aux effets de l'enrichissement environnemental sur les symptômes cognitifs dans un modèle de dommages corticaux focaux induits par une injection stéréotaxique de vecteurs adénoviraux exprimant l'IL-1 β au niveau du cortex préfrontal gauche (Silva *et al.*, 2020). Dans ce modèle, les auteurs ont pu mettre en évidence que l'enrichissement environnemental diminuait l'anxiété, les déficits cognitifs (en particulier concernant la mémoire immédiate), et l'anhédonie observés dans ce modèle chez des animaux hébergés en condition standard. De plus, les auteurs ont pu mettre en évidence une réduction du volume inflammatoire au niveau de la zone d'injection de l'adénovirus ainsi qu'une diminution de l'activation des cellules microgliales et astrogliales chez les animaux hébergés en environnement enrichi. L'enrichissement environnemental permettait également de réduire la démyélinisation et la perte neuronale dans ce modèle. Enfin, les auteurs ont pu mettre en évidence que de telles conditions d'hébergement diminuaient la production *in situ* de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1 β , le TNF α et l'IL-6 et augmentaient inversement la production de cytokines anti-inflammatoires telles que le TGF- β et le BDNF.

Etude	Espèce/souche (sexe/âge)	Modèle animal de SEP	Conditions d'hébergement	Durée	Principaux effets de l'enrichissement environnemental
Magalon <i>et al.</i> , 2007	Souris/C57BL/6 (♂/7 semaines)	EAE-MOG ₃₅₋₅₅ + TNF α i.c. à J+10	<u>Environnement enrichi :</u> 6 animaux par cage (55 x 35 x 25 cm). Jouets, tunnels, cachettes, roues, matériaux odorants. Renouvellement tous les 2 jours.	De J0 à J+24-31 (EAE-MOG)	<u>Effets sur l'EAE :</u> Retarde l'apparition des symptômes moteurs. ↑ récupération fonctionnelle.
	ou Souris/CD1 (♂/3 semaines)	Lysolécithine i.c.	<u>Environnement standard :</u> 2 animaux par cage (32 x 13 x 14 cm). Aucun objet.	De J-7 à J+7 (lysolécithine)	<u>Effets sur les progéniteurs de la SVZ :</u> ↑ prolifération, recrutement et engagement vers un phénotype oligodendrocytaire (EAE-MOG + Lysolécithine).
Bonfiglio <i>et al.</i> , 2019.	Souris/C57BL/6 (♀/4 semaines)	EAE-MOG ₃₅₋₅₅	<u>Environnement enrichi :</u> 8 animaux par cage (36 x 54 x 19 cm). Jouets, tunnels, boîte en carton, roues, échelles, matériels de nidification. Renouvellement tous les 2 jours.	De J-28 à J+21	<u>Effets sur l'EAE :</u> ↓ score cumulé. ↑ activité motrice spontanée.
			<u>Environnement standard :</u> 8 animaux par cage (21 x 37 x 14 cm). Matériels de nidification.		<u>Effets sur les fonctions synaptiques :</u> ↑ exocytose du glutamate. ↑ production d'AMPC ↑ expression de SNAP-25 et MUNC18.
Xiao <i>et al.</i> , 2020	Souris/C57BL/6 (♂ et ♀/3 semaines)	EAE-MOG ₃₅₋₅₅	<u>Environnement enrichi :</u> 20 animaux par cage (1.5 x 1.5 x 1.0 m). Jouets, tunnels, cabanes, roues, labyrinthes, matériels de nidification.	4-5 semaines	<u>Effets sur l'infiltration leucocytaire et la production de cytokines :</u> ↓ démyélinisation. = infiltrats de cellules mononucléées dans la moëlle épinière. ↓ production d'IL-1 β dans la moëlle épinière.
			<u>Environnement standard :</u> 5 animaux par cage (30.5 x 17 x 15 cm). Aucun objet.		<u>Effets sur des animaux naïfs :</u> ↓ prolifération et différenciation des thymocytes. ↑ expression hypothalamique BDNF et CRH. ↑ concentrations plasmatiques CORT. Adrénalectomie et KO-GR : inhibe effets de l'EE.
Silva <i>et al.</i> , 2020	Rat/Wistar (♂/8 semaines)	Injection adénovirus exprimant IL-1 β dans cortex préfrontal	<u>Environnement enrichi :</u> 7-8 animaux par cage (100 x 50 x 50 cm). Jouets, tunnels, cabanes, roues, échelles, matériels de nidification. Renouvellement 2 fois par semaine.	De J0 à J+28	<u>Effets comportementaux :</u> ↓ anxiété (Openfield, Elevated Plus Maze). ↓ déficits cognitifs (Novel Object Recognition). ↓ anhédonie (Sucrose Preference). <u>Effets sur la neuroinflammation et la démyélinisation :</u> ↓ volume inflammatoire, démyélinisation et perte neuronale. ↓ activation cellules microgliales et astrogliales. ↓ production IL-1 β , TNF α et IL-6. ↑ production TGF β et BDNF.

Table 9 : Caractéristiques des études sur les effets de l'enrichissement environnemental dans des modèles animaux de SEP. i.c. : injection intra-cérébrale ; SVZ : Zone Sous-Ventriculaire ; AMPc : Adénosine MonoPhosphate cyclique ; SNAP-25 : Synaptosomal-Associated Protein-25 ; MUNC-18 : Mammalian UNCoordinated-18 ; BDNF : Brain-Derived Neurotrophic Factor ; CRH : Corticotropin Releasing Hormone ; CORT : Corticostérone ; KO-GR : Knockout conditionnel des récepteurs aux glucocorticoïdes exprimés par les thymocytes ; EE : Environnement Enrichi ; ↑ : augmentation ; ↓ : diminution ; = : pas d'évolution.

Ainsi, toutes les études présentées précédemment confortent l'idée d'un effet protecteur de l'enrichissement environnemental dans les modèles animaux de SEP (Table 9). Cependant, bien qu'il ait été montré que des animaux hébergés en environnement enrichi présentaient des niveaux d'anxiété inférieurs aux animaux hébergés en environnement standard, aucune de ces études ne s'est intéressée aux effets de telles conditions d'hébergement sur la résilience à un stress aigu dans un modèle animal de SEP. De plus, les études présentées ici ne se sont intéressées qu'à deux principaux modèles, à savoir la PP-EAE et des modèles de démyélinisation ou dommages corticaux focaux. En effet, aucune étude n'est disponible concernant les effets d'un tel paradigme dans un modèle animal récurrent-rémittent de la pathologie, qui constitue pourtant la forme la plus fréquente de SEP.

Parmi les hypothèses permettant d'expliquer les effets délétères du stress dans le déclenchement et/ou l'évolution de la SEP (voir partie [II.3.](#)), nous avons volontairement omis de parler de l'une d'entre elles. En effet, un évènement stressant peut être à l'origine, à l'instar de ce qui est observé pour la BHE, d'une ouverture de la barrière intestinale (voir partie [III.4.2.](#)). De plus, de nombreuses études ont montré des modifications de l'homéostasie intestinale dans la SEP et ses modèles animaux. Nous nous intéresserons alors dans la prochaine partie à présenter les diverses implications de ce tissu particulier dans la physiopathologie de la SEP.

III. Inflammation intestinale et SEP.

III.1. Anatomie et physiologie du tractus intestinal.

Le tractus intestinal se compose de l'intestin grêle, lui-même subdivisés en trois parties que sont le duodénum, le jéjunum et l'iléum, et du côlon (Figure 26).

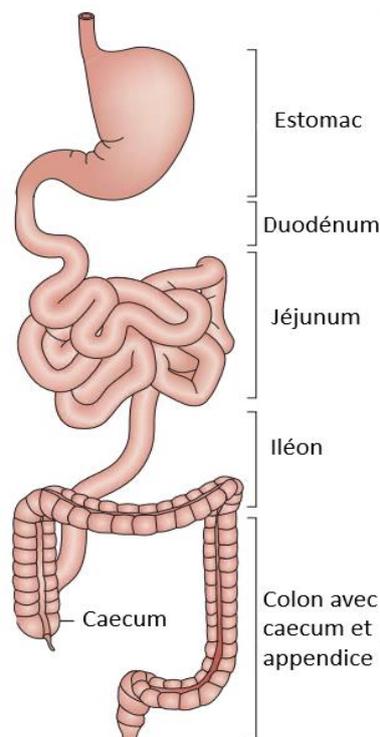


Figure 26 : Le tractus intestinal. Figure adaptée de Mowat et Agace, 2014.

Chacune de ces parties présentent à la fois une structure anatomique et des fonctions physiologiques distinctes que nous exposerons rapidement ci-après.

III.1.1. Anatomie et histologie intestinale.

III.1.1.1. *L'intestin grêle.*

L'intestin grêle constitue la plus grande partie du tractus intestinal puisqu'il mesure chez l'humain entre quatre et huit mètres de long. Sa paroi est constituée de quatre tuniques (Figure 27) :

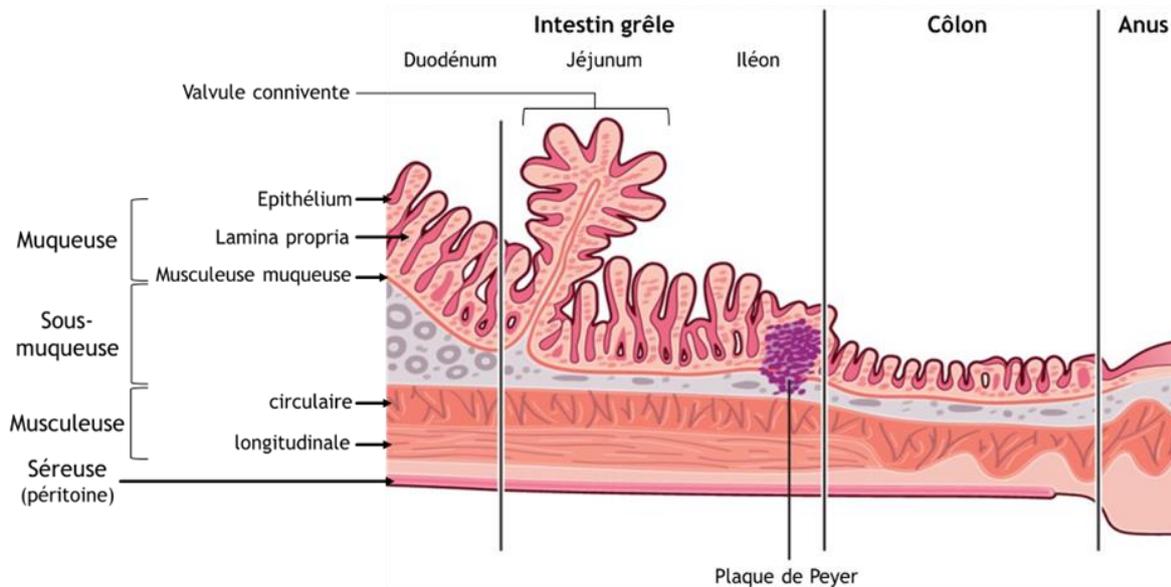


Figure 27 : Structuration anatomique du tractus intestinal. Illustration de Carole Fumat, adaptée de « Les fondamentaux de la pathologie digestive », CDU-HGE/Editions Elsevier-Masson, 2014

- La muqueuse formant des plis circulaires, autrement appelés valvules conniventes, qui se composent d'une alternance de villosités et de cryptes. Les villosités sont des expansions en doigt de gant recouvertes d'un épithélium constitué majoritairement d'entérocytes (cellules absorbantes présentant des microvillosités sur leur face apicale), de cellules caliciformes responsable de la sécrétion de mucus, de quelques cellules neuroendocrines ainsi que des lymphocytes intra-épithéliaux qui représentent environ 10% des cellules épithéliales (Olivares-Villagómez et Van Kaer, 2018). Les cryptes de Lieberkühn sont composées des mêmes types cellulaires mais présentent également des cellules spécialisées dans la régulation des populations microbiennes que sont les cellules de Paneth. Cet épithélium est notamment soutenu par un tissu conjonctif sous-jacent, la *lamina propria*, richement vascularisé et contenant entre autres de nombreuses cellules immunitaires (Figure 28).

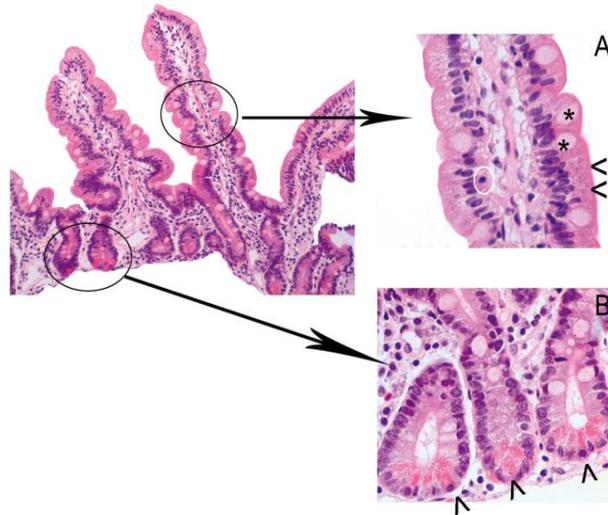


Figure 28 : Coupe histologique d'intestin grêle. A : Villosités avec entérocytes (<), cellules caliciformes (*) et lymphocytes intra-épithéliaux (cercle blanc) ; B : Cryptes de Lieberkühn avec cellules de Paneth (<). Source : Dominique Wendum, extrait de « Les fondamentaux de la pathologie digestive », CDU-HGE / Editions Elsevier-Masson, 2014.

- La sous-muqueuse, qui peut présenter des amas lymphoïdes s'étalant jusque dans la muqueuse. Ceux-ci constituent les plaques de Peyer qui sont particulièrement abondantes au niveau de l'iléon terminal.
- La musculature circulaire interne et la musculature longitudinale externe constituées de muscles lisses à l'origine du péristaltisme.
- La séreuse (le péritoine).

III.1.1.2. Le côlon.

Le côlon, d'un diamètre plus grand que l'intestin grêle, forme un angle qui entoure le jéjunum et l'iléum (Figure 29). Contrairement à ce dernier, il ne présente pas de dispositif d'amplification de surface. La couche musculaire externe a la particularité d'être discontinue et la couche musculaire interne de présenter des épaissements entre les bandes longitudinales appelées haustrations coliques.

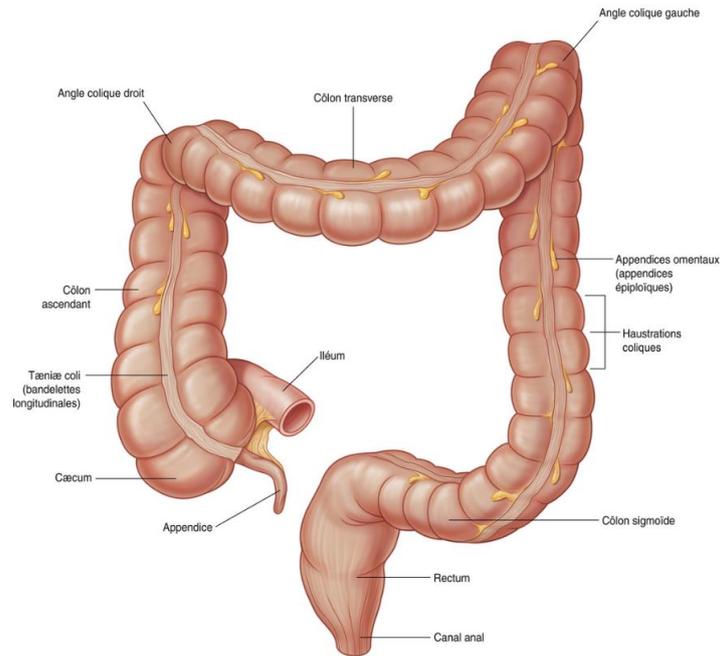


Figure 29 : Anatomie du côlon. Source : Gray's Anatomie – Le Manuel pour les étudiants, 4^e édition, Elsevier Health Sciences.

La muqueuse colique ressemble à celle de l'intestin grêle mais ne présente pas de villosités. En effet, celle-ci est exclusivement constituée de cryptes de Lieberkühn dont l'épithélium est constitué de colonocytes (cellules absorbantes), de cellules caliciformes, de quelques cellules neuroendocrines et de lymphocytes intra-épithéliaux (Figure 30). Il est de plus intéressant de noter la présence de cellules de Paneth uniquement au niveau du côlon ascendant. De plus, le nombre de cellules caliciformes augmente, aux dépens du nombre de colonocytes, à mesure que l'on progresse vers la partie terminale du côlon.

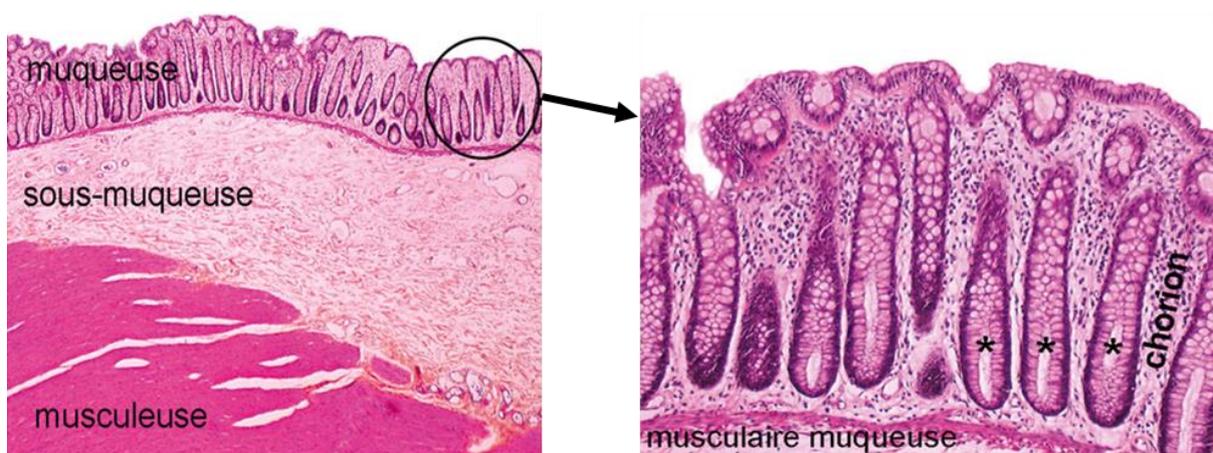


Figure 30 : Coupe histologique de côlon. La muqueuse colique est uniquement constituée de cryptes de Lieberkühn (*). Source : Dominique Wendum, extrait de « Les fondamentaux de la pathologie digestive », CDU-HGE / Editions Elsevier-Masson, 2014.

III.1.2. Physiologie intestinale.

L'intestin grêle a pour fonction principale la digestion des aliments et l'absorption des nutriments. Le duodénum est le siège du mélange entre les sécrétions pancréatiques et le chyme alimentaire, permettant sa digestion. L'absorption des nutriments en découlant n'y est que très peu régulée. A l'inverse, le jéjunum, notamment grâce à la présence des plis circulaires à l'origine d'une très grande surface d'absorption, constitue le principal site d'absorption des nutriments. L'intestin grêle est également le siège de nombreux mouvements hydroélectrolytiques par voie para- ou trans-cellulaires (à travers la bicouche phospholipidique ou par l'intermédiaire d'aquaporines) permettant le maintien de l'homéostasie de l'organisme.

Le côlon est lui aussi le siège de nombreux mouvements hydroélectrolytiques. Cependant, à l'inverse de l'intestin grêle, il n'est pas un site privilégié d'absorption des nutriments, notamment en raison de l'absence de dispositifs d'amplification de surface dans sa muqueuse. Malgré tout, l'abondance de divers microorganismes commensaux dans cette structure (microbiote colique), dont il sera sujet plus tard dans le présent manuscrit (voir partie [III.3.](#)), permet la récupération de l'énergie résiduelle de certains aliments non digérés par l'hôte.

III.2. Système immunitaire intestinal.

La muqueuse intestinale constitue la plus grande surface de contact d'un organisme avec le milieu extérieur. Le tissu intestinal nécessite par conséquent un système de défense complexe contre des agents potentiellement pathogènes. A ce titre, le tractus intestinal présente une très grande variété de cellules immunitaires (appartenant aux composantes innée et adaptative), ainsi qu'un système de drainage lymphatique complexe au plus près de l'environnement externe, notamment par l'intermédiaire des chylifères directement implantés dans la *lamina propria* (Figure 31). Nous présenterons dans les prochaines parties les divers mécanismes de défense intrinsèques au tractus intestinal.

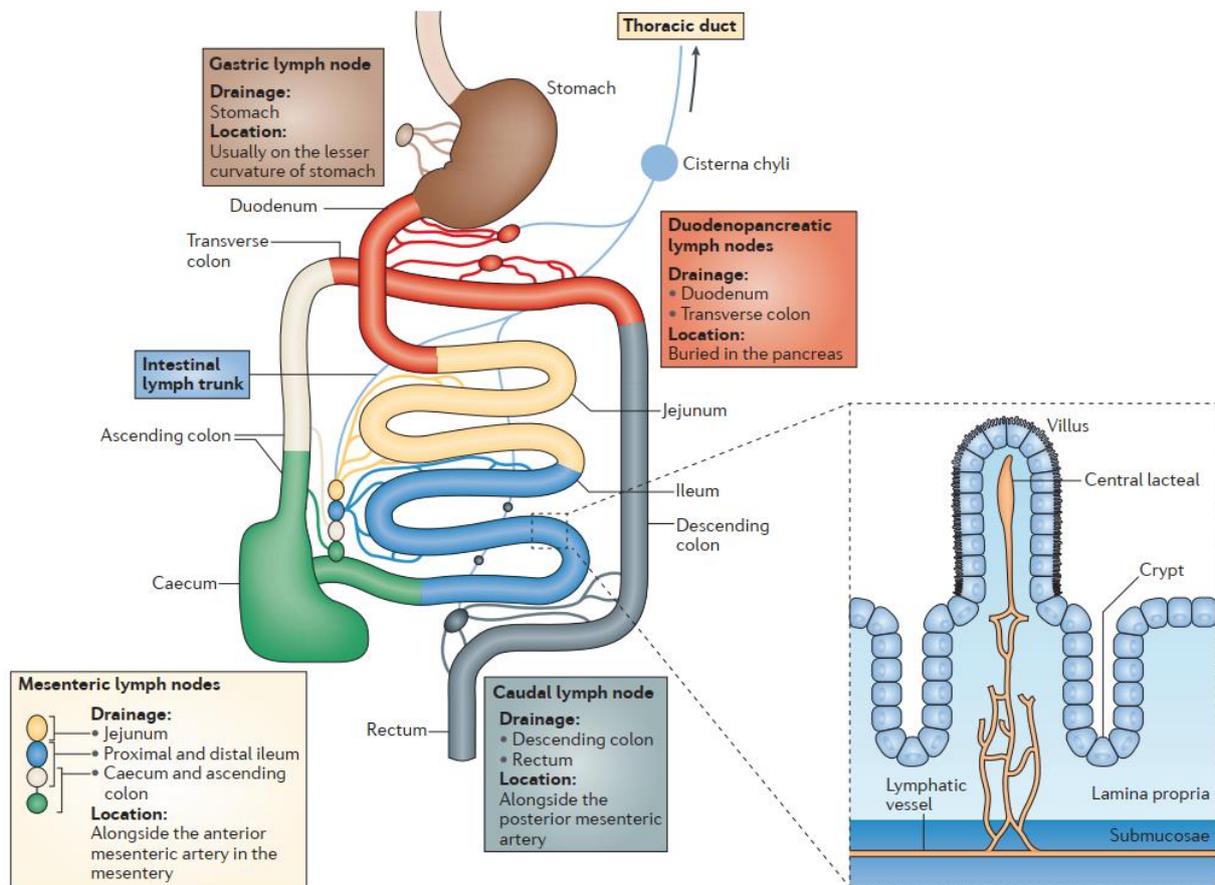


Figure 31 : Système de drainage lymphatique gastro-intestinal chez la souris.

Diverses régions du tractus gastro-intestinal sont couvertes par des vaisseaux et des nœuds lymphatiques dédiés. Des canaux présents dans les villosités intestinales (chylifères) permettent le transit de la lymphe luminale et interstitielle vers le réseau lymphatique sous-muqueux. La lymphe rejoint ensuite les ganglions lymphatiques (nœuds lymphatiques gastrique, duodéno-pancréatique, mésentérique et caudal) avant de rejoindre la circulation systémique par l'intermédiaire du canal thoracique. Source : Mowat et Agace, 2014.

III.2.1. La composante innée de l'immunité intestinale.

III.2.1.1. La barrière muqueuse intestinale.

La première ligne de défense d'un organisme consiste dans la limitation du passage des agents pathogènes dans le milieu intérieur de celui-ci. La muqueuse intestinale présente la particularité de disposer de deux barrières physiques limitant le passage des microorganismes commensaux ou pathogènes de la lumière intestinale vers la *lamina propria* (milieu intérieur). La première de ces deux barrières physiques est la couche de mucus sécrétée par les cellules caliciformes présentes dans l'épithélium intestinal. Bien que celle-ci soit notamment impliquée dans la protection de l'épithélium contre les enzymes digestives et dans la progression du chyme alimentaire et des fèces, sa constitution

sépare également les microorganismes de la lumière intestinale de l'épithélium (Capaldo *et al.*, 2017). Des perturbations de cette barrière de mucus ont été observées chez des patients souffrant de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) telles que la maladie de Crohn et la rectocolite hémorragique. En effet, ces patients montrent un nombre plus faible de cellules caliciformes. De plus, celles-ci montrent une production réduite de mucines (protéines constituant majoritairement le mucus) à l'origine d'une réduction de l'épaisseur de la couche de mucus et qui autorise de ce fait davantage de contact entre les microorganismes commensaux de la lumière intestinale et l'épithélium (Swidsinski *et al.*, 2007, Gersemann *et al.*, 2009 ; Johansson *et al.*, 2014).

La seconde barrière physique limitant l'accès des microorganismes de la lumière intestinale vers l'intérieur de l'organisme est l'épithélium intestinal. En effet, bien que celui-ci est supposé permettre de nombreux échanges de petites molécules entre les environnements extérieur et intérieur (absorption des nutriments notamment), la présence de jonctions serrées dans la partie apicale de l'épithélium limite la diffusion de grosses molécules et d'agents potentiellement pathogènes par la voie paracellulaire. Cet épithélium constitue de ce fait une barrière sélective autorisant le passage d'éléments importants tels que l'eau, des solutés ou des facteurs immuns tout en limitant celui d'éléments potentiellement compromettants (grosses molécules et microorganismes) vers la *lamina propria* et leur possible propagation au niveau systémique (McConnell et Coopersmith, 2005 ; Figure 32). Cependant, une augmentation de la perméabilité intestinale peut être observée dans certaines conditions inflammatoires notamment par l'intermédiaire d'une altération de l'expression de la protéine ZO-1 (Zonula Occludens-1), de nombreuses claudines ou de la protéine occludine (Turner, 2009). De manière plus précise, la perméabilité intestinale peut être modulée par de multiples facteurs intra- ou extracellulaires. Par exemple, certaines cytokines telles que l'IFN γ , le TNF α et l'IL-1 β sont capables d'augmenter la perméabilité de cette barrière notamment par l'intermédiaire de l'activation de la MLCK (pour « Myosin Light Chain Kinase »). La MLCK ainsi activée phosphoryle la chaîne légère de la myosine à l'origine de sa contraction et par conséquent de l'ouverture de la barrière épithéliale. Inversement, d'autres facteurs tels que l'EGF (pour « Epidermal Growth Factor ») favorisent le maintien de l'intégrité de la barrière (Suzuki, 2013).

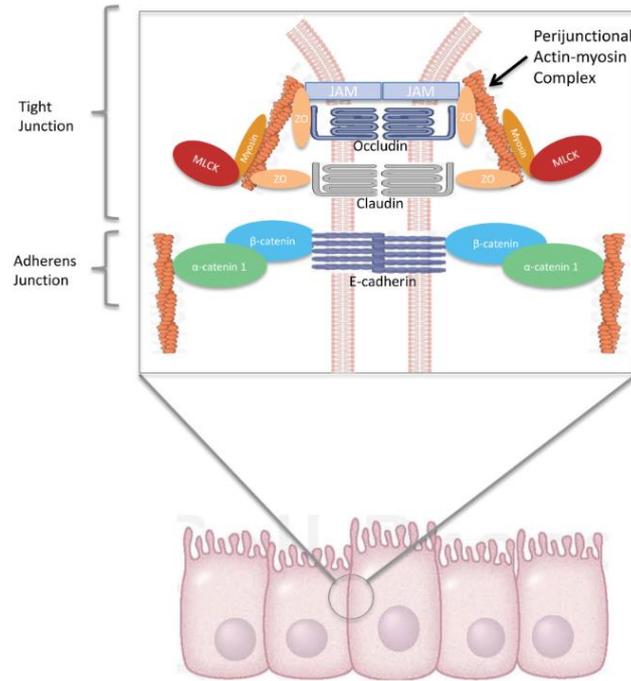


Figure 32 : La barrière épithéliale intestinale.

Les cellules épithéliales intestinales sont maintenues jointives par la présence de jonctions serrées et de jonctions adhérentes, empêchant de ce fait le flux paracellulaire d'éléments de la lumière intestinale vers la *lamina propria*. Les protéines extracellulaires telles que les JAM, les occludines et les claudines interagissent avec les protéines intracellulaires ZO et le complexe actine-myosine péri-jonctionnel formant les jonctions serrées. Les cadhérines extracellulaires en contact avec les caténines intracellulaires interagissent avec le complexe actine-myosine formant les jonctions adhérentes. JAM : Junctional Adhesion Molecule, ZO : Zonula Occludens ; MLCK : Myosin Light Chain Kinase. Source : Mittal et Coopersmith, 2013.

III.2.1.2. Les cellules de l'immunité innée.

Les macrophages représentent la population leucocytaire la plus abondante dans la *lamina propria* en conditions physiologiques. Ils jouent un rôle important dans le maintien de l'homéostasie intestinale, notamment *via* la phagocytose des microorganismes et des débris issus de l'apoptose des cellules de la muqueuse et par l'intermédiaire de la production de médiateurs favorisant le renouvellement des cellules épithéliales à partir des cellules souches présentes dans les cryptes de Lieberkühn (Mowat et Agace, 2014). Les macrophages participent également à la tolérance immunitaire grâce à leur capacité de sécréter de grandes quantités d'IL-10 qui limitent les réponses inflammatoires à des stimuli et favorisent la survie et les fonctions des lymphocytes Treg présents dans la muqueuse intestinale (Murai *et al.*, 2009 ; Hadis *et al.*, 2011). Plus classiquement, les macrophages sont aussi en mesure de jouer le rôle de APC et ainsi de servir d'intermédiaire entre l'immunité innée et l'immunité adaptative.

A l'instar des macrophages, les DC sont elles aussi capables de phagocytose. De nombreuses sous-populations de DC ont été identifiées sans qu'on ne puisse encore aujourd'hui totalement élucider le

rôle spécifique de chacune d'entre elles (Mowat et Agace, 2014). Cependant, une de ces sous-populations (CD103⁺/CD11b⁺) semble être associée à la présence de lymphocytes Th17. En effet, la réduction de la représentation de cette sous-population dans la *lamina propria* est associée à une réduction du nombre de Th17 intestinaux et à une diminution de leur polarisation dans les nœuds lymphatiques mésentériques (MLN pour « Mesenteric Lymph Node » ; Persson *et al.*, 2013 ; Schlitzer *et al.*, 2013). Bien que les fonctions de chacune de ces sous-populations de DC soient encore aujourd'hui débattues, il apparaît que celles-ci jouent un rôle important dans la présentation des antigènes aux cellules de l'immunité adaptative. En effet, celles-ci sont notamment responsables de la présentation des antigènes captés au niveau des plaques de Peyer à travers les cellules M (cellules à plis microscopiques ; voir partie [III.2.2.5.](#)) aux lymphocytes T qui y sont résidents (Mowat et Agace, 2014). Les DC sont en outre capables de capturer des antigènes directement dans la lumière intestinale par l'intermédiaire de dendrites transépithéliales (TED pour « TransEpithelial Dendrites ») émises entre les cellules épithéliales et de présenter ainsi ces antigènes directement au sein de la *lamina propria* (Rescigno *et al.*, 2001 ; Chieppa *et al.*, 2006).

Les entérocytes sont étonnamment également capables de présenter des antigènes aux cellules de l'immunité adaptative. En effet, ils possèdent la capacité de capter des antigènes sur leur face apicale et de les présenter à leur surface basale, en association avec le CMH de type II, aux lymphocytes T CD4⁺ (Hershberg *et al.*, 1998). Cependant, ces cellules n'exprimant pas les molécules de costimulations nécessaires à l'activation de ces lymphocytes, elles seraient non pas associées à l'induction d'une réponse inflammatoire contre ces antigènes mais au contraire à l'induction d'une tolérance immunitaire vis-à-vis des microorganismes commensaux de la lumière intestinale (Sanderson *et al.*, 1993).

III.2.2. La composante adaptative de l'immunité intestinale.

La composante adaptative du système immunitaire intestinal comprend trois grandes catégories que sont les lymphocytes T intra-épithéliaux (IEL pour « IntraEpithelial Lymphocytes »), les lymphocytes T de la *lamina propria* (LPL pour « *Lamina Propria* Lymphocytes ») et les lymphocytes B intestinaux. Ces populations lymphocytaires œuvrent de concert, avec les cellules de l'immunité innée, pour

maintenir l'homéostasie intestinale. Nous nous proposons de présenter ci-après ces différentes catégories avant de proposer une synthèse schématique de la réponse immunitaire intestinale à un agent pathogène quelconque.

III.2.2.1. MAdCAM-1, une molécule d'adhésion vasculaire nécessaire à l'extravasation des cellules immunitaires vers la muqueuse intestinale.

MAdCAM-1 (pour « Mucosal Addressin Cell Adhesion Molecule-1 ») est une protéine d'adhésion vasculaire majoritairement exprimée par les cellules endothéliales des veinules postcapillaires au niveau des MLN, de la *lamina propria* et des tissus lymphoïdes associés à l'intestin (GALT pour « Gut-Associated Lymphoid Tissue ») tels que les plaques de Peyer (Streeter *et al.*, 1988). Son expression permet ainsi l'extravasation des cellules immunitaires depuis le compartiment sanguin vers la muqueuse intestinale, soit directement à l'intérieur de la *lamina propria*, soit dans les plaques de Peyer. En effet, MAdCAM-1 présentent une forte affinité pour les intégrines $\alpha_4\beta_7$ exprimées à la surface des lymphocytes (Berlin *et al.*, 1993). Ainsi, la fixation de MAdCAM-1 exprimée par les cellules endothéliales sur les intégrines $\alpha_4\beta_7$ exprimées à la surface des lymphocytes permet l'adhésion de ces derniers à l'endothélium vasculaire avant de permettre leur transmigration vers les GALT ou la *lamina propria* (Figure 33 ; Zundler *et al.*, 2019).

L'expression de MAdCAM-1 à la surface des cellules endothéliales intestinales se trouve être dépendante de l'état inflammatoire du tissu. En effet, son expression est augmentée dans les tissus intestinaux de patients souffrant de MICI telles que la maladie de Crohn et la rectocolite hémorragique, autorisant ainsi un plus grand trafic des populations lymphocytaires délétères à l'origine des dommages observés dans ces pathologies (Souza *et al.*, 1999 ; Zundler *et al.*, 2017). Cette augmentation de l'expression de MAdCAM-1 est notamment sous la dépendance de diverses cytokines telles que le TNF α et l'IL-10 (Connor *et al.*, 1999). Ainsi, l'une des pistes thérapeutiques les plus privilégiées pour ces MICI a été d'utiliser des anticorps monoclonaux dirigés contre les intégrines $\alpha_4\beta_7$ (vedolizumab, abrilumab) afin de limiter leurs interactions avec MAdCAM-1 et par conséquent de limiter l'infiltration lymphocytaire dans la muqueuse intestinale (Feagan *et al.*, 2013 ; Sandborn *et al.*, 2013).

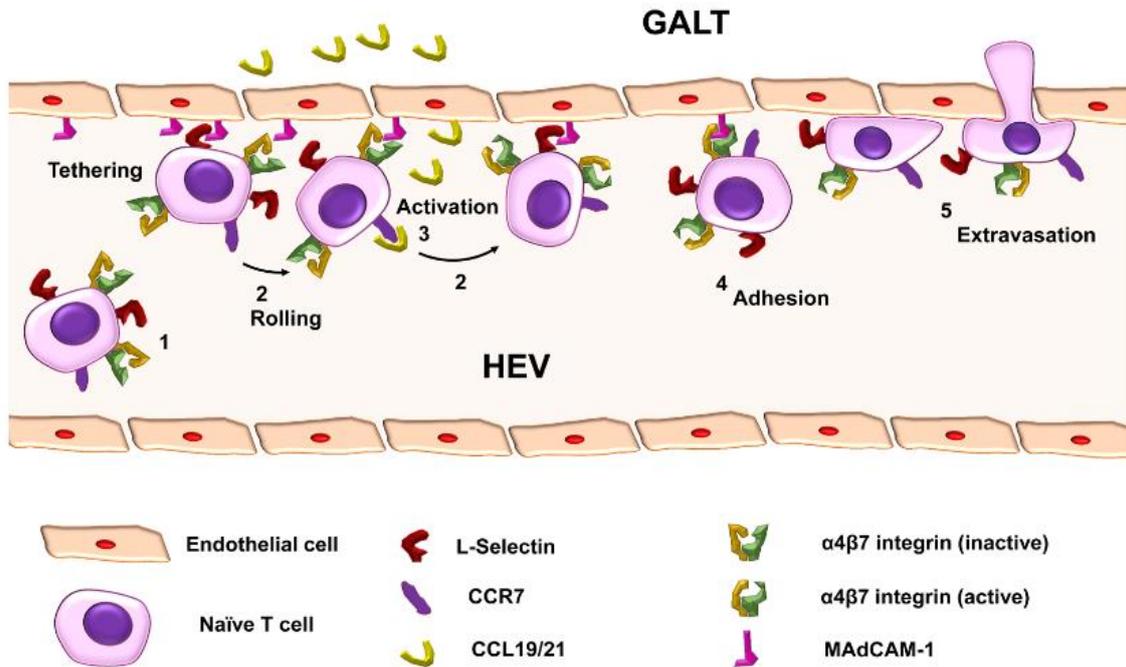


Figure 33 : Transmigration d'un lymphocyte T vers un tissu lymphoïde associé à l'intestin.

(1) Les lymphocytes T expriment le récepteur aux chimiokines CCR7, la L-sélectine et l'intégrine $\alpha_4\beta_7$. (2) La L-sélectine et l'intégrine $\alpha_4\beta_7$ inactive se fixent à MAdCAM-1 exprimée par les cellules endothéliales des veinules à endothélium épais (HEV pour « High Endothelial Venules ») du GALT permettant le roulement du lymphocyte le long de la paroi vasculaire. (3) Pendant le roulement, des chimiokines produites par le GALT (CCL19 et CCL21) peuvent activer les récepteurs aux chimiokines exprimés à la surface du lymphocyte (CCR7). (4) L'intégrine $\alpha_4\beta_7$ obtient alors sa conformation active lui permettant d'établir une adhérence forte avec MAdCAM-1. (5) Une fois le lymphocyte arrêté au niveau de la paroi vasculaire, celui-ci peut se déformer pour franchir l'endothélium vasculaire et rejoindre le GALT (transmigration).

GALT : Gut-Associated Lymphoid Tissue ; HEV : High Endothelial Venule ; MAdCAM-1 : Mucosal Addressin Cell Adhesion Molecule-1. Source : Zundler *et al.*, 2019.

III.2.2.2. Les lymphocytes T intra-épithéliaux.

Les lymphocytes T intra-épithéliaux (IEL) sont des lymphocytes T intégrés à l'épithélium intestinal. Ils représentent environ 10% du nombre total de cellules épithéliales en conditions physiologiques ce qui en fait la population de lymphocytes T la plus abondante du tissu intestinal (Olivares-Villagómez et Van Kaer, 2018). Ces IEL ont pour fonctions de réguler l'homéostasie intestinale, de veiller à l'intégrité de la barrière épithéliale intestinale, de répondre de manière rapide aux infections mais également de réguler les réponses immunitaires innées et adaptatives (Sheridan et Lefrançois, 2010). De ce fait, les IEL se situent à l'interface des composantes innée et adaptative de l'immunité intestinale.

Plusieurs sous-populations d'IEL peuvent être définies en fonction notamment du type de TCR (TCR $\alpha\beta$ ou TCR $\gamma\delta$) et du type de corécepteur CD8 (CD8 $\alpha\alpha$ et CD8 $\alpha\beta$) exprimés (Sheridan et

Lefrançois, 2010). Nous nous intéresserons à présenter rapidement les deux sous populations les plus fréquentes à savoir les IEL CD8 $\alpha\alpha$ /TCR $\gamma\delta$ et les IEL CD8 $\alpha\beta$ /TCR $\alpha\beta$.

Les IEL CD8 $\alpha\alpha$ /TCR $\gamma\delta$ présentent de multiples fonctions effectrices telles que la production de cytokines permettant de réguler l'inflammation intestinale. En effet, ces IEL sont capables de promouvoir l'inflammation par leur production d'IL-17 et d'IFN γ notamment et sont en mesure d'induire l'apoptose de cellules infectées par l'intermédiaire de la libération de granules cytotoxiques ou de l'interaction Fas/FasL (Martin *et al.*, 2009 ; Sutton *et al.*, 2009 ; voir partie [I.3.1](#) ; Figure 10). Ces IEL sont cependant également capables d'inhiber la réaction inflammatoire par l'intermédiaire de la production d'IL-10 (Rhodes *et al.*, 2008). Enfin, cette sous-population est impliquée dans la régulation de l'intégrité de la barrière épithéliale intestinale et dans le renouvellement de l'épithélium grâce à leur production de facteur de croissance des kératinocytes (KGF pour « Keratinocyte Growth Factor » ; Boismenu et Havran, 1994, Chen *et al.*, 2002).

Les IEL CD8 $\alpha\beta$ /TCR $\alpha\beta$ sont quant à eux des lymphocytes T CD8 $^+$ plus classiquement retrouvés. Il s'agit en effet de lymphocytes Tc d'origine périphérique ayant migrés vers la muqueuse intestinale avant de s'intercaler dans l'épithélium. En effet, la neutralisation des intégrines $\alpha_4\beta_7$ à leur surface ou le transfert adoptif de lymphocytes T CD8 $^+$ déficients pour ces intégrines réduit le nombre de ces IEL (Hamann *et al.*, 1994 ; Lefrançois *et al.*, 1999). Ainsi, cette sous-population d'IEL d'origine périphérique présente des fonctions plus classiques de cytotoxicité.

III.2.2.3. Les lymphocytes T de la lamina propria.

Les lymphocytes T de la *lamina propria* (LPL) comprennent à la fois les lymphocytes T CD4 $^+$ et les lymphocytes T CD8 $^+$ avec un ratio approximatif de 2:1 (Mowat et Agace, 2014). Les lymphocytes T CD4 $^+$ se composent des populations effectrices déjà évoquées précédemment telles que les Th1, les Th2 et les Th17 ainsi que des populations régulatrices Treg et Tr1. Cependant, la représentation de chacune de ces sous-populations diffère tout au long du tractus intestinal. Par exemple, il existe une corrélation inverse entre le nombre de cellules Th17 et de Treg le long du tractus intestinal avec de moins en moins de Th17 du duodénum vers le côlon et, inversement, de plus en plus de Treg (Figure 34 ; Denning *et al.*,

2011). Ces différences d'abondance de chaque sous-population sont supposées être une conséquence de contenus luminaux différents en fonction de la zone du tractus intestinal concernée.

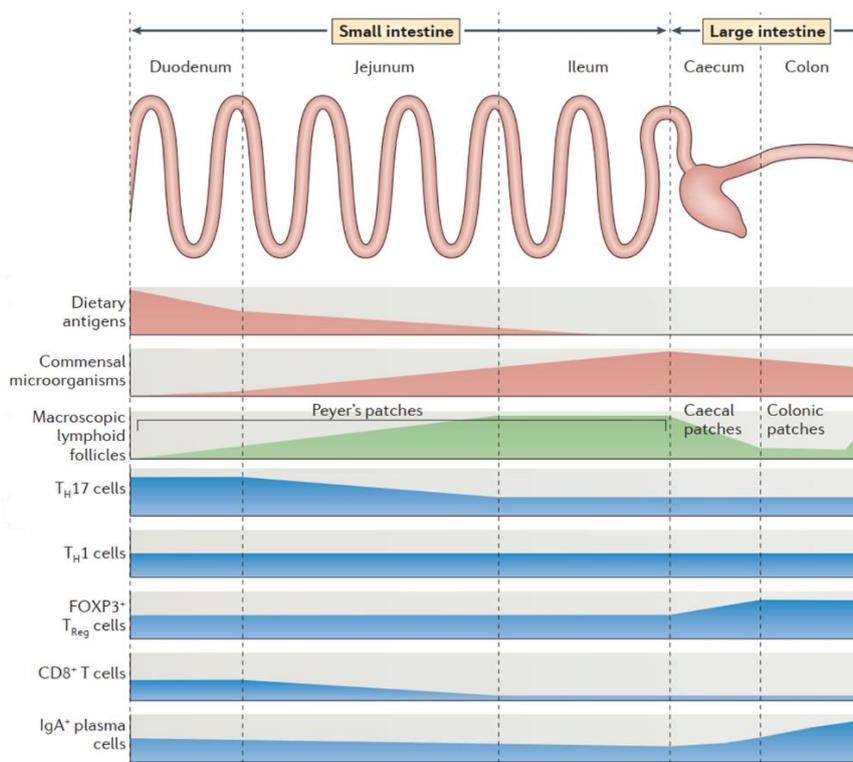


Figure 34 : Régionalisation des principales populations lymphocytaires le long du tractus intestinal de souris en association avec le contenu luminal et la présence de GALT. Figure adaptée de Mowat et Agace, 2014.

III.2.2.4. *Les lymphocytes B intestinaux.*

Contrairement à la plupart des tissus sains d'un organisme, la *lamina propria* comprend à l'état physiologique un nombre important de plasmocytes. Les plasmocytes les plus représentés dans la muqueuse intestinale produisent des immunoglobulines-A (IgA ; environ 75% dans le duodénum et jusqu'à 90% dans le colon ; Figure 34) et la plupart des plasmocytes restant produisent des immunoglobulines-M (IgM ; Brandtzaeg et Johansen, 2005). Les IgA produites par ces plasmocytes ont pour vocation d'être sécrétées dans la lumière intestinale où elles seront en mesure de neutraliser les antigènes contre lesquelles elles sont dirigées. Cette sécrétion intraluminaire d'IgA est permise par la présence d'un récepteur spécifique aux immunoglobulines (pIgR pour « polymeric Immunoglobulin Receptor ») exprimé par les cellules épithéliales intestinales et permettant le transport des IgA à travers la barrière épithéliale intestinale (Brandtzaeg *et al.* 2005). Chez l'humain, il existe deux isotypes d'IgA dont les proportions relatives varient le long du tractus intestinal. Les plasmocytes sécréteurs d'IgA1 sont principalement retrouvés dans le duodénum et le jéjunum tandis que les plasmocytes sécréteurs

d'IgA2 sont de plus en plus abondants à mesure que l'on progresse dans le tractus intestinal pour atteindre environ 60% dans le colon distal (contre seulement 25% dans l'intestin grêle ; Lin *et al.*, 2014). Il est cependant intéressant de noter que la plus grande abondance d'IgA1 dans l'intestin grêle peut être mise à mal en cas de prolifération bactérienne importante (Kett *et al.*, 1995). Ainsi, l'isotype d'IgA sécrétée dépendrait de l'abondance des microorganismes présents dans la lumière intestinale. En effet, les IgA2 présentent une région charnière plus courte les rendant plus résistantes à la dégradation par les protéases bactériennes que les IgA1 (Plaut *et al.*, 1974). Ces IgA2 seraient donc de ce fait plus adaptées aux régions du tractus intestinal riches en microorganismes.

III.2.2.5. La réaction immunitaire intestinale classique à un agent pathogène.

Tel que présenté précédemment, certes de manière non exhaustive, le tractus intestinal présente une grande variété de cellules immunitaires lui conférant des capacités de réactions immunitaires potentiellement indépendantes d'une réponse systémique, et lui permettant de maintenir en permanence son homéostasie, notamment par l'intermédiaire du contrôle des populations microbiennes (dont il sera question dans la prochaine partie). Ce système immunitaire, tel que nous venons de le voir, présente à la fois des composantes classiques de l'immunité mais également des spécificités qui lui sont propres. Nous nous proposons dans cette dernière partie traitant de l'immunité intestinale de mettre en lien les différents acteurs précédemment présentés afin d'établir une chronologie d'évènements permettant de répondre à agent pathogène. Cette chronologie sera présentée sous la forme d'un schéma simplifié (Figure 35) dont la réalisation a été inspirée d'un autre schéma réalisé par Allan Mowat en 2003.

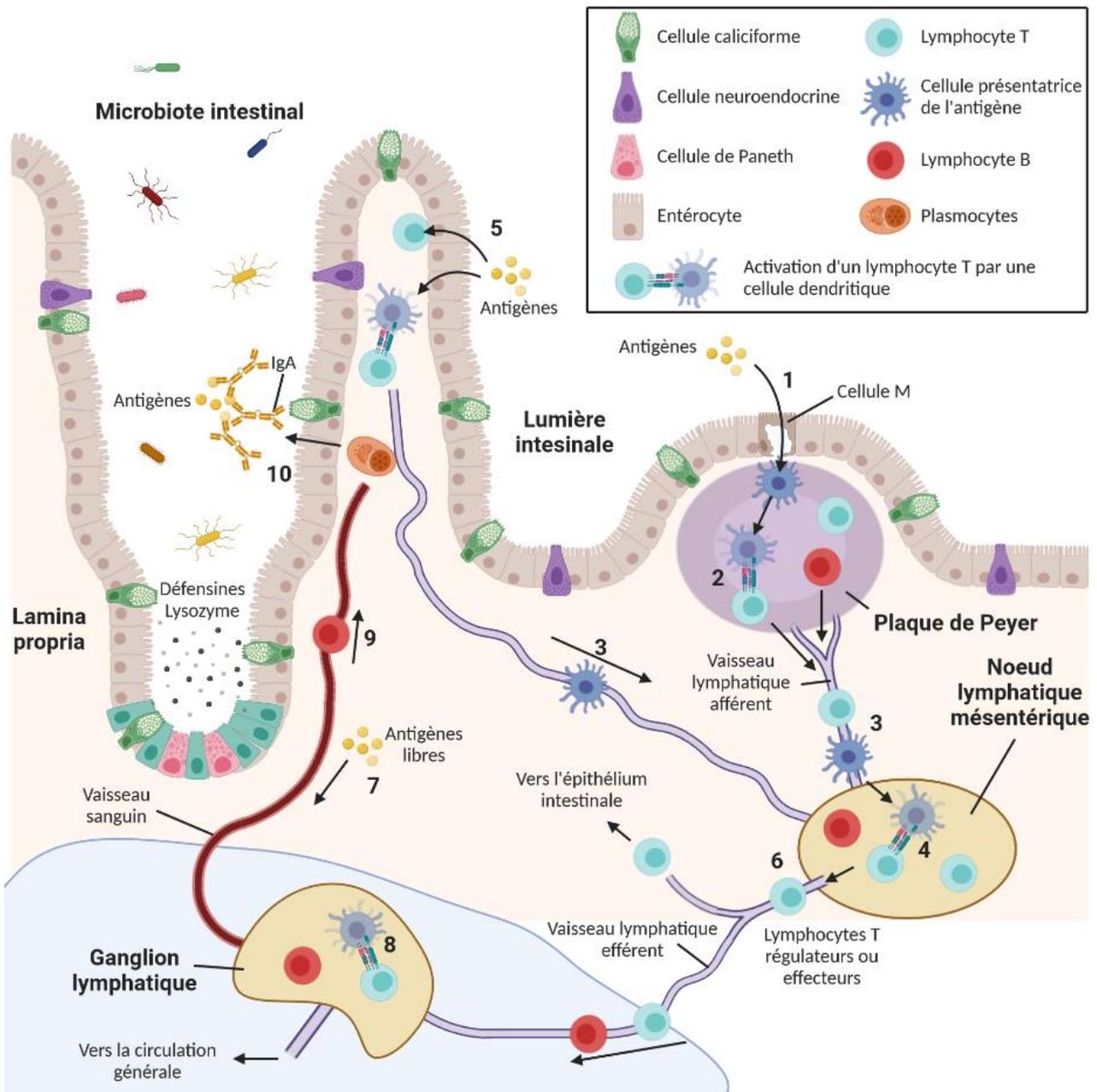


Figure 35 : Schéma simplifié d'une réaction immunitaire intestinale à un agent pathogène.

(1) Les antigènes de la lumière intestinale sont captés par les cellules M présentes au niveau de l'épithélium associé aux follicules (FAE pour « Follicle-Associated Epithelium ») couvrant la plaque de Peyer. Ces antigènes sont alors transférés aux APC y résidant. (2) Les APC ainsi chargées peuvent activer *in situ* les lymphocytes T présentant un TCR spécifiquement dirigés contre ces antigènes. Ces lymphocytes T activés sont alors en mesure d'activer des lymphocytes B présentant un BCR spécifiquement dirigé contre ces antigènes. (3) Les lymphocytes T et B activés, ainsi que des APC chargées en antigènes migrent vers les MLN. (4) Les lymphocytes T résidents des MLN peuvent alors être activés par les APC issues des plaques de Peyer. (5) Les antigènes peuvent être directement captés par les APC par l'intermédiaire de leurs TED, voire être directement présentés en association avec le CMH-II à la surface basale des entérocytes aux lymphocytes T. Les lymphocytes T activés et les APC chargées en antigènes migrent ensuite vers les MLN (3) et (4). (6) Les lymphocytes T activés des MLN peuvent ensuite migrer vers la lamina propria ou vers les ganglions lymphatiques périphériques. Les lymphocytes B activés quant à eux migrent obligatoirement au niveau systémique. (7) Des antigènes libres ayant franchi la barrière intestinale peuvent directement rejoindre les ganglions lymphatiques *via* la circulation sanguine et être captés par des APC y résidant qui (8) iront activer les lymphocytes T y résidant également. Les lymphocytes T ainsi activés pourront rejoindre la circulation lymphatique générale avant de rejoindre la muqueuse intestinale. (9) Les lymphocytes B activés dans le tissu intestinal ont migré vers les ganglions lymphatiques périphériques puis retournent vers la muqueuse intestinale par l'intermédiaire de la circulation sanguine. (10) Une fois dans la lamina propria, ils se différencient en plasmocytes sécrétant d'IgA qui seront sécrétées dans la lumière intestinale où elles iront neutraliser les antigènes contre lesquels la réaction inflammatoire s'est mise en place.

FAE : Follicle-Associated Epithelium ; APC : Antigen Presenting Cell ; TCR : T-Cell Receptor ; BCR : B-cell Receptor ; MLN : Mesenteric Lymph Node ; TED : TransEpithelial Dendrites ; CMH-II : Complexe Majeur d'Histocompatibilité de type II ; IgA : Immunoglobuline de type A. Figure inspirée de Mowat, 2003 et créée avec Biorender.com.

III.3. Le microbiote intestinal.

III.3.1. Présentation du microbiote intestinal.

Le microbiote intestinal correspond à l'ensemble des microorganismes colonisant la lumière intestinale et tolérés par le système immunitaire intestinal. Le nombre de ces microorganismes, majoritairement bactériens, est estimé à 10^{14} chez l'humain soit un nombre dix fois plus important que celui des cellules eucaryotes composant l'organisme hôte. Ce sont quelques 500 à 1000 espèces distinctes qui cohabitent en relation symbiotique avec l'hôte. La charge microbienne ainsi que la diversité spécifique de ce microbiote croissent tout du long du tractus intestinal pour atteindre un nombre de 10^9 à 10^{12} unités formant des colonies (CFU pour « Colony-Forming Unit ») au niveau du colon (Mowat et Agace, 2014 ; Figure 36). Cependant, il semble que l'iléon terminal soit la région présentant la plus grande charge microbienne (Ahmed *et al.*, 2007).

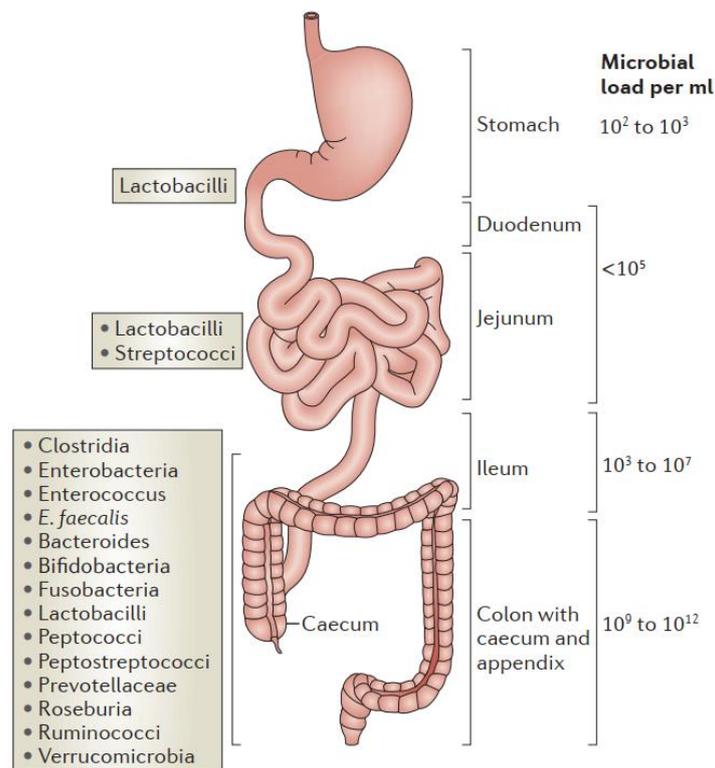


Figure 36 : Distribution des principaux genres bactériens et de la charge bactérienne le long du tractus digestif.

Source : Mowat et Agace, 2014.

Le microbiote intestinal peut être divisé en deux grandes catégories à savoir des espèces dominantes (majoritaires) et des espèces présentes de manière plus anecdotique. La majeure partie des espèces dominantes d'un individu lui sont propres. Cependant, trois phyla semblent être retrouvés chez tous les

individus : *Firmicutes*, *Bacteroidetes* et *Actinobacteria*. Néanmoins, bien que des phyla communs soient retrouvés parmi tous les individus, il semble que de nombreuses espèces soient spécifiques à chacun d'entre eux. Ainsi, le microbiote intestinal d'un individu lui est propre, rendant d'autant plus difficile l'étude de celui-ci et l'établissement d'un archétype de microbiote considéré comme sain.

Le tractus intestinal à la naissance est dépourvu de microbiote. Celui-ci se développe à la naissance pour devenir fonctionnellement stable entre 2 et 4 ans. Cette colonisation est rendue possible par l'immaturité du système immunitaire intestinal du nouveau-né. Cependant, de nombreux facteurs exogènes influencent sa mise en place tels que l'exposition à des micro-organismes d'origine maternelle, l'alimentation, voire une antibiothérapie précoce, qui peuvent avoir des impacts majeurs quant à la mise en place du microbiote intestinal. Il est important de noter que la composition en espèces dominantes, une fois mise en place, est relativement stable tout au long de la vie d'un individu. Ainsi, des événements précoces pouvant être à l'origine de l'installation d'un microbiote « pathologique » pourra avoir des conséquences physiologiques tout au long de la vie de l'individu. De plus, malgré cette relative stabilité observée, il apparaît que de nombreux facteurs, en particulier environnementaux tels que l'alimentation, la prise d'antibiotiques ou des infections intestinales, peuvent provoquer des changements majeurs dans la composition du microbiote et induire un déséquilibre à long terme de l'homéostasie intestinale (source : « Les fondamentaux de la pathologie digestive », CDU-HGE / Editions Elsevier-Masson, 2014).

III.3.2. Les fonctions du microbiote intestinal.

Le microbiote intestinal présente deux grandes fonctions qui peuvent être réparties en deux groupes : des fonctions métaboliques et des fonctions de protection (Figure 37). Les principales fonctions métaboliques comprennent principalement la fermentation anaérobie des composés résiduels non digestibles par l'hôte, le métabolisme de l'hydrogène produit par cette même fermentation, le métabolisme des protéines qui sont la source principale d'azote pour le microbiote colique et le métabolisme des lipides.

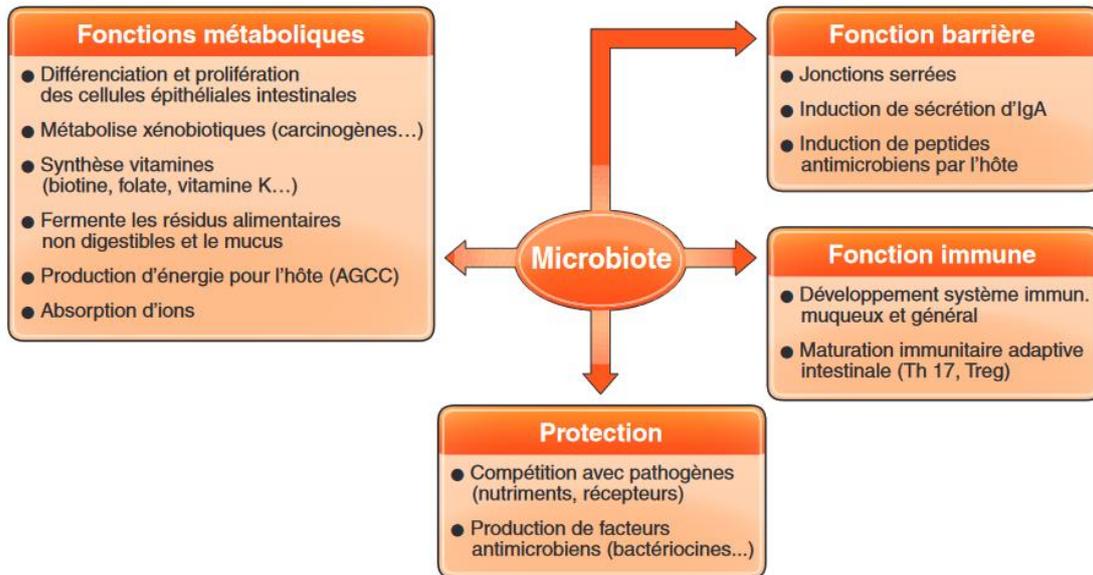


Figure 37 : Les principales fonctions du microbiote intestinal.

Source : « Les fondamentaux de la pathologie digestive », CDU-HGE / Editions Elsevier-Masson, 2014.

Les fonctions de protection de l'hôte par le microbiote intestinal comprennent notamment des mécanismes régulant la colonisation de la lumière intestinale par des microorganismes pathogènes. En effet, les bactéries commensales de l'intestin entrent en compétition pour les nutriments et les sites d'adhérence épithéliaux avec les bactéries pathogènes, limitant de ce fait leur implantation. De plus, le microbiote intestinal est en mesure d'induire la sécrétion de peptides antimicrobiens par les cellules de Paneth et certaines espèces bactériennes peuvent sécréter elles-mêmes des molécules aux propriétés antibiotiques telles que les bactériocines. Enfin, le microbiote intestinal peut également participer au renforcement de la barrière épithéliale intestinale *via* l'augmentation de l'expression de certaines protéines constitutives des jonctions serrées situées à la face apicale des entérocytes (Allam-Ndoul *et al.*, 2020). Le microbiote intestinal protège également l'hôte par l'intermédiaire de son implication dans la mise en place et la maturation du système immunitaire intestinal. En effet, de nombreuses anomalies dans l'établissement du système immunitaire intestinal ont été observées chez des animaux expérimentalement dépourvus de microbiote intestinal (animaux « germ-free »). Par exemple, il apparaît que ces animaux « germ-free » présentent des anomalies de développement des plaques de Peyer (Pollard et Sharon, 1970). De plus, ces animaux présentent une diminution du nombre de lymphocytes intra-épithéliaux et des anomalies dans la production d'IgA qui peuvent être restaurées par une colonisation ultérieurement induite (Umesaki *et al.*, 1993 ; Hapfelmeier *et al.*, 2010). De manière

intéressante, ces animaux présentent une diminution du nombre de lymphocytes Th17, ce qui pourrait expliquer l'absence de développement d'une rectocolite hémorragique chez des animaux « germ-free » qui y sont pourtant génétiquement susceptibles (Ivanov *et al.*, 2008 ; Peloquin et Nguyen 2013). Outre le rôle du microbiote intestinal dans la mise en place et la maturation du système immunitaire intestinal, il semble qu'il soit également associé au développement des organes lymphoïdes à l'échelle de l'organisme. En effet, il a été montré que l'absence de microbiote intestinal chez des souris est associée à une hypoplasie des ganglions lymphatiques et de la rate ainsi qu'à un nombre fortement réduit de lymphocytes B à l'intérieur de ceux-ci (Pollard et Sharon 1970).

Ainsi, le microbiote intestinal présente de nombreuses fonctions bénéfiques pour l'hôte, et tout particulièrement dans la surveillance immunitaire. Ainsi, des changements dans la composition du microbiote, ou bien encore des altérations dans la colonisation même du tractus digestif aux premières années de la vie, pourront avoir d'importantes conséquences, souvent durables, sur la santé de l'hôte. Par exemple, des perturbations du microbiote intestinal par des facteurs environnementaux (antibiothérapies, changement de régime alimentaire) ont été associées au développement des MICI chez l'homme, notamment par l'intermédiaire d'une suractivation de l'immunité intestinale (Figure 38 ; Zheng *et al.*, 2020).

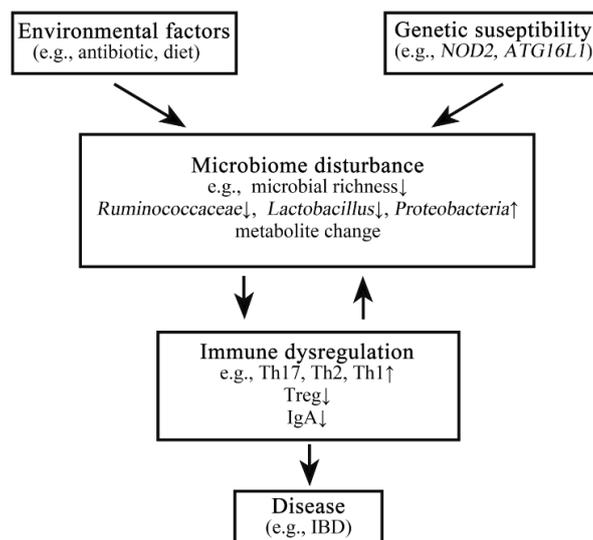


Figure 38 : Perturbation des interactions entre le microbiote et l'immunité intestinale dans un contexte pathologique. Dans les MICI, des facteurs environnementaux tels que la prise d'antibiotiques ou un changement de régime alimentaire peuvent, en association avec des facteurs génétiques, induire des modifications majeures de la composition du microbiote intestinal des patients. De telles modifications sont à l'origine notamment d'une augmentation du nombre de lymphocytes Th17, Th1 et Th2 ainsi qu'une diminution de nombre de lymphocytes Treg et de la production d'IgA. Ces modifications dans l'immunité intestinale sont alors à l'origine de l'apparition des lésions tissulaires observées chez ces patients. MICI : Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin. Source : Zheng *et al.*, 2020.

III.4. Axe microbiote-intestin-cerveau et SEP.

III.4.1. L'axe microbiote-intestin-cerveau.

L'axe microbiote-intestin-cerveau, historiquement dénommé axe intestin-cerveau, désigne les relations bidirectionnelles intimes entre l'environnement intestinal et le SNC. Les premiers travaux concernant les communications entre le tractus gastro-intestinal et le SNC consistaient en l'étude des fonctions digestives et la régulation centrale des comportements alimentaires (Berthoud, 2008). Plus récemment, un rôle de ces communications bidirectionnelles a pu être mis en évidence sur la cognition et l'état psychologique des individus (Carabotti *et al.*, 2015 ; Agustí *et al.*, 2018). Ces communications bidirectionnelles entre le tractus gastro-intestinal et le cerveau à l'origine de modulations de l'activité entérique et/ou de l'activité cérébrale sont multiples. Parmi elles, on peut noter une participation nerveuse par l'intermédiaire du nerf vague, mais également l'intervention de systèmes neuroendocrines tels que l'axe HPA. Ces communications peuvent aussi se réaliser par l'intermédiaire de sécrétions hormonales (cholécystokinine, glucagon-like peptide-1, etc.) par des cellules endocrines intestinales ou par l'intermédiaire de métabolites microbiens (Figure 39 ; Cryan *et al.*, 2019).

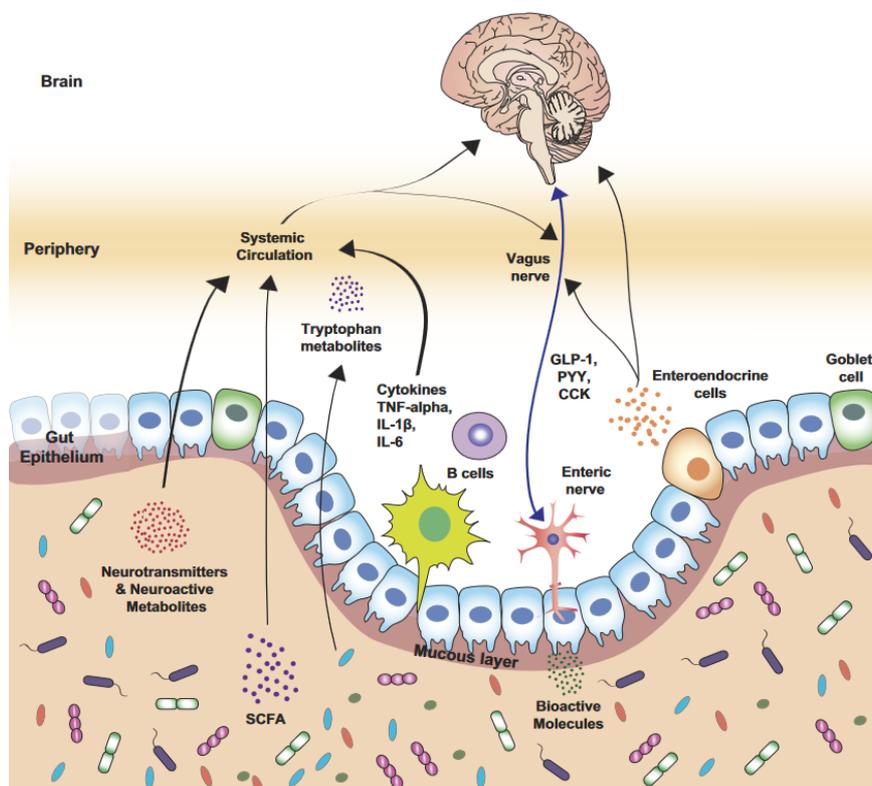


Figure 39 : Représentation schématique des différentes voies de communications bidirectionnelles entre le tractus gastro-intestinal et le cerveau. CCK : Cholécystokinine, GLP-1 : Glucagon-like peptide-1, IL : Interleukine, PYY : Peptide YY, TNF : Tumor Necrosis Factor, SCFA : Short-Chain Fatty Acid. Source : Cryan *et al.*, 2019.

Des travaux réalisés au cours des dernières décennies ont permis de soulever le rôle prépondérant du microbiote intestinal au sein de l'axe intestin-cerveau, d'où la complémentation relativement récente de sa dénomination en axe microbiote-intestin-cerveau. Les arguments en faveur d'une implication du microbiote intestinal dans la modulation des fonctions cérébrales et des comportements de l'hôte proviennent de diverses expérimentations dans lesquelles celui-ci était altéré (utilisation d'animaux « germ-free », utilisation d'antibiotiques, administration de probiotiques ou transplantation de microbiote fécal ; FMT pour « Fecal Microbiota Transplantation »). De telles études ont permis de mettre en évidence de nombreuses modifications du fonctionnement du SNC en lien avec des modifications des populations microbiennes intestinales. Par exemple, l'utilisation d'animaux « germ-free » a permis de révéler des modifications parfois majeures dans la physiologie cérébrale telles qu'une augmentation de la neurogénèse hippocampique, une diminution de l'expression des protéines de jonctions serrées par les cellules endothéliales cérébrales à l'origine d'une augmentation de la perméabilité de la BHE (Figure 40 ; Cryan *et al.*, 2019).

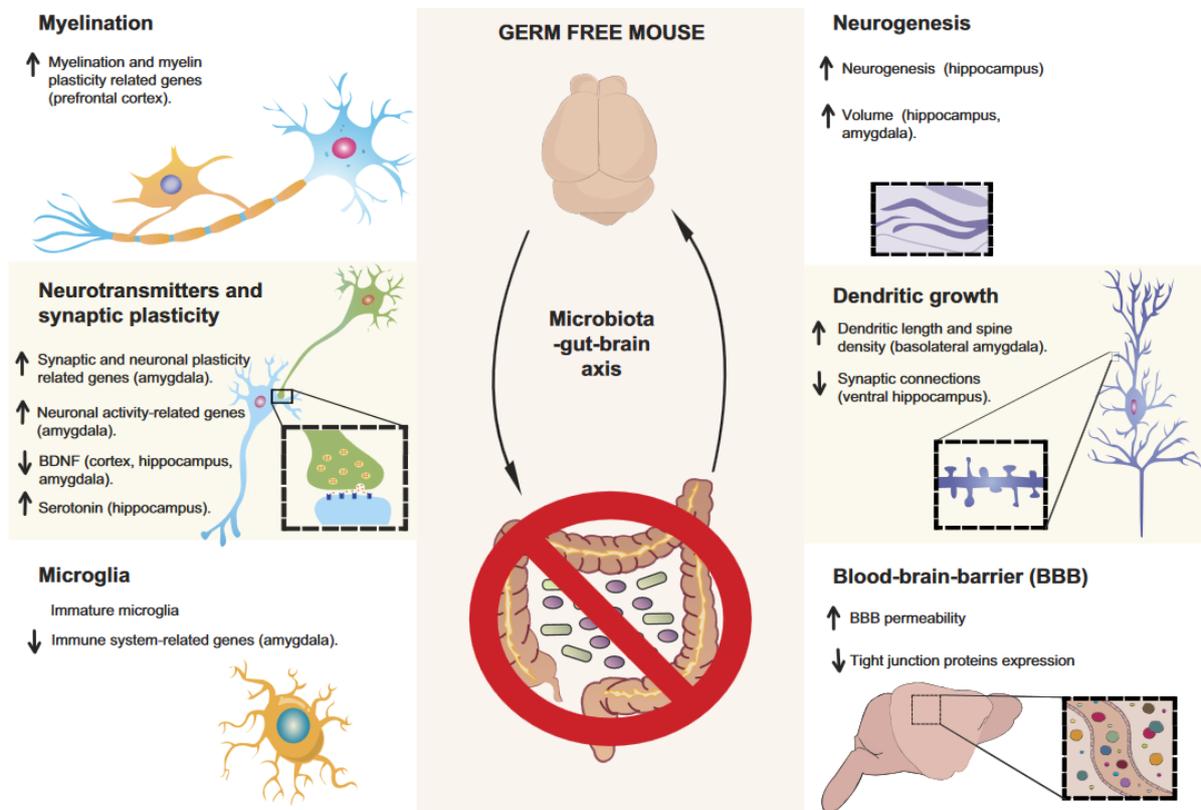


Figure 40 : Représentation schématique des modifications cérébrales observées chez des souris dépourvues de microbiote intestinal (« germ-free »). ↑ : augmentation, ↓ : diminution. Source : Cryan *et al.*, 2019.

Les communications entre le tractus gastro-intestinal et le SNC peuvent également s'effectuer par l'intermédiaire de la libération de divers facteurs immuns telles que des cytokines et des interleukines par les différentes populations leucocytaires résidant dans le tissu intestinal (Figure 39 ; voir partie [III.2.](#)). Ainsi, des perturbations dans la composition microbienne de la lumière intestinale, et plus globalement une perturbation de l'homéostasie intestinale, pourraient avoir des conséquences non négligeables sur l'apparition et/ou l'évolution de pathologies neuroinflammatoires telles que la SEP. Ainsi, nous discuterons dans la prochaine partie des récentes découvertes suggérant l'implication d'une altération de cet axe microbiote-intestin-cerveau dans la physiopathologie de la SEP.

III.4.2. Perturbations de l'axe microbiote-intestin-cerveau dans la SEP.

L'étude du rôle du tissu intestinal dans la physiopathologie de la SEP connaît depuis une dizaine d'années, et tout particulièrement ces cinq dernières années, un véritable essor. Cependant, l'hypothèse d'une implication d'un dysfonctionnement de l'axe microbiote-intestin-cerveau a été soulevée dès l'année 1993 par Goverman et ses collaborateurs. En effet, ces auteurs ont mis en évidence que l'hébergement de souris transgéniques exprimant un TCR dirigé contre la MBP dans des conditions exemptes d'agents pathogènes spécifiques (SPF pour « Specific-Pathogen Free ») abolissait toute déclaration d'une EAE (Goverman *et al.*, 1993). Ces données ont été confortées par des travaux ultérieurs qui ont utilisé des déplétions des populations microbiennes commensales de la lumière intestinale par antibiothérapie. Dans une étude publiée en 2008, les auteurs ont montré qu'une antibiothérapie (kanamycine + colistine + vancomycine) au long court permettait de réduire l'incidence de déclaration d'une EAE-MOG ainsi que la production de cytokines pro-inflammatoires (IFN γ , TNF α , IL-6 et IL-17) et le nombre de lymphocytes Th17 dans les MLN (Yokote *et al.*, 2008). Une autre étude publiée un an plus tard a permis de confirmer ces résultats dans des modèles d'EAE-MOG et d'EAE-PLP (Ochoa-Repáraz *et al.*, 2009). Les auteurs de cette étude ont en outre pu mettre en évidence une diminution des cytokines pro-inflammatoires précédemment citées, mais également une augmentation de certaines cytokines anti-inflammatoires (IL-10 et IL-13) chez les souris traitées par des antibiotiques. Cette même étude a de plus mis en évidence que de tels effets ne pouvaient être observés que lorsque ces antibiotiques étaient administrés par voie orale, et non par voie intra-péritonéale, suggérant que leurs

effets étaient bel et bien dépendants d'une altération du microbiote intestinal. Plus récemment, une étude a montré qu'une administration prophylactique de courte durée (trois jours) d'un cocktail d'antibiotiques (ampicilline + métronidazole + sulfate de néomycine + vancomycine) était suffisante pour réduire la sévérité d'une EAE-MOG (Figure 41A ; Seifert *et al.*, 2018). Ces effets observés étaient associés à une diminution du nombre de lymphocytes Th1 et Th17 au niveau des MLN (Figure 41B-C) et à une augmentation, dans la moelle épinière des animaux, de l'expression de gènes associés au recrutement de lymphocytes Treg et de macrophages anti-inflammatoires (Seifert *et al.*, 2018).

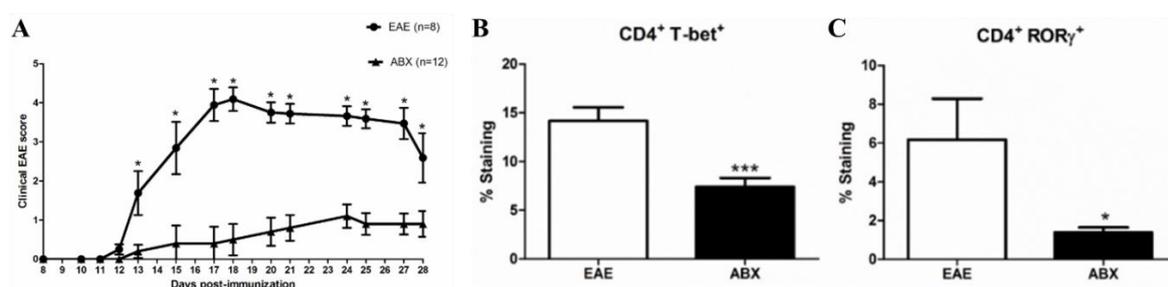


Figure 41 : Effet d'un prétraitement antibiotique sur les scores cliniques moyens d'une EAE-MOG (A) et les populations lymphocytaires Th1 (B) et Th17 (C) au niveau des nœuds lymphatiques mésentériques. *P<0.05, ***P<0.001 : EAE vs ABX. ABX : Groupe prétraité par antibiothérapie. Figure adaptée de Seifert *et al.*, 2018.

D'autres auteurs se sont intéressés à l'étude d'animaux qui, contrairement aux déplétions partielles induites par les diverses antibiothérapies citées précédemment, étaient totalement dépourvus de microbiote intestinal. L'une des premières études de l'EAE chez des animaux « germ-free », à notre connaissance, a été publiée en 2011 par Lee et ses collaborateurs. Ces auteurs ont mis en évidence que la majeure partie des souris « germ-free » immunisées contre le peptide MOG₃₅₋₅₅ ne présentait aucune manifestation clinique de la pathologie et que, pour la minorité d'entre-elles la déclarant, les scores cliniques étaient bien inférieurs à ceux observés chez des animaux hébergés en conditions SPF (Figure 42A ; Lee *et al.*, 2011). Les auteurs ont également mis en évidence une diminution de la production des cytokines pro-inflammatoires INF γ et IL-17 et des populations Th1 et Th17 au niveau des intestins et de la moelle épinière des animaux « germ-free » ainsi qu'une augmentation des populations Treg (Figure 42B-C). Ils ont également pu mettre en évidence chez ces mêmes animaux une diminution de la propension des DC résidant dans les MLN à induire une réponse pro-inflammatoire. De manière intéressante, la colonisation du tube digestif des souris « germ-free » par un groupe particulier de

bactéries, les bactéries filamenteuses segmentées, était à elle seule suffisante pour déclencher la pathologie contre laquelle elles étaient alors protégées (Lee *et al.*, 2011).

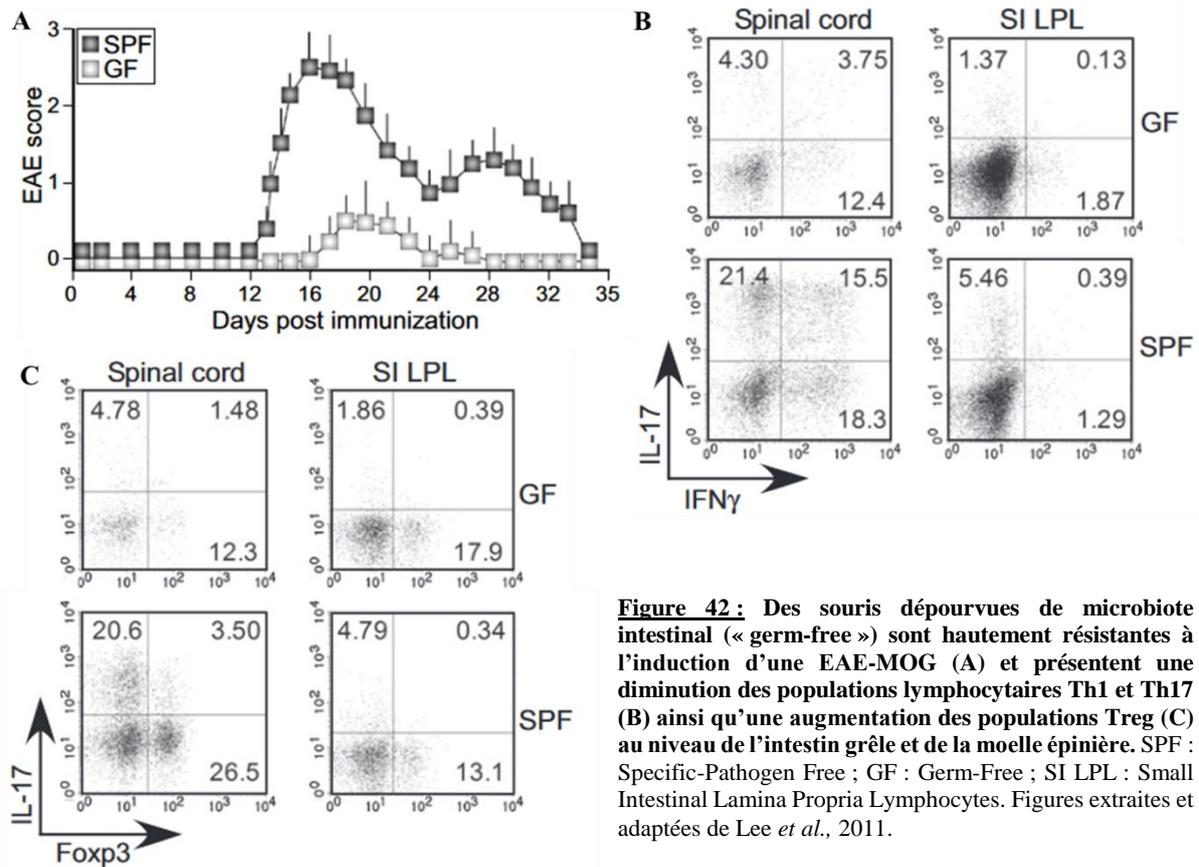


Figure 42 : Des souris dépourvues de microbiote intestinal (« germ-free ») sont hautement résistantes à l'induction d'une EAE-MOG (A) et présentent une diminution des populations lymphocytaires Th1 et Th17 (B) ainsi qu'une augmentation des populations Treg (C) au niveau de l'intestin grêle et de la moelle épinière. SPF : Specific-Pathogen Free ; GF : Germ-Free ; SI LPL : Small Intestinal Lamina Propria Lymphocytes. Figures extraites et adaptées de Lee *et al.*, 2011.

Au regard de ces données obtenues dans des modèles animaux de SEP, de nombreuses études se sont par la suite intéressées à définir s'il existait des altérations du microbiote intestinal chez les patients atteints de SEP. Une des premières preuves d'une modification du microbiote intestinal de ces patients en lien avec leur pathologie provient d'une étude au cours de laquelle les auteurs ont introduit des transplants de microbiote fécal issus de patients SEP à des souris génétiquement susceptibles à l'apparition d'une EAE spontanée (Berer *et al.*, 2017). En effet, dans cette étude, une telle FMT augmentait l'incidence de déclaration spontanée de l'EAE, effet qui n'était pas observé lorsque le transplant provenait d'individus sains. D'après cette étude, les effets de celle-ci étaient médiés par une diminution de la production d'IL-10 par les splénocytes des souris receveuses. Ainsi, il semble qu'il existe des modifications dans la composition du microbiote intestinal chez les patients SEP, pouvant induire des déséquilibres dans la balance anti- / pro-inflammatoire et intervenir dans l'origine et/ou l'aggravation de la maladie. Ainsi, la caractérisation d'un archétype de microbiote pathologique associé

à la SEP semble être prometteuse quant au développement de nouvelles pistes thérapeutiques. Cependant, aucun consensus n'a jusqu'à présent émergé quant aux espèces qui seraient régulées à la hausse ou à la baisse chez les patients atteints de SEP (Wekerle, 2017). Malgré tout, certaines études comparatives entre des patients atteints de SEP et des individus sains ont permis de mettre en évidence un certain nombre de genres plus représentés au sein de microbiotes pathologiques, telles que des bactéries du genre *Akkermansia* (Jangi *et al.*, 2016, Berer *et al.*, 2017, Cox *et al.*, 2021). De manière intéressante, certains auteurs ont pu mettre en évidence l'existence d'une production intrathécale d'immunoglobulines-G dirigées contre *Akkermansia muciniphila* chez des patients atteints de SEP (Vallino *et al.*, 2020). Les auteurs émettent alors l'hypothèse de l'existence d'un mimétisme moléculaire entre des peptides microbiens issus de cette espèce et des peptides constitutifs de la gaine de myéline pouvant être à l'origine de la réaction auto-immune, ainsi qu'une migration de ces lymphocytes B auto-réactifs depuis les intestins vers le SNC. De manière similaire, Pröbstel et ses collaborateurs ont mis en évidence en 2020 la présence de lymphocytes B, producteurs d'IgA spécifiques du microbiote intestinal, au niveau de lésions actives chez des patients atteints de SEP (Pröbstel *et al.*, 2020). Cependant, contrairement aux travaux précédemment cités de Vallino et ses collaborateurs publiés la même année, les auteurs concluent que, en raison d'une production locale d'IL-10 et de l'absence de réactivité croisée de ces IgA avec des peptides cérébraux, ces lymphocytes B issus du tissu intestinal présenteraient un phénotype régulateur et permettraient de mettre fin à la réaction inflammatoire centrale. Cette idée que le microbiote intestinal puisse favoriser le développement de réponses anti-inflammatoires est corroborée par une étude publiée en 2013 selon laquelle certaines bactéries telles que des bactéries des genres *Clostridium* et *Bacteroides* étaient en mesure d'augmenter les populations intestinales de lymphocytes Treg (Atarashi *et al.*, 2013). De manière très intéressante, il s'avère que ces deux sous-populations bactériennes se trouvent être diminuées chez les patients atteints de SEP (Miyake *et al.*, 2015).

Ainsi, il semble que diverses modifications du microbiote intestinal, *via* une augmentation de populations bactériennes pro-inflammatoires et une diminution d'autres anti-inflammatoires seraient liées, au moins en partie, à la physiopathologie de la SEP (Figure 43).

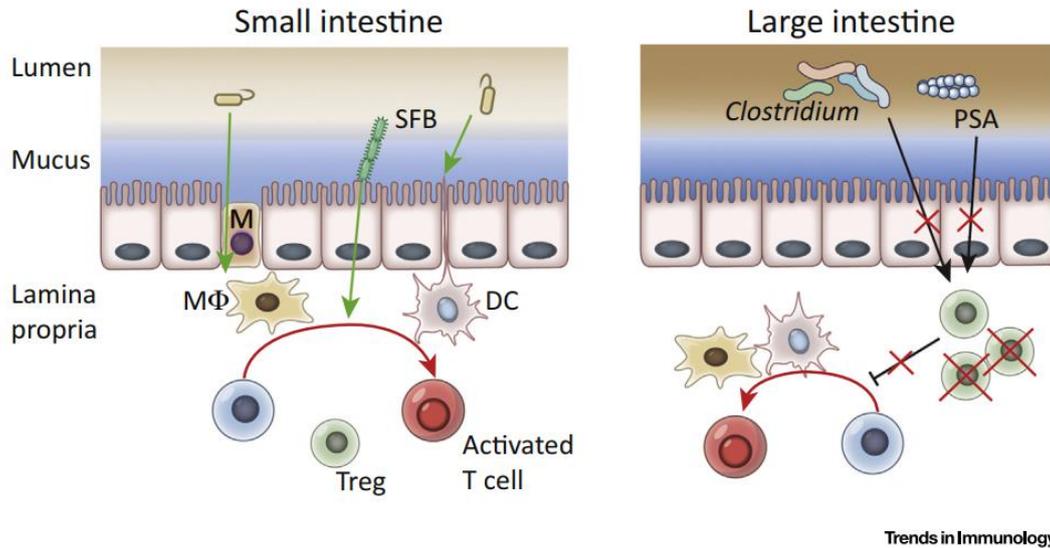


Figure 43 : Représentation schématique d'une origine possible de l'activation de lymphocytes T auto-réactifs dans deux régions distinctes du tractus intestinal.

Dans l'intestin grêle, et majoritairement dans l'iléon, certaines espèces bactériennes telles que les bactéries segmentées filamenteuses et *Akkermansia muciniphila* auraient la capacité d'induire l'activation de lymphocytes T auto-réactifs par l'intermédiaire des cellules M ou des processus transépithéliaux des cellules dendritiques. Dans le côlon, des déficits de certaines espèces bactériennes telles que des bactéries des genres *Clostridium* et *Bacteroides* induiraient une diminution des populations lymphocytaires régulatrices et permettraient ainsi un emballement de la réaction auto-immune. MΦ : Macrophage ; DC : Cellule Dendritique ; Treg : Lymphocyte T régulateur ; SFB : Segmented Filamentous Bacteria ; PSA : Polysaccharide A. Source : Wekerle, 2017.

D'autres modifications, en plus de celles concernant le microbiote intestinal exposées précédemment, ont pu être mise en évidence, à la fois chez les patients atteints de SEP et dans les modèles animaux. Il s'agit en particulier d'altérations de la barrière épithéliale intestinale et par conséquent une augmentation de la perméabilité de l'épithélium. Cette dernière a pu être mise en évidence dans des modèles animaux de SEP. Dans une étude publiée en 2014, Nouri et ses collaborateurs ont montré une telle augmentation de perméabilité intestinale dans une EAE-MOG par immunisation active. En effet, ils ont pu noter une augmentation, dès le septième jour après immunisation, du passage de molécules à haut poids moléculaire depuis la lumière intestinale vers le compartiment plasmatique en comparaison avec des animaux contrôles (Figure 44A ; Nouri *et al.*, 2014). A cette augmentation de la perméabilité intestinale était associée une augmentation de l'expression de la zonuline (protéine responsable du désassemblage des jonctions serrées entre les entérocytes ; Fasano, 2011 ; Figure 44B), ainsi que des modifications de structure de la muqueuse au niveau de l'intestin grêle. De telles observations ont également été faites dans un modèle de transfert adoptif de lymphocytes T auto-réactifs préalablement dirigés contre le peptide MOG₃₅₋₅₅. Les auteurs de cette étude ont également pu mettre en évidence, en parallèle des modifications structurelles précédemment décrites, une augmentation des proportions de lymphocytes

Th17, aux dépens des populations régulatrices (Treg) au niveau de la *lamina propria*, des plaques de Peyer, des MLN et de la rate des animaux (Figure 44C-D ; Nouri *et al.*, 2014).

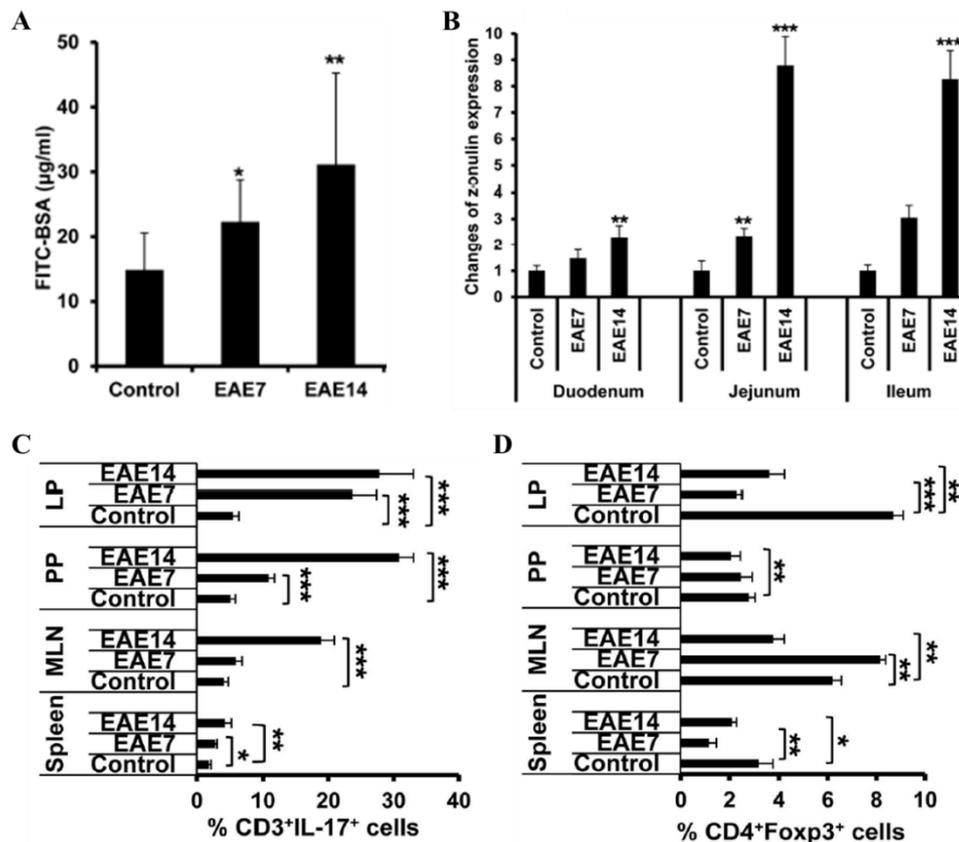


Figure 44 : Une augmentation de la perméabilité intestinale est observée de manière précoce chez des animaux immunisés contre le peptide MOG₃₅₋₅₅ en association avec une augmentation des populations Th17 et une diminution des populations Treg intestinales. (A) Evaluation de la perméabilité intestinale, chez des animaux contrôles et des animaux EAE à 7 et 14 jours post-immunisation, par dosage plasmatique d'une molécule à haut poids moléculaire (FITC-BSA) introduite aux animaux par voie orale. (B) Quantification par immunohistochimie de l'expression de la zonuline dans les trois parties de l'intestin grêle chez ces mêmes animaux. (C-D) Quantification par cytométrie en flux des populations lymphocytaires Th17 (CD3⁺IL-17⁺) et Treg (CD4⁺FoxP3⁺) au niveau de la *lamina propria*, des plaques de Peyer, des MLN et de la rate d'animaux contrôles et d'animaux EAE à 7 et 14 jours post-immunisation. *P<0.05 ; **P<0.01 ; ***P<0.001, vs contrôles. Figure adaptée de Nouri *et al.*, 2014.

D'autres auteurs se sont par la suite intéressés à savoir si de telles perturbations de l'intégrité de la barrière intestinale étaient présentes dans le cadre de la SEP. Ainsi, il a pu être mis en évidence une augmentation des concentrations plasmatiques de zonuline uniquement chez des patients atteints de RR-SEP et de PP-SEP ayant été sujets à de nouvelles activités de la maladie dans l'année précédant la mesure (Camara-Lemarroy *et al.*, 2020). En effet, de telles augmentations des concentrations plasmatiques de zonuline n'étaient pas retrouvées chez les patients n'ayant pas eu de nouvelles activités de la pathologie, ni chez les patients atteints de RR-SEP présentant des lésions Gd⁻ (Camara-Lemarroy *et al.*, 2020).

Il est intéressant de noter ici qu'un stress psychologique est en mesure d'induire des altérations de la physiologie intestinale. En effet, il a été montré que de tels événements stressants chez l'animal tels qu'une privation maternelle ou un stress d'évitement de l'eau (WAS pour « Water Avoidance Stress »), diminuaient l'expression des protéines de jonctions serrées par les entérocytes, augmentant de ce fait la perméabilité du tractus intestinal (Barreau *et al.*, 2004 ; Cameron et Perdue, 2005 ; Oines *et al.*, 2012 ; Vanhaecke *et al.*, 2017). De tels effets du stress sur la barrière intestinale ont également pu être mis en évidence chez l'humain (Vanuytsel *et al.*, 2014 ; Bischoff *et al.*, 2014). Ainsi, les effets du stress psychologique sur la physiopathologie de la SEP et ses modèles animaux tels que présentés dans la partie II pourraient être, au moins en partie, liés à des modifications de la physiologie intestinale, et notamment à une augmentation de la perméabilité intestinale. En effet, le modèle extrinsèque entend que des peptides mimétiques en périphérie, présentés aux lymphocytes auto-réactifs, pourraient être à l'origine de l'apparition de la pathologie auto-immune (voir partie I.4.1.). Ainsi, une ouverture de la barrière intestinale, induite ou non par le stress, autoriserait la translocation de certaines espèces bactériennes de la lumière intestinale vers la *lamina propria*, facilitant l'activation des potentiels lymphocytes auto-réactifs y résidant et pourrait se traduire par l'apparition et/ou l'aggravation de la réaction auto-immune démyélinisante.

Cependant, cette idée de l'implication d'une ouverture de la barrière intestinale, couplée aux modifications de la composition du microbiote intestinal discutées précédemment, dans la genèse même de la pathologie reste encore aujourd'hui discutée (Parodi et Kerlero de Rosbo, 2021). Cependant, quelques travaux récents arguent en faveur d'une origine intestinale de la pathologie. Par exemple, une étude récente a montré que la protéine MAdCAM-1 était indispensable à l'apparition de symptômes moteurs dans l'EAE (Kuhbandner *et al.*, 2019). En effet, dans cette étude, les auteurs ont pu mettre en évidence une forte diminution de l'incidence de déclaration d'une EAE-MOG chez des souris déficientes en MAdCAM-1 (MAdCAM-1-KO) ainsi qu'une diminution des scores cliniques moyens chez les rares souris ayant déclaré la pathologie. Les auteurs ont également observé une diminution de l'abondance de lymphocytes T, qu'ils s'agissent de Th1, Th17 ou Treg, dans la moelle épinière et l'intestin grêle des animaux MAdCAM-1-KO par rapport aux animaux contrôles. Dans une autre étude,

il a été mis en évidence que, dans une EAE obtenue par transfert adoptif de lymphocytes Th17 spécifiquement dirigés contre le peptide MOG₃₅₋₅₅, ces mêmes lymphocytes rejoignaient en premier lieu le colon (Duc *et al.*, 2019). De manière intéressante, les auteurs de cette étude ont montré une augmentation progressive du nombre de ces lymphocytes Th17 au niveau du SNC parallèlement à leur diminution au niveau du colon. Ces données suggèrent alors une migration des lymphocytes Th17 autoréactifs du colon vers le SNC des animaux. Les auteurs ont également pu mettre en évidence que le blocage des interactions entre MAdCAM-1 et son ligand, l'intégrine $\alpha_4\beta_7$, par injections intrapéritonéales répétées d'anticorps monoclonaux, retardait la progression de l'EAE par transfert adoptif (Figure 45A). A cette diminution de sévérité de la pathologie était associée une diminution du nombre de lymphocytes Th17 auto-réactifs dans le colon mais également au niveau du SNC des animaux (Figure 45B-C). Les auteurs ont alors suggéré que la migration première des lymphocytes Th17 dans la *lamina propria* du colon et leur réactivation *in situ* était une condition *sine qua non* pour leur migration postérieure au niveau du SNC où ils seront responsables des dommages démyélinisants à l'origine des perturbations motrices observées (Duc *et al.*, 2019). Enfin, cette étude a mis en exergue des modifications de la composition du microbiote intestinal des animaux après transfert adoptif de lymphocytes Th17 auto-réactifs.

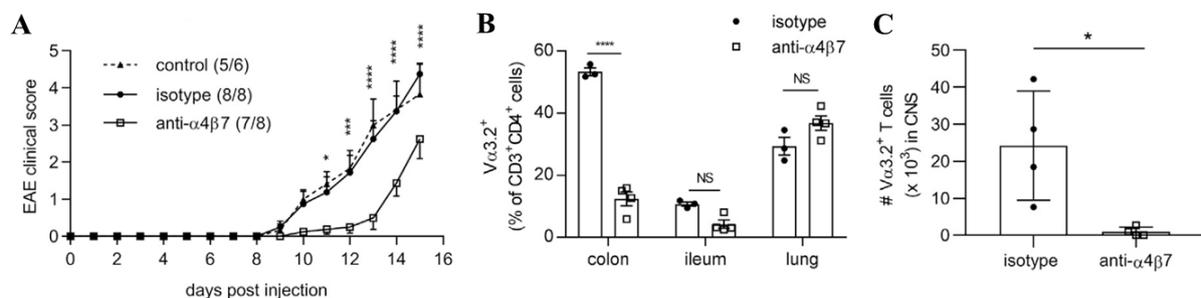


Figure 45: Le blocage des interactions MAdCAM-1/intégrine $\alpha_4\beta_7$ retarde la progression d'une EAE induite par transfert adoptif de lymphocytes Th17 spécifiquement dirigés contre le peptide MOG₃₅₋₅₅ (A) et diminue leur migration vers le colon (B) et vers le système nerveux central (C). V α 3.2⁺ T cells : lymphocytes Th17 exprimant un TCR spécifiquement dirigé contre le peptide MOG₃₅₋₅₅. *P<0.05, ***P<0.001, ****P<0.0001. CNS : Central Nervous System. Figure adaptée de Duc *et al.*, 2019.

Ainsi, les travaux présentés ci-dessus (Kuhbandner *et al.*, 2019 ; Duc *et al.*, 2019) ainsi que les travaux de Nouri et ses collaborateurs présentés précédemment (Nouri *et al.*, 2014) semblent tous converger vers des modifications structurales et immunologiques très précoces, suggérant une implication du tissu intestinal dans la genèse même de ces modèles animaux de SEP. Cependant,

l'évaluation de l'inflammation intestinale n'autorisent que très peu les suivis longitudinaux de ces modèles animaux de SEP, notamment du fait qu'il faille dans la majeure partie des cas mettre à mort les animaux pour avoir accès à l'état physiopathologique du tractus intestinal. La littérature scientifique manque alors cruellement de données concernant l'évolution des symptômes cliniques en lien avec le niveau d'inflammation intestinale initial. Cependant, certaines techniques d'imagerie mises au point récemment permettent d'évaluer de manière non invasive le niveau d'inflammation intestinale *in vivo*. Nous proposons de présenter une de ces méthodes non invasives, à savoir l'IRM moléculaire.

III.5. L'IRM moléculaire de l'inflammation intestinale.

L'évaluation de l'inflammation intestinale chez l'humain, notamment dans le cadre des MICI, repose dans la majeure partie des cas sur l'iléocoloscopie avec biopsies pour le diagnostic, le suivi de la pathologie et l'évaluation thérapeutique (Taylor *et al.*, 2018). Cependant, de telles procédures entraînent de l'inconfort chez les patients et peuvent conduire à des complications telles que des perforations de la paroi intestinale. De plus, cette technique ne permet l'accès qu'à la partie inférieure du tractus intestinal à savoir le rectum, le colon et l'iléon terminal (Miles *et al.*, 2019). Cependant, des alternatives moins invasives existent telles que l'IRM. Bien que cette méthode permette l'évaluation du tractus intestinal dans son ensemble, celle-ci ne permet malheureusement que la détection de lésions intestinales sévères et ne permet pas de détecter de petites lésions inflammatoires circonscrites qui n'auraient pas d'impact majeur dans la structure anatomique du tractus digestif (Greenup *et al.*, 2016). Ces limitations techniques existent également chez l'animal, et en particulier chez le rongeur de laboratoire. En effet, bien que de nouvelles méthodes d'évaluation *in vivo* de l'inflammation intestinale chez le petit animal émergent telles que l'imagerie par échographie endoscopique et la biomicroscopie échographique endoluminale ou bien la tomographie par émission de positons, celles-ci semblent encore insuffisantes notamment du fait du caractère invasif de ces procédures et de la difficulté à les mettre en place (Pinto de Britto *et al.*, 2013 ; Bernardis *et al.*, 2015). L'IRM moléculaire semble quant à elle être une technique prometteuse dans le suivi longitudinal et non invasif de l'inflammation intestinale chez l'humain et chez l'animal. Cette technique repose sur l'utilisation d'agents de contraste constitués de microparticules d'oxyde de fer mesurant environ 1µm de diamètre (MPIO pour « Microsized Particle of Iron Oxide » ; Shapiro *et*

al., 2004) couplés à des anticorps dirigés contre une molécule d'intérêt créant un hyposignal sur les séquences IRM pondérées en T2*. Ces agents de contraste se trouvent être particulièrement intéressants pour l'évaluation de l'expression endothéliale de molécules d'adhésion vasculaire et de ce fait pour l'étude de l'inflammation du SNC (McAteer *et al.*, 2007 ; Montagne *et al.*, 2012 ; Gauberti *et al.*, 2013 ; Fournier *et al.*, 2017). Plus récemment, l'utilisation de ces MPIO a montré un grand intérêt dans la visualisation par IRM moléculaire de l'inflammation intestinale. En effet, dans un article publié en 2020, les auteurs ont été en mesure de détecter une telle inflammation dans trois modèles murins distincts d'inflammation intestinale, à savoir une activation endothéliale induite par du lipopolysaccharide (LPS), un modèle de rectocolite hémorragique induite par le sulfate de sodium dextran (DSS pour « Dextran Sodium Sulfate ») ou par l'acide trinitrobenzène sulfonique (TNBS pour « Trinitrobenzene Sulfonic acid »), par IRM moléculaire après injection de MPIO couplés à des anticorps dirigés contre MAdCAM-1 (Fournier *et al.*, 2020). De manière intéressante, les auteurs de ces travaux ont été en mesure de détecter une inflammation à tous les niveaux du tractus intestinal (colon et intestin grêle), y compris dans des conditions d'inflammation très modérées où aucune manifestation phénotypique n'était détectée (Figure 46). Ainsi, cette technique semble en mesure de nous permettre une évaluation non invasive et longitudinale de l'inflammation intestinale dans divers modèles animaux de SEP.

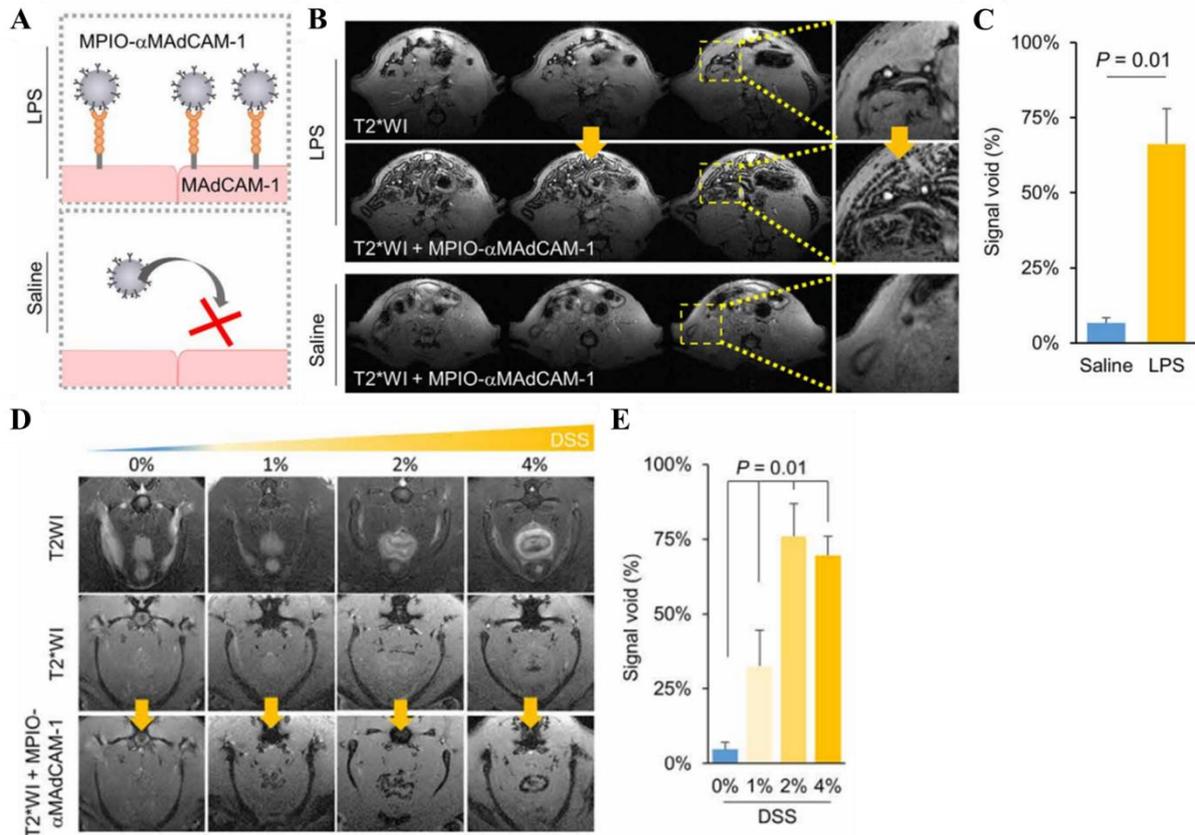


Figure 46 : Exemple de signaux obtenus en IRM moléculaire de l'inflammation intestinale utilisant des MPIO dirigés contre MAdCAM-1 (MPIO- α MAdCAM-1).

(A) Représentation schématique de la fixation d'un MPIO dirigé contre MAdCAM-1 dans un contexte d'inflammation intestinale. (B) Images représentatives pondérées en T2* de l'intestin grêle de souris traitées avec du LPS (partie supérieure) avant (T2*WI) et après injection des MPIO- α MAdCAM-1 (T2*WI + MPIO- α MAdCAM-1) et de souris contrôles après injection des MPIO- α MAdCAM-1 (partie inférieure ; T2*WI + MPIO- α MAdCAM-1) et (C) leurs quantifications respectives. (D) Images représentatives pondérées en T2 (T2WI) et T2* avant (T2*WI) et après injection des MPIO- α MAdCAM-1 (T2*WI + MPIO- α MAdCAM-1) de colons de souris traitées avec des doses croissantes de DSS et (E) leurs quantifications respectives. MPIO : Microsized Particle of Iron Oxide ; MAdCAM-1 : Mucosal Addressin Cell Adhesion Molecule-1 ; LPS : Lipopolysaccharide ; T2*WI : T2* Weighted Image ; T2WI : T2 Weighted Image ; DSS : Dextran Sodium Sulfate. Source : Fournier *et al.*, 2020.

OBJECTIFS

OBJECTIFS

Au regard des données de la littérature scientifique présentées dans l'introduction, plusieurs questionnements émergent, dont les résolutions furent l'objet des travaux présentés dans ce manuscrit.

Dans un premier temps, il a été montré que la survenue d'évènements stressants était un facteur de risque à la fois pour le déclenchement de la SEP mais également dans la survenue de poussées chez des patients atteints de la forme RR-SEP. Des études ont permis de mettre en évidence, dans divers modèles animaux de SEP, que des paradigmes de stress chroniques semblaient à l'inverse être protecteur dans ces modèles. Peu d'études se sont intéressées aux effets de stress aigus dans de tels modèles, mais semblent cependant converger dans le sens d'un effet délétère de ceux-ci dans l'apparition des symptômes cliniques et leur sévérité. Tout particulièrement, un protocole de stress aigu appliqué pendant la phase pré-symptomatique d'une RR-EAE (EAE-PLP) précipite la survenue des symptômes cliniques. Cependant, aucune donnée n'est à notre connaissance disponible dans la littérature scientifique quant aux effets de tels stress aigus survenant pendant la phase de rémission des symptômes dans l'occurrence des rechutes dans le modèle animal de RR-SEP. En effet, cette forme étant la plus fréquemment rencontrée chez les patients, l'étude des effets du stress sur les poussées dans son modèle animal permettrait d'envisager des méthodes de remédiation plus en accord avec une éventuelle transposition à l'humain. L'enrichissement environnemental, qui chez l'humain pourrait être défini comme des situations autorisant une augmentation de l'activité cognitive, intellectuelle, motrice et sociale, semble un bon candidat dans cette remédiation. Outre ses effets protecteurs dans les modèles animaux de SEP déjà décrits par la littérature scientifique, notamment par l'intermédiaire d'une augmentation de la plasticité cérébrale, ses effets antagonistes à ceux d'un stress psychologique pourraient permettre d'en réduire l'impact dans un modèle animal de RR-SEP. Ainsi, les premiers objectifs des travaux présentés dans ce manuscrit ont donc été les suivants :

- Déterminer les effets d'un stress aigu répété pendant la phase de rémission d'une RR-EAE (EAE-PLP) sur l'incidence des rechutes et leur sévérité.

- Déterminer les effets de l'enrichissement environnemental sur l'ensemble de la pathologie dans ce modèle de RR-EAE.
- Déterminer si un tel paradigme permet de réduire l'influence du stress aigu répété sur l'évolution de la pathologie.

Dans un second temps, nous avons fait l'état des connaissances de l'implication du tissu intestinal dans la physiopathologie de la SEP et ses modèles animaux. Premièrement, l'incapacité à induire une EAE chez des animaux dépourvus de microbiote intestinal, ainsi que les diverses modifications de sa composition observées chez les patients atteints de SEP, arguent en faveur de son implication dans la genèse même de la pathologie, et confortent l'hypothèse de l'existence d'un mimétisme moléculaire entre certains micro-organismes de la flore intestinale et des peptides constitutifs de la gaine de myéline. De plus, des modifications structurelles précoces, avant toute apparition de symptômes moteurs, telle qu'une augmentation de la perméabilité intestinale, appuient l'idée d'une origine intestinale de la pathologie. Plus précisément, des cellules auto-réactives intestinales dirigées contre des peptides constitutifs de la gaine de myéline seraient activées dans le tractus intestinal avant leur migration vers le SNC. Cette hypothèse est notamment supportée par des travaux ayant mis en évidence que l'absence d'expression de la molécule MAdCAM-1, indispensable à la transmigration des lymphocytes vers le tissu intestinal, ainsi que l'inhibition de son interaction avec son ligand, l'intégrine $\alpha_4\beta_7$, à la surface de ceux-ci, entraîne une diminution de l'incidence et de la sévérité de la pathologie dans des modèles progressifs de SEP. Cependant, la plupart des méthodes mises en œuvre pour l'étude d'une telle dysfonction intestinale dans les modèles animaux de SEP ne permettent pas de suivi longitudinal des symptômes cliniques en rapport avec le niveau d'inflammation intestinale. De plus, aucune étude à notre connaissance ne s'est intéressée à de telles investigations dans un modèle animal de RR-SEP. Ainsi, les objectifs de la seconde partie de ces travaux ont été de :

- Caractériser l'inflammation intestinale dans les deux principaux modèles animaux de SEP (EAE-MOG et EAE-PLP) par utilisation de l'IRM moléculaire ciblant la protéine MAdCAM-1.
- Caractériser de manière concomitante l'inflammation intestinale et l'inflammation centrale dans ces modèles par analyses immunohistochimiques et/ou cytométrie en flux.

- Déterminer les impacts d'une inflammation intestinale élevée pendant des périodes asymptomatiques sur l'évolution future des symptômes neurologiques dans ces deux mêmes modèles.

Enfin, nous avons rapidement exposé que des évènements stressants étaient en mesure, chez l'humain comme chez l'animal, d'induire une augmentation de la perméabilité intestinale par l'intermédiaire d'une déstabilisation des jonctions serrées situées sur la partie apicale des entérocytes. Une telle augmentation de la perméabilité intestinale pourrait alors être en mesure d'augmenter la translocation d'espèces bactériennes vers la *lamina propria* et ainsi participer à une réactivation locale de cellules immunitaires auto-réactives y résidant. Ainsi, les effets du stress sur la sévérité de l'EAE pourraient être au moins en partie médiée par ces modifications structurelles intestinales. Ainsi, l'un des derniers objectifs de ces travaux a été de déterminer, par l'intermédiaire de l'utilisation de l'IRM moléculaire, si un stress aigu était en mesure d'augmenter l'expression de MAdCAM-1.

RESULTATS

RESULTATS

ETUDE N°1 : EFFETS DU STRESS ET DE L'ENRICHISSEMENT ENVIRONNEMENTAL DANS UN MODELE MURIN DE SEP RECURRENTE-REMITTENTE

Contexte de l'étude :

L'identification de facteurs pouvant conduire à des récurrences de symptômes chez les patients atteints de SEP connaît un intérêt croissant. De nombreuses observations cliniques indiquent que le stress psychologique en est un (Mohr *et al.*, 2004). Ainsi, plusieurs études ont tenté de reproduire ces observations chez l'animal afin de mieux comprendre les mécanismes physiopathologiques. Cependant, la plupart d'entre elles ont pu mettre en évidence un effet protecteur du stress dans ces modèles (Levine *et al.*, 1962 ; Levine et Saltzman, 1987 ; Correa *et al.*, 1998). L'une des explications privilégiées de cet effet protecteur repose sur l'utilisation de paradigmes de stress chronique, connus de longue date comme étant immunosuppresseurs. Peu d'études se sont quant à elles intéressées aux effets d'un stress aigu dans ces modèles animaux. Parmi elles, une étude a pu mettre en évidence que l'application d'un protocole de stress aigu avant déclaration de la pathologie précipitait l'apparition des symptômes moteurs (Chandler *et al.*, 2002). Cependant, aucune étude, à notre connaissance, ne s'est intéressée aux effets de tels stress aigus survenant pendant la phase de rémission sur l'occurrence de rechutes par la suite.

Des stratégies de réduction du stress tendent à montrer un effet bénéfique dans l'occurrence des rechutes chez les patients (Mohr *et al.*, 2012). L'enrichissement environnemental, décrit comme permettant d'atténuer les réponses au stress chez les animaux, pourrait à ce titre se rapprocher de telles stratégies (Crofton *et al.*, 2015). Cependant, bien que des travaux se soient intéressés aux effets de telles conditions d'hébergement dans des modèles de PP-EAE (Magalon *et al.*, 2007 ; Bonfiglio *et al.*, 2019 ; Xiao *et al.*, 2019), aucune à notre connaissance ne s'est intéressée à l'étude de l'enrichissement environnemental comme stratégie de réduction de stress chez les animaux atteints de RR-EAE. En effet, les effets d'un tel enrichissement environnemental dans un modèle récurrent-rémittent de la pathologie (EAE-PLP), et tout particulièrement sur l'incidence des rechutes, ne sont pas connus.

Objectifs :

- Déterminer les effets d'un stress aigu répété pendant la phase de rémission des symptômes moteurs sur l'incidence et la sévérité des rechutes dans un modèle murin récurrent-rémittent de SEP.
- Déterminer les effets de l'enrichissement environnemental sur l'incidence et la sévérité du modèle.
- Déterminer si de telles conditions d'hébergement en environnement enrichi permettent d'atténuer les effets du stress aigu répété.

Méthodes :

Des souris femelles de la souche SJL/J ont été hébergées soit en condition d'enrichissement environnemental par l'intermédiaire de cages de MarlauTM, soit dans des conditions standards. Puis, une EAE récurrente-rémittente a été induite par immunisation contre le peptide PLP₁₃₉₋₁₅₁. L'évolution des symptômes moteurs a été évaluée quotidiennement par attribution d'un score clinique. Après deux jours de rémission complète à la fin de la première poussée, les animaux ont été divisés en deux groupes : un groupe soumis à un paradigme de stress aigu répété et un groupe contrôle. Le paradigme de stress aigu répété a consisté à placer les souris sur une plateforme au centre d'un bac rempli d'eau 1h par jour pendant 4 jours consécutifs (stress d'évitement de l'eau : WAS pour « Water Avoidance Stress » ; Mönnikes *et al.*, 1993). Les animaux contrôles ont été placés dans des cages d'hébergement standard. Les scores cliniques des animaux ont continué à être relevés quotidiennement afin d'évaluer la survenue et la sévérité des rechutes.

Principaux résultats obtenus :

- Un stress aigu répété appliqué pendant la phase de rémission des symptômes moteurs précipite les rechutes de la maladie et en augmente l'incidence.
- L'enrichissement environnemental réduit significativement l'incidence de déclaration de l'EAE ainsi que l'incidence et la sévérité des rechutes.
- L'enrichissement environnemental abolit les effets délétères du stress aigu répété sur les rechutes de la pathologie.

Conclusion :

Ces travaux ont ainsi pu montrer qu'un stress aigu répété appliqué pendant la phase de rémission d'une EAE-PLP montrait des effets délétères quant à la survenue de rechutes de la pathologie. Inversement, l'enrichissement de l'environnement des animaux réduit de manière importante la sévérité de celle-ci, et contrecarre les effets délétères du stress aigu. Ainsi, l'élaboration de protocoles chez l'humain basée sur ces observations, en association avec les traitements pharmacologiques disponibles, pourrait permettre d'optimiser la prise en charge de la maladie, et notamment de diminuer les effets néfastes d'évènements stressants sur son évolution.

Cette étude a fait l'objet d'une publication en tant que co-premier auteur dans le journal Multiple Sclerosis Journal – Experimental, Translational and Clinical insérée ci-après.

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.¹ However, several studies report that acute stressful life events (marital separation, difficulties at work, changes in place of residence, death of a relative, etc.)² increase the probability for MS patients to experience a relapse.³ 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.⁴ Conversely, stress reduction strategies have shown positive effects in MS patients.⁵

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, Cyceron Centre,
Institut Blood and
Brain@Caen-Normandie,
Caen, France.
docagne@cyceron.fr

Antoine Philippe Fournier,
Normandie Univ, Unicaen,
Inserm, Physiopathology and
Imaging of Neurological
Disorders, Cyceron 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).⁶ However, most of the studies have used chronic stress (more than one hour per day for more than five days),⁶ 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.⁷ More recently, mild chronic stress was shown to exacerbate and accelerate the clinical symptoms of rat EAE.⁸ 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 (PLP₁₃₉₋₁₅₁, 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.⁹

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).⁶ 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

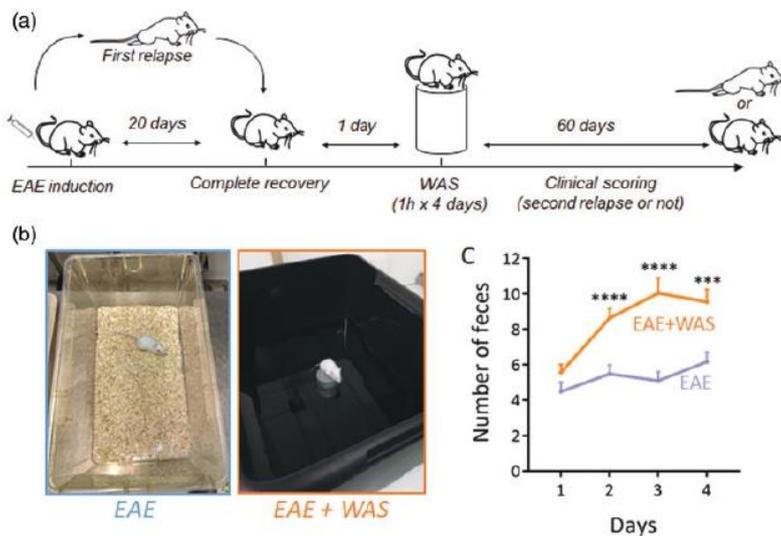


Figure 1. Experimental design for water avoidance stress. (a) Water avoidance stress (WAS, one hour per day for four days) was applied during the remission phase of PLP-induced relapsing-remitting EAE mice and the clinical scoring was assessed during 60 days. (b) Photography of the experimental system. 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.¹⁰ This procedure is fully non-invasive and was preferred to other methods such as measurement of stress hormones in the bloodstream 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 ± 3.43 vs. 55.33 ± 4.92 ; $P=0.0189$; mean duration of remission: 23.67 ± 3.66 vs. 38.0 ± 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 ± 0.29 vs. 2.50 ± 0.47 . Table 1).

Environmental enrichment has been described as an efficient paradigm to reduce stress in laboratory rodents.⁹ 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 ± 0.41 vs. 13.74 ± 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

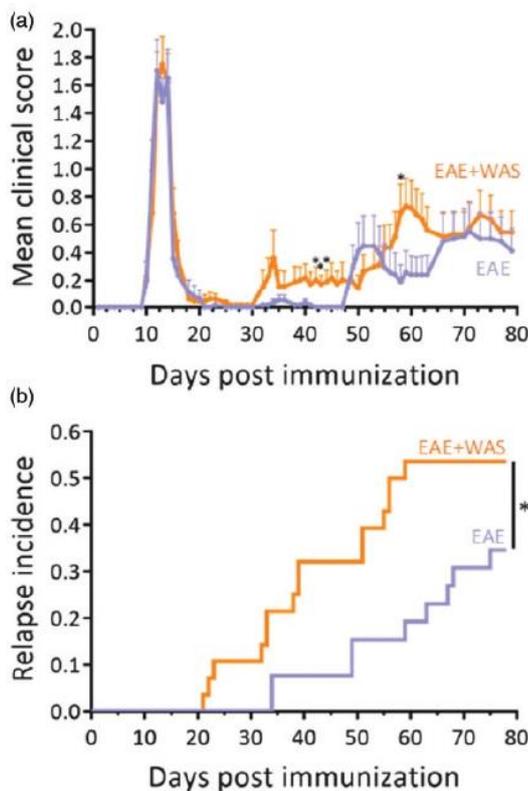


Figure 2. Acute stress precipitates relapse in EAE animals. (a) Clinical score was assessed daily by an examiner blinded to the treatment ($n=26$ and $n=28$ for EAE and EAE+WAS groups respectively; $*P<0.05$, two-way repeated measures ANOVA + Bonferroni's multiple comparison). (b) Clinical evaluation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

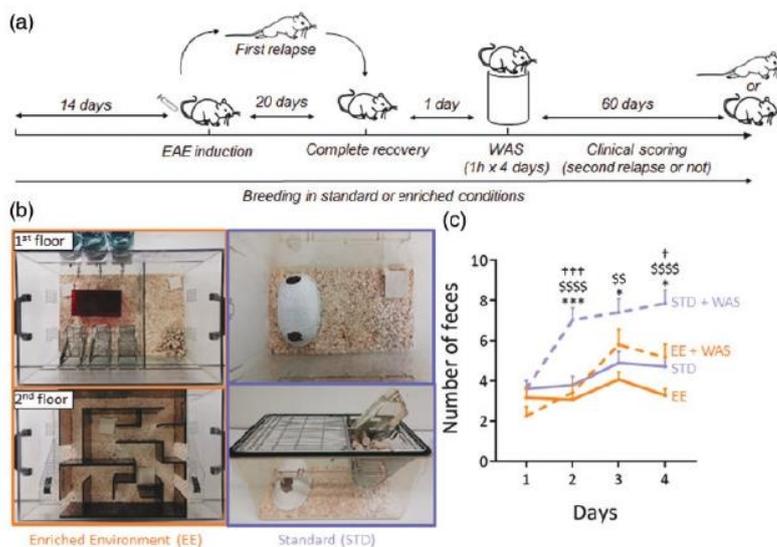


Figure 3. Experimental design for environment enrichment. (a) Environmental enrichment (EE) was applied from 14 days pre-EAE induction to the end of the protocol. Standard (STD) animals were kept in standard breeding conditions. WAS was applied to half of the animals of each group during the remission 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 ± 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 ± 0 vs. 2.00 ± 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 ± 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

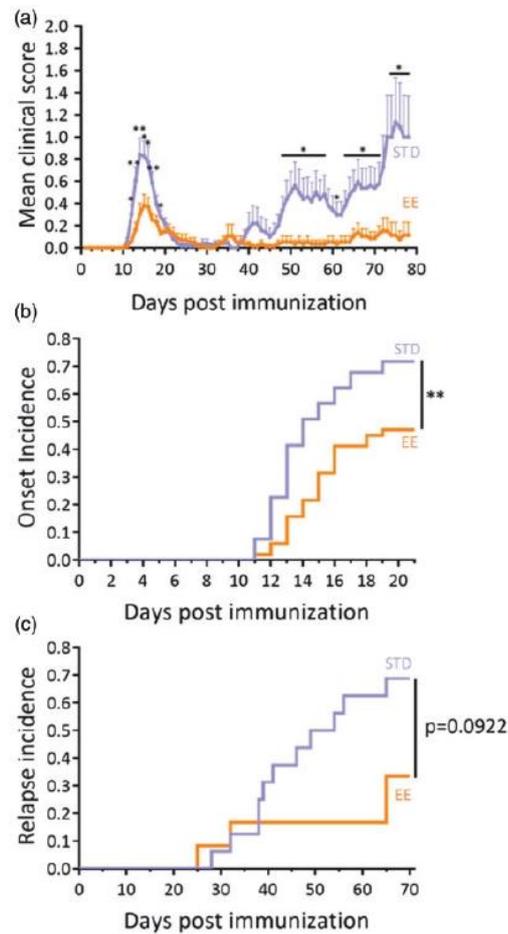


Figure 4. Environmental enrichment reduced EAE severity. (a) Clinical score assessed daily by an examiner blinded to the treatment in the standard (STD) and enriched environment (EE) groups (n = 53 and n = 51 for STD and EE groups respectively; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$, two-way repeated measures ANOVA + 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,⁹ 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.¹¹ 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.⁸ Our data match clinical observation in MS patients, previously summarized in a meta-analysis¹² 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.¹³ In addition to these pathways, stress also increases intestinal barrier permeability.¹⁴ Animal studies give a possible link between gut inflammation and MS: intestinal barrier dysfunction occurs at the onset of monophasic EAE¹⁵ and a pro-inflammatory response in the gut has been shown to trigger EAE.^{16,17} Conversely, the sequestration of Th17 cells in the gut confers resistance to EAE.¹⁸ 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 inflammation¹⁹ 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^{20,21} 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 models⁸ and coincide with clinical data,¹² 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	P-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.

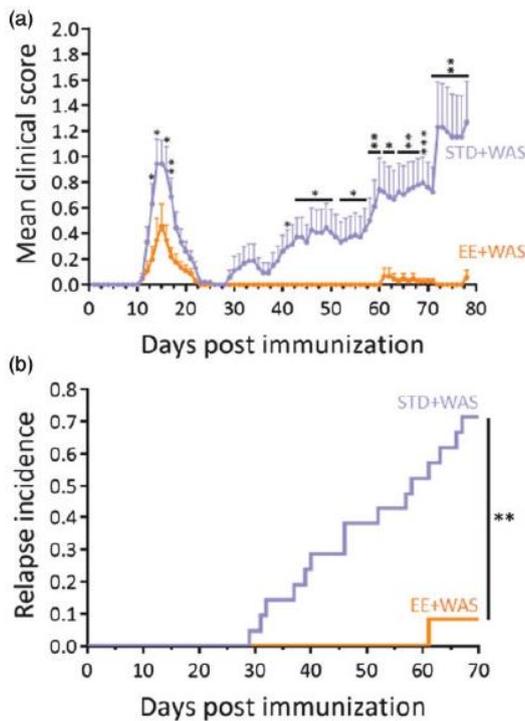


Figure 5. Environmental enrichment reversed the effects of stress on EAE severity. (a) Clinical score assessed daily by an examiner blinded to the treatment in the STD+WAS and EE+WAS groups (n = 21 and n = 12 for STD+WAS and EE+WAS groups respectively; *P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001, two-way repeated 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 exerts 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 reports suggested that environmental enrichment increases cerebral activity in the prefrontal cortex and that this increased activity participates in setting up stress resiliency.²² 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.²³

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.^{24,25} 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

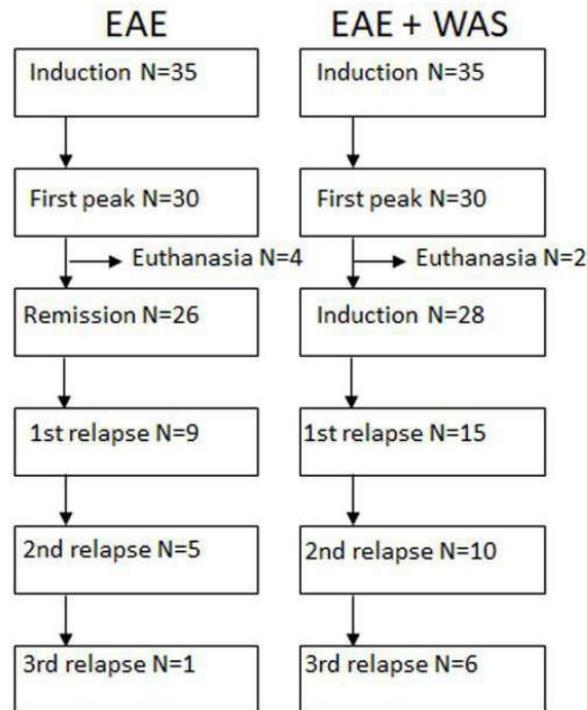
Supplemental material for this article is available online.

References

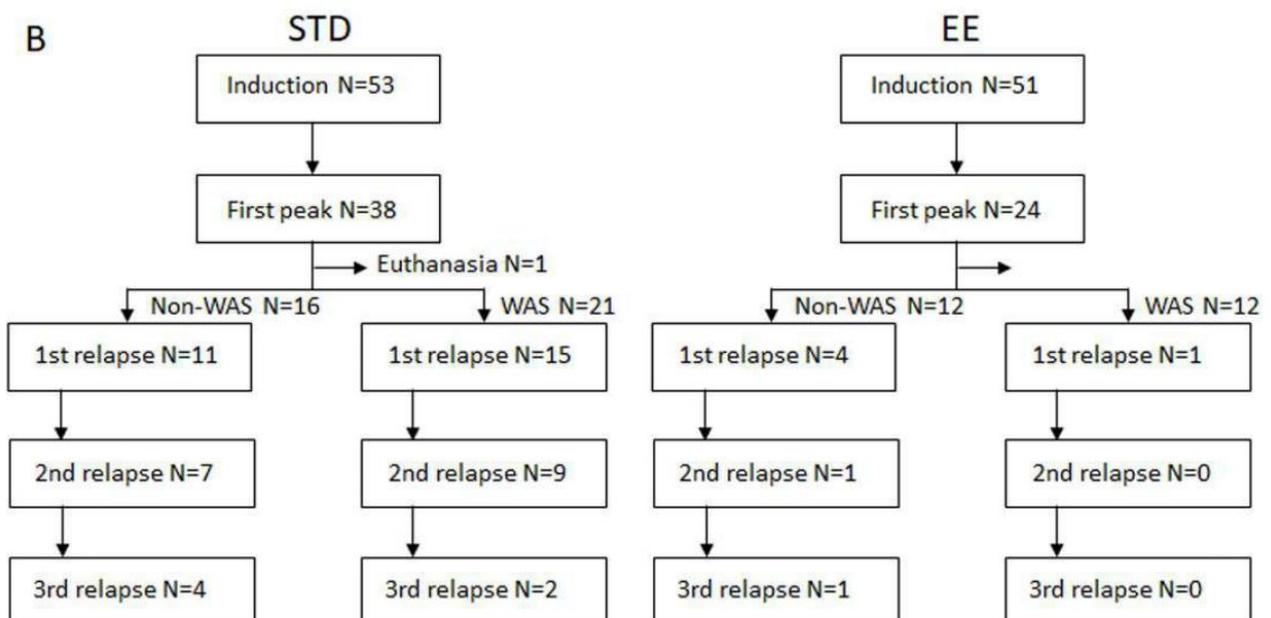
1. Briones-Buixassa L, et al. Stress and multiple sclerosis: a systematic review considering potential moderating and mediating factors and methods of assessing stress. *Health Psychol Open* 2015; 2: 1–16.
2. Holmes TH and Rahe RH. The social readjustment rating scale. *J Psychosom Res* 1967; 11: 213–218.
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. Gurfein 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, Westrom 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-glia-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.

A



B



Supplementary Figure 1: Distribution of animals in experimental groups and clinical outcome along the course of EAE. The diagram summarizes how animals were distributed in the experimental groups and the number of animals developing a first clinical peak and the subsequent relapses in the different conditions.

ETUDE N°2 : ETUDE DE L'INFLAMMATION INTESTINALE PAR IRM MOLECULAIRE DE MADCAM-1 DANS DES MODELES MURINS DE SEP

Contexte de l'étude :

Bien qu'un grand nombre de facteurs de risque d'apparition d'une SEP ait été mis en évidence par la littérature scientifique, l'origine exacte de la pathologie, s'il en est une seule, reste encore incertaine. Cependant, des découvertes récentes arguent en faveur d'une implication d'une réponse immunitaire périphérique, et notamment au niveau du tractus intestinal, dans la mise en place de la réaction auto-immune du SNC. En effet, certaines études mettent en avant un rôle probable d'un dérèglement de l'axe microbiote-intestin-cerveau dans la SEP et ses modèles animaux (Goverman *et al.*, 1993 ; Lee *et al.*, 2011). Par exemple, une étude publiée en 2017 a montré qu'une transplantation de microbiote fécal issu de patients atteints de SEP augmentait l'incidence d'apparition d'une EAE spontanée (Berer *et al.*, 2017). Celle-ci suggère ainsi qu'il existerait des changements dans la composition du microbiote intestinal chez les patients atteints de SEP qui pourraient être impliqués dans le développement de la pathologie. D'autres études vont dans le sens d'une implication du tissu intestinal dans l'apparition même de la pathologie. En effet, dans une étude publiée en 2014, les auteurs ont mis en évidence qu'une augmentation de la perméabilité intestinale précédait l'apparition des symptômes moteurs dans l'EAE (Nouri *et al.*, 2014). A celle-ci était de plus associée une augmentation du nombre de lymphocytes Th1 et Th17 et une diminution du nombre de lymphocytes Treg dans la *lamina propria*, les plaques de Peyer et les nœuds lymphatiques mésentériques des animaux EAE. Dans une autre étude réalisée sur une EAE induite par transfert adoptif de lymphocytes Th17 auto-réactifs, les auteurs ont montré que ces cellules Th17 migraient en premier lieu dans le colon avant de rejoindre le SNC (Duc *et al.*, 2019). De manière intéressante, l'inhibition de l'extravasation des lymphocytes vers le tissu intestinal par l'intermédiaire d'une immunothérapie dirigée contre l'intégrine $\alpha_4\beta_7$ diminuait la sévérité de l'EAE et diminuait le nombre de lymphocytes Th17 à la fois dans le colon et dans la moelle épinière des animaux (Duc *et al.*, 2019). Les auteurs de cette étude avaient alors émis l'hypothèse selon laquelle une réactivation des

lymphocytes Th17 dans le colon était nécessaire pour l'induction d'une démyélinisation centrale. Par la suite, l'implication de ce trafic de lymphocytes vers le tissu intestinal dans la pathogénèse de l'EAE a été étudiée. Des auteurs ont mis en évidence que des souris déficientes en MAdCAM-1 (MAdCAM-1-KO) étaient plus résistantes à l'induction d'une EAE (Kuhbandner *et al.*, 2019). Ces souris MAdCAM-1-KO montraient de plus une diminution du nombre de lymphocytes Th1 et Th17 dans la *lamina propria* et les plaques de Peyer de l'intestin grêle. Enfin, les auteurs de cette étude ont montré que l'inhibition de MAdCAM-1 par utilisation d'anticorps monoclonaux retardait l'apparition des symptômes moteurs (Kuhbandner *et al.*, 2019). Ainsi, ces études suggèrent qu'une première migration des cellules auto-réactives au niveau intestinal est un prérequis dans le déclenchement de la pathologie. Néanmoins, aucune d'entre elles ne s'est intéressée à l'étude des niveaux d'expression de MAdCAM-1 au cours de la pathologie, ni aux conséquences de cette expression sur l'évolution de celle-ci. De plus, ces études ne se sont focalisées que sur des modèles progressifs de la SEP. Aucune donnée n'est disponible quant à l'implication d'une inflammation intestinale dans un modèle animal de RR-SEP, qui se trouve être cependant la forme la plus fréquente de la pathologie humaine.

Objectifs :

- Caractériser l'inflammation intestinale dans des modèles murins de PP-SEP (EAE-MOG) et de RR-SEP (EAE-PLP) par utilisation de l'IRM moléculaire ciblant la protéine MAdCAM-1.
- Caractériser l'inflammation intestinale et l'inflammation centrale dans ces modèles par analyses immunohistochimiques et/ou cytométrie en flux.
- Déterminer les conséquences d'une telle inflammation intestinale pendant les périodes asymptomatiques de ces modèles sur l'évolution subséquente des symptômes moteurs.

Méthodes :

Des souris mâles de la souche C57BL/6J et des souris femelles de la souche SJL/J ont été immunisées respectivement contre le peptide MOG₃₅₋₅₅ et PLP₁₃₉₋₁₅₁. L'évolution des symptômes moteurs a été évaluée quotidiennement par attribution d'un score clinique. Aux scores cliniques choisis, les souris ont été soumises à un examen en IRM moléculaire ciblant la protéine MAdCAM-1 afin d'évaluer

l'inflammation intestinale en lien avec l'évolution des symptômes moteurs. Les animaux ont ensuite été mis à mort et les colons, iléons et moelles épinières ont été prélevés pour analyses immunohistochimiques des populations lymphocytaires. Des animaux aux mêmes scores cliniques ont également été prélevés pour analyses de ces populations par cytométrie en flux. D'autres animaux ont été soumis à un examen en IRM moléculaire ciblant MAdCAM-1 aux jours 10 à 12 post-immunisation (EAE-MOG) ou deux jours après une première rémission complète (EAE-PLP) pour évaluer les conséquences du niveau d'inflammation intestinale sur l'évolution future des symptômes moteurs. Enfin, des souris de la souche C57BL/6J ont été traitées avec du DSS (Dextran Sodium Sulfate) à 1.5% dans l'eau de boisson pendant 5 jours avant induction d'une EAE-MOG pour évaluer les effets d'une inflammation intestinale modérée expérimentalement induite sur l'évolution des symptômes moteurs par la suite.

Principaux résultats obtenus :

- L'expression de MAdCAM-1 augmente avec le score clinique dans l'EAE-MOG et l'EAE-PLP.
- Les populations lymphocytaires B et Th diminuent avec le score clinique dans l'iléon parallèlement à leur augmentation dans la moelle épinière des animaux.
- Un niveau d'expression élevé de MAdCAM-1 pendant la phase présymptomatique d'une EAE-MOG retarde l'apparition des symptômes moteurs.
- Un faible niveau d'expression de MAdCAM-1 pendant la phase de rémission d'une EAE-PLP est associé à un plus grand risque de conversion vers une SP-EAE tandis qu'une expression élevée semble promouvoir une évolution récurrente-rémittente des symptômes moteurs.
- Une inflammation intestinale (expérimentalement induite par traitement au DSS) avant induction d'une EAE-MOG semble retarder l'apparition des symptômes moteurs et promouvoir une évolution biphasique de ceux-ci.

Conclusion :

Ces travaux ont ainsi permis de confirmer l'implication d'une inflammation intestinale dans la physiopathologie de la SEP par l'intermédiaire de deux modèles murins distincts de la pathologie.

Néanmoins, une telle inflammation semble avoir des conséquences différentes en fonction de sa temporalité. En effet, alors qu'une augmentation de l'inflammation intestinale dans les premiers temps de la pathologie semble liée à la mise en place de la réaction auto-immune, le maintien de celle-ci dans le temps semble promouvoir des évolutions récurrentes-rémittentes de la pathologie. A l'inverse, sa diminution *a posteriori* semble augmenter le risque de conversion vers une forme secondairement progressive. D'autres investigations s'avèrent nécessaires pour mieux comprendre la cinétique de l'inflammation intestinale dans ces modèles animaux de SEP et ses conséquences sur l'évolution de la maladie.

Cette étude fera prochainement l'objet d'une publication en tant que premier auteur, dont la première version est insérée ci-après.

Intestinal inflammation assessment by molecular MRI targeting MAdCAM-1: A predictive tool for MS evolution?

Authors: Erwan Baudron¹, Sara Martinez de Lizarrondo¹, Maxime Gauberti^{1,2}, Denis Vivien^{1,3}, Fabian Docagne^{1,4}, Isabelle Bardou¹

Affiliations:

(1) Normandie Univ, UNICAEN, INSERM, PhIND “Physiopathology and Imaging of Neurological Disorders”, Institut Blood and Brain @ Caen-Normandie, Cyceron, 14000, Caen, France

(2) Department of Diagnostic Imaging and Interventional Radiology, CHU Côte de Nacre, Caen, France

(3) Department of Clinical Research, CHU Côte de Nacre, Caen, France

(4) Current address: INSERM, Département de l'information scientifique et de la communication (DISC), 75654 Paris cedex 13, France.

Abstract

Multiple sclerosis (MS) is an autoimmune disease of the central nervous system (CNS). Although some risk factors have already been identified, the origin of the disease is still unknown. Recent evidence suggest that microbiota-gut-brain axis dysfunctions could act as a pathological trigger for MS. Indeed, MAdCAM-1 (Mucosal Addressin Cell Adhesion Molecule-1), a protein overexpressed during intestinal inflammation, has been recently associated with the severity of animal models of MS (EAE: Experimental Autoimmune Encephalomyelitis). Thus, the purpose of this work was to assess the inflammatory status of the intestine, through MAdCAM-1 expression, in EAE animals at different stages of the disease in attempt to predict its evolution.

Here, we show, by molecular magnetic resonance imaging (MRI), an increase of MAdCAM-1 expression with the clinical score in both progressive (MOG-induced) and relapsing-remitting (PLP-induced) EAE. This increase of MAdCAM-1 expression is also associated with a decrease in T-CD4⁺ and B lymphocytes in the ileum concomitantly with their increase in the spinal cord, suggesting a migration of those immune cells from the intestine to the CNS. We then investigated if the level of MAdCAM-1 expression could be predictive for EAE evolution. We revealed that low MAdCAM-1 expression during the pre-symptomatic phase of a MOG-induced EAE precipitates the occurrence of motor impairments. Furthermore, low MAdCAM-1 expression during the remission of a PLP-induced EAE is associated with a higher risk for conversion to a secondary-progressive form.

Altogether, these data reveal that MAdCAM-1 expression assessment, especially during asymptomatic phases, could predict the disease evolution. Thus, intestinal inflammation evaluation could be a useful tool in MS patient's stratification in attempt to personalize treatments.

Keywords: Multiple sclerosis; EAE; MAdCAM-1; gut-brain axis; molecular MRI

Introduction

Multiple Sclerosis (MS) is a demyelinating autoimmune disease of the central nervous system (CNS) leading to motor, sensitive and cognitive impairments in patients. Despite some risk factors have already been associated with the occurrence of the disease like genetic predispositions (International Multiple Sclerosis Genetics Consortium, 2019), viral infection by the Epstein-Barr virus (EBV; Bjornevik *et al.*, 2022) and other environmental factors such as a lack of vitamin D (Ascherio *et al.*, 2014) or air pollution (Cortese *et al.*, 2020), the exact etiology of the pathology is still unknown.

Recent evidence suggests that dysregulations of the microbiota-gut-brain axis could be implicated in the pathogenesis of MS and in its animal models such as experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE; Lee *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2016; Jangi *et al.*, 2016; Berer *et al.*, 2017). For example, fecal microbiota transplantations from MS patients into genetically susceptible mice were able to enhance the occurrence of spontaneous EAE (Berer *et al.*, 2017). This study highlighted that changes in the gut microbiota composition of MS patients could lead to an increased risk of MS-like symptoms apparition. Nevertheless, although some studies have shown an increase of some microbial population such as segmented filamentous bacteria, no pathological microbiota archetype of MS has been clearly identified (Wekerle, 2017).

Other studies support an early implication of the intestinal tissue in EAE pathogenesis (Nouri *et al.*, 2014; Duc *et al.*, 2019). Indeed, in EAE animals, intestinal permeability is increased before the occurrence of motor symptoms and is associated with an increase in Th1 and Th17 lymphocytes and a decrease of Treg populations in the lamina propria (LP), the Peyer's patches (PP) and the mesenteric lymph nodes (MLN; Nouri *et al.*, 2014). Moreover, it has been shown in a passive EAE model that autoreactive Th17 cells adoptively transferred in mice migrated first in the colon before reaching the CNS (Duc *et al.*, 2019).

Further investigations have tried to figure out the implication of lymphocyte homing to the intestinal tissue in EAE by blocking the interaction of MAdCAM-1/ $\alpha_4\beta_7$ integrin (Duc *et al.*, 2019; Kuhbandner *et al.*, 2019). Indeed, MAdCAM-1 (Mucosal Addressin Cell Adhesion Molecule-1) is a cell adhesion

molecule mainly expressed by endothelial venules in the LP, MLNs and Gut-Associated Lymphoid Tissues (GALT) such as PPs (Streeter *et al.*, 1988; Nakache *et al.*, 1989). MAdCAM-1 is the preferential ligand for $\alpha_4\beta_7$ integrin which is expressed at the surface of activated immune cells. It directs rolling and adhesion of lymphocytes to the vascular endothelium and could promote their extravasation to the intestinal tissue (Berlin *et al.*, 1993; Zundler *et al.*, 2019). Moreover, MAdCAM-1 expression is increased in inflammatory bowel diseases (IBD) such as Crohn's disease and ulcerative colitis (Connor *et al.*, 1999; Souza *et al.*, 1999). An immunotherapy targeting MAdCAM-1/ $\alpha_4\beta_7$ integrin interactions reduces lymphocyte homing leading to better outcomes in IBD patients (Sandborn *et al.*, 2013; Feagan *et al.*, 2013). Such immunological blockage of this interaction in EAE animals have been shown to decrease the severity of the disease and is associated with a decrease of Th17 cells in both colon and spinal cord of EAE animals (Duc *et al.*, 2019). In addition, genetic invalidation of MAdCAM-1 in mice reduced incidence of MOG-induced EAE onset and the Th1 and Th17 populations in the LP and the PP of the small intestine (Kuhbandner *et al.*, 2019). Nevertheless, none study has investigated the level of MAdCAM-1 expression during the disease course of both relapsing-remitting and chronic EAE models and its consequences on the disease progression. Our group have recently developed a contrast agent that allowed non-invasive assessment of MAdCAM-1 using molecular magnetic resonance imaging (MRI) in several animal models of IBD (Fournier *et al.*, 2020).

In the present study, we first assessed the level of intestinal inflammation through MAdCAM-1 molecular MRI in MOG- and PLP-induced EAE during the disease course. We reported that MAdCAM-1 expression increases with clinical score in the two different EAE models. Interestingly, we showed a decrease of B and CD4⁺ T cells in the ileum in both EAE animals concomitantly with their increase in the spinal cord. Then, we investigated whether the level of MAdCAM-1 expression by molecular MRI during asymptomatic phases of the disease (*i.e.* before the occurrence of symptoms in EAE-MOG animals and during the first remission period in EAE-PLP mice) could predict the disease evolution. Surprisingly, high MAdCAM-1 expression during the pre-symptomatic phase of EAE-MOG was associated with a delayed onset of motor impairments. In PLP-induced EAE mice, two profiles of MAdCAM-1 expression were detected during the remission period (high or low expression). Animals

expressing high MAdCAM-1 exhibited relapsing-remitting course of the disease whereas mice with low MAdCAM-1 expression were more able to convert into secondary-progressive EAE. Moreover, by inducing a model of mild colitis in mice before EAE-MOG immunization, animals presented a delay in the disease onset and were more able to display a biphasic course of the MOG-induced EAE contrary to control animals.

Altogether, these data highlight a crucial role of the intestinal tissue in the pathogenesis of MS animal models and an unexpected link between the level of MAdCAM-1 expression during asymptomatic phases of the disease and its evolution.

Materials and methods

Animals and ethical statement

Experiments were performed in accordance with the French ethical laws (Decree 87/848; Ministère de l'Agriculture et de la Forêt), European guidelines (Directive 2010/63/UE) and ethical committee recommendations. Experiments of this study were approved by the French ministry of education, research and innovation (APAFIS#34308). All experiments were performed following the ARRIVE guidelines (www.nc3rs.org.uk), including randomization as well as blinded analysis. Male C57BL/6J and female SJL/J mice were purchased from Janvier Labs (Le Genest-Saint-Isle, France) and were housed at the animal facility "Centre Universitaire de Ressources Biologiques" (Center Agreement F14118001; Caen, France) under constant temperature ($21\pm 1^\circ\text{C}$) and 12 hours light/dark cycles. All animals were housed in standard laboratory cages by groups of 5 mice per cage with a minimal enrichment (nesting materials, cardboard house) and with access to food and water *ad libitum*. They were acclimated to the local animal facility for at least 2 weeks before the experiments. Animals were monitored daily for body weight, disease evolution, food and water consumption and signs of pain.

Induction and assessment of EAE

Progressive EAE (MOG-induced EAE) was induced in 8-week-old male C57BL/6J mice *via* subcutaneous injection above the shoulders and the flanks of an emulsion mix containing 200µg of recombinant myelin oligodendrocyte glycoprotein peptide (MOG₃₅₋₅₅, GenScript, RP10245) diluted in 100µl of saline, 100µl of complete Freund's adjuvant (Sigma-Aldrich, F5881) and 800µg of heat-killed *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra (BD Adjuvants Difco™, 231141). Sham animals received the same emulsion mix without the MOG₃₅₋₅₅ peptide. All animals were additionally intraperitoneally injected with 200ng of pertussis toxin derived from *Bordetella pertussis* (Sigma-Aldrich, P7208) diluted in 200µl of saline at the time of and at 48h after immunization.

Relapsing-remitting EAE (PLP-induced EAE) was induced in 8-week-old female SJL/J mice *via* subcutaneous injection above the shoulders and the flanks of an emulsion mix containing 200µg of recombinant myelin proteolipid protein peptide (PLP₁₃₉₋₁₅₁, Eurogentec, AS-63912) diluted in 100µl of saline, 100µl of complete Freund's adjuvant (Sigma-Aldrich, F5881) and 800µg of heat-killed *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra (BD Adjuvants Difco™, 231141). Sham animals received the same emulsion mix without the PLP₁₃₉₋₁₅₁ peptide. All animals were additionally intraperitoneally injected with 200ng of pertussis toxin derived from *Bordetella pertussis* (Sigma-Aldrich, P7208) diluted in 200µl of saline at the time of and at 48h after immunization.

Mice were weighted and examined daily for any clinical sign of EAE. In both EAE models, clinical scores (cs) were recorded in a blinded manner by ascending hind limb paralysis: 0, no sign of the disease; 1, limp tail; 2, hind limb weakness; 3, partial hind limb paralysis; 4, complete hind limb paralysis; and 5, moribund or death. For EAE-MOG, a biphasic course of the disease has been defined if a sustained increase (≥ 2 days) of ≥ 1 in cs was observed. For EAE-PLP, a relapse has been defined as a sustained increase (≥ 2 days) of ≥ 1 in cs after a remission period (cs 0 or 0.5) during at least 2 days.

DSS-induced intestinal inflammation before EAE-MOG induction

Dextran Sodium Sulfate (DSS)-treated mice received 1.5% (weight/volume) of DSS (MW ca 40.000, Thermo Fisher Scientific, J63606) in drinking water for 5 days prior to EAE-MOG induction. Control animals had access to normal drinking water.

***In vivo* MAdCAM-1 expression assessment using molecular MRI**

Conjugation of MAdCAM-1 targeting antibodies to MPIO: Micro-sized particles of iron oxide (MPIO; Dynabeads™ MyOne™ Tosylactivated, Invitrogen™, 65501) were covalently conjugated to purified monoclonal rat anti-mouse antibodies targeting MAdCAM-1 (BD Pharmingen™, Clone MECA-367, 553806) or to purified rat IgG2a, κ isotype control antibodies (BD Pharmingen™, Clone R35-95, 553927) in borate buffer (pH 9.5) for 48h at 37°C as previously described (Gauberti *et al.*, 2013). MPIO were then washed using phosphate-buffered saline (PBS) containing 0.5% of bovine serum albumin (BSA, Sigma-Aldrich, A9647), and incubated 24h at room temperature in PBS with 0.5% of BSA. MAdCAM-1 or isotype control conjugated MPIO were stored at 4°C under constant agitation to prevent settling and aggregate formation.

MPIO injection: Mice were deeply anesthetized with 5% isoflurane (Aerrane, Baxter, N°) in 30/70% O₂/N₂O and then maintained using 2% isoflurane in 30/70% O₂/N₂O. Then, a catheter was introduced in the tail vein of the animals to allow intravenous injection of 1.0mg/kg of conjugated MPIOs (conjugated with anti-MAdCAM-1 or isotype control antibodies) around 10 minutes before MRI.

Magnetic resonance imaging: MRI scans were acquired at several time points defined by the experimental protocol using a Pharmascan 7T / 12cm system using surface coils (Bruker). Morphological imaging of the colon was performed using a T2-weighted sequence using the following parameters: TE/TR 36ms/2500ms, flip angle 90°, refocusing pulse 180°, acceleration factor 8 with three excitations, a matrix of 300×300, a field of view of 20×20 mm leading to a 67x67 μ m spatial resolution, and a slice thickness of 0.75 mm. Then, to allow molecular MAdCAM-1 imaging, T2*-weighted sequences of the colon using the following parameters: TE/TR 5.4ms/300ms, flip angle 35°, with four

excitations, a matrix of 300×300, a field of view of 20x20 mm leading to a 67x67µm spatial resolution, and a slice thickness of 0.35mm, was performed before (T2*-weighted images, T2*WI) and after MPIO injection (T2*WI+MPIO-MAdCAM-1 or T2*WI+MPIO-IgG).

MRI images analysis: All MRI images were analyzed using ImageJ 1.53c software (National Institutes of Health) implemented with the MRI file manager plugin. The colonic mucosa surface was segmented using the T2-weighted images. Then, a manual threshold was applied in T2*WI and T2*WI+MPIO-MAdCAM-1 or T2*WI+MPIO-IgG images to allow the quantification of the percentage of voxels with a signal superior to the threshold of the selected area (also called signal void).

Tissue collection

At specific time points (cs 1 to 4 for MOG-induced EAE; cs 2, 4 and 2r for PLP-induced EAE; and their corresponding sham animals), mice were deeply anesthetized with 5% isoflurane (Aerrane, Baxter) in 30/70% O₂/N₂O and were transcardially perfused with cold heparinized saline solution. Colon, ileum and spinal cord were then collected. Colon and ileum were longitudinally opened to remove the intraluminal content, post-fixated for 30 minutes in 4% paraformaldehyde (PFA) in 0.1 M PBS. Spinal cords were post-fixated in 4% PFA for 24h at 4°C. All collected tissues were cryoprotected with PBS buffer containing 20% of sucrose for 24h at 4°C and were then frozen in an embedding resin (Epredia™ Cryomatrix™, Fisher Scientific, 6769006) and stored at -80°C until processing. Transverse sections (10 µm) were obtained using a cryomicrotome (CM3050S, Leica), collected on poly-lysine slides (Epredia™, Fisher Scientific, 10219280) and stored at -80°C until use.

Immunohistochemistry

Immunostaining: Sections were unfrozen, washed three times in PBS at room temperature (RT) and then, were co-incubated with the appropriate primary antibodies diluted in PBS + Triton100X at 0.25% overnight at RT. The following antibodies were used: rabbit polyclonal anti-CD3 (1:400, Abcam, ab5690), AlexaFluor®488 monoclonal rat anti-CD8α (1:200, BD Biosciences, 557668), AlexaFluor®488 monoclonal rat anti-CD45R (1:200, BD Biosciences, 557669) and AlexaFluor®647

monoclonal rat anti-CD4 (1:250, BD Biosciences, 557681). After incubation, all slides were rinsed three times using PBS and primary antibodies to CD3 were revealed using CyTM3 F(ab')₂ fragment donkey anti-rabbit IgG secondary antibodies (1:800, Jackson ImmunoResearch, 711-166-152) diluted in PBS + Triton 100X at 0.25% for 1h 30min at RT. Omission of the primary antibodies was done for each immunohistochemistry experiment. No immunostaining was observed revealing that the secondary antibodies bound specifically to their primary antibody incubated alone. After three more rinses with PBS, sections were cover-slipped with Fluoromount-GTM mounting medium with DAPI (Fisher Scientific, 15596276).

Image acquisition: Colon and ileum images were captured using a Leica DMI6000 microscope coupled with a Hamamatsu Orca Flash 4.0 camera and visualized with Metamorph 7.8.13.0 software. For each conjugated antibody, the exposition time was set as followed: 500ms for CyTM3 F(ab')₂ fragment donkey anti-rabbit IgG and AlexaFluor®647 monoclonal rat anti-CD4, 1000ms for AlexaFluor®488 monoclonal rat anti-CD45R and 1500ms for AlexaFluor®488 monoclonal rat anti-CD8 α antibodies. Images from the spinal cord were captured using an Olympus VS120 slide scanning system coupled with a Hamamatsu Orca Flash 4.0 camera. For each conjugated antibody, the exposition time was set as followed: 200ms for CyTM3 F(ab')₂ fragment donkey anti-rabbit IgG and AlexaFluor®647 monoclonal rat anti-CD4, 400ms for AlexaFluor®488 monoclonal rat anti-CD45R and AlexaFluor®488 monoclonal rat anti-CD8 α antibodies.

Image analysis: All images from the colon, ileum and lumbar part of the spinal cord were analyzed using QuPath 0.3.2 software. Surface values of each section were automatically obtained by selecting areas of interest. Number of CD3-positive (CD3+), CD3/CD4-double positive (CD3+CD4+), CD3/CD8-double positive (CD3+CD8+), CD3-positive and CD4/CD8-double negative (CD3+ CD4- CD8-) and CD45R-positive (CD45R+) cells for each tissue section were also obtained automatically using the object classification and visually verified for each image. Representative immunohistological images were formatted using ImageJ 1.53c (National Institutes of Health) software. All analyses were performed blinded to the experimental data.

Flow cytometry

Cell isolation: Deeply anesthetized mice (MOG-induced EAE animals at cs 1 to 4 and sham animals) were transcardially perfused with DPBS (Gibco™, Fisher Scientific, 12037539). Colon, terminal ileum and spinal cord were collected. Colon and ileum were opened longitudinally and washed in HBSS (Gibco™, Fisher Scientific, 12549069) to remove the intraluminal content. Washed colon and ileum were then cut into 0.5 cm pieces and incubated 3 times in HBSS containing 10mM EDTA (Invitrogen™, Fisher Scientific, 10135423) for 20 minutes at 37°C under gentle agitation (80 rpm). After each incubation, cells were collected by filtration on a 70 µm cell strainer (Fisherbrand™, Fisher Scientific, 11597522). The remaining tissues were then washed with HBSS to remove EDTA and incubated 2 times for 20 minutes at 37°C in 5 mL of HBSS containing 1 Wünsch unit/ml of Liberase™ TL (Sigma Aldrich, 5401020001), 0.01 mg/ml of DNase I (Worthington Biochemical Corporation, LS002058) and 5% of fetal bovine serum (FBS, Sigma Aldrich, F0804) under gentle agitation (80 rpm). After each incubation, cells were collected using a 70 µm cell strainer. For spinal cord cell collection, tissues were cut into fragments and incubated in 2 mL of HBSS containing 1 Wünsch unit/ml of Liberase™ TL, 0.01 mg/ml of DNase I and 5 % of FBS for 45 minutes at 37°C under gentle agitation (80 rpm). The remaining tissues were mechanically disaggregated using a syringe fitted with a 25-gauge needle and filtered using a 70 µm cell strainer. Immune cells were isolated from the myelin components by a 70/30% Percoll (Sigma Aldrich, 17-0891-02) gradient centrifugation at 1200g for 20 minutes at 20°C. All cell suspensions were filtered using a 40 µm cell strainer (Fisherbrand™, Fisher Scientific, 11587522) and washed by centrifugation at 300g for 10 minutes at 4°C before being resuspended in 1ml of DPBS before flow cytometry analysis.

Flow cytometry analysis: Cell suspensions were washed in PBS containing 2% of FBS (staining buffer) by centrifugation at 300g for 10 minutes at 4°C. After supernatant removal, cells were incubated with rat anti-mouse CD16/32 antibody (BD Biosciences, 553142) for 15 minutes at 4°C to block Fc receptors. Cells were incubated 20 minutes at 4°C with the following antibodies diluted in 1 mL of staining buffer + 50 µL of brilliant stain buffer (BD Biosciences, 566349) when appropriated: FITC rat anti-mouse CD45 (BD Biosciences, 553080), BV510 hamster anti-mouse CD3e (BD Biosciences, 563024), PE-

CyTM7 rat anti-mouse CD8 α (BD Biosciences, 552877), APC rat anti-mouse CD4 (BD Biosciences, 553051) and PerCP-CyTM5.5 rat anti-mouse CD45R/B200 (BD Biosciences, 552771). Cell frequencies were obtained using a FACS VerseTM cell analyzer (BD Biosciences) and analyzed using FlowJoTM 7.6.5 software. The gated strategy is represented in Supplementary Figure 3A.

Statistical analysis

All statistical analysis and data representation were performed using Graphpad Prism 9.3.1. When possible, data are represented on graphs as mean \pm SEM. For each data set, normality has been tested using Shapiro-Wilk test. For single comparison of two groups, t-tests or Mann-Whitney tests (when normality could not be assumed) were performed. For multiple comparison defined by a single factor, one-way ANOVA followed by a Bonferroni's multiple comparison or Kruskal-Wallis test followed by a Dunn's multiple comparison (when normality could not be assumed) were performed. For multiple comparison defined by two factors, two-way ANOVA followed by a Bonferroni's multiple comparison were done. Pearson's correlation tests were performed for testing correlations. Onset and relapse incidence curves were analyzed using Mantel-Cox tests. Statistical comparisons of proportion of relapsing-remitting (RR) and secondary progressive (SP) EAE-PLP also as mono- and biphasic EAE-MOG were done using Fisher's exact tests.

Results

MPIO- α MAdCAM-1 signal increases with clinical score in MOG-induced EAE

We first assessed the level of intestinal inflammation through molecular MRI during the time course of MOG-induced EAE (**Figure 1A, 1B**). To do so, we performed, on sham and EAE animals, T2-weighted imaging and T2*-weighted imaging, both before and after MPIO- α MAdCAM-1 intravenous injection (**Figure 1C**). Images obtained after MPIO- α MAdCAM-1 injection revealed an increase of the signal voids in the mucosa of imaged intestine of EAE mice (**Figure 1C** and **Supplementary Figure 1A**). This enhancement of contrast change has been observed at each clinical score in EAE animals (**Figure 1C** and **Supplementary Figure 1A**). Contrary to EAE-mice, sham animals presented only minimal MRI signal changes on post-contrast images (**Figure 1C**). The quantification of signal voids at each clinical score of MOG-induced EAE animals and sham mice showed a significant enhancement of signal void of MPIO- α MAdCAM-1 only in the intestine of EAE mice and it is significantly increased with clinical score (**Figure 1D**). Indeed, sham animals displayed a very low signal void ($12.1 \pm 3.5\%$ vs. $31.7 \pm 4.4 - 56.8 \pm 4.8\%$ for EAE mice; **Figure 1D**). Overall, MPIO- α MAdCAM-1 induced signal void in the intestinal mucosa positively correlated to clinical score (**Figure 1E**). In order to verify whether MPIO- α MAdCAM-1 could bind intestinal endothelial cells, we performed immunohistological analyses of the ileum 30 min after intravenous injection of MPIO- α MAdCAM-1 in EAE mice. In these mice, numerous MPIO- α MAdCAM-1 were bound to vessels in the LP of the colon (**Figure 1F**). Moreover, by injecting control MPIO (*i.e.* MPIO- α Immunoglobulin G - α IgG), that are unable to bind MAdCAM-1, in sham and EAE animals, we did not observe any MRI signal changes in both groups indicating that MPIO- α MAdCAM-1 bind specifically the activated intestine endothelium in our MS animal model (**Supplementary Figures 1B** and **1C**).

Thus, MPIO- α MAdCAM-1-enhanced MRI revealed a greater mucosal inflammation in EAE mice compared to sham mice which follows the disease activity, and that intestinal inflammation is correlated with motor symptoms. These data suggest that intestinal inflammation revealed by molecular MRI of MAdCAM-1 could predict clinical score of MOG-induced EAE mice.

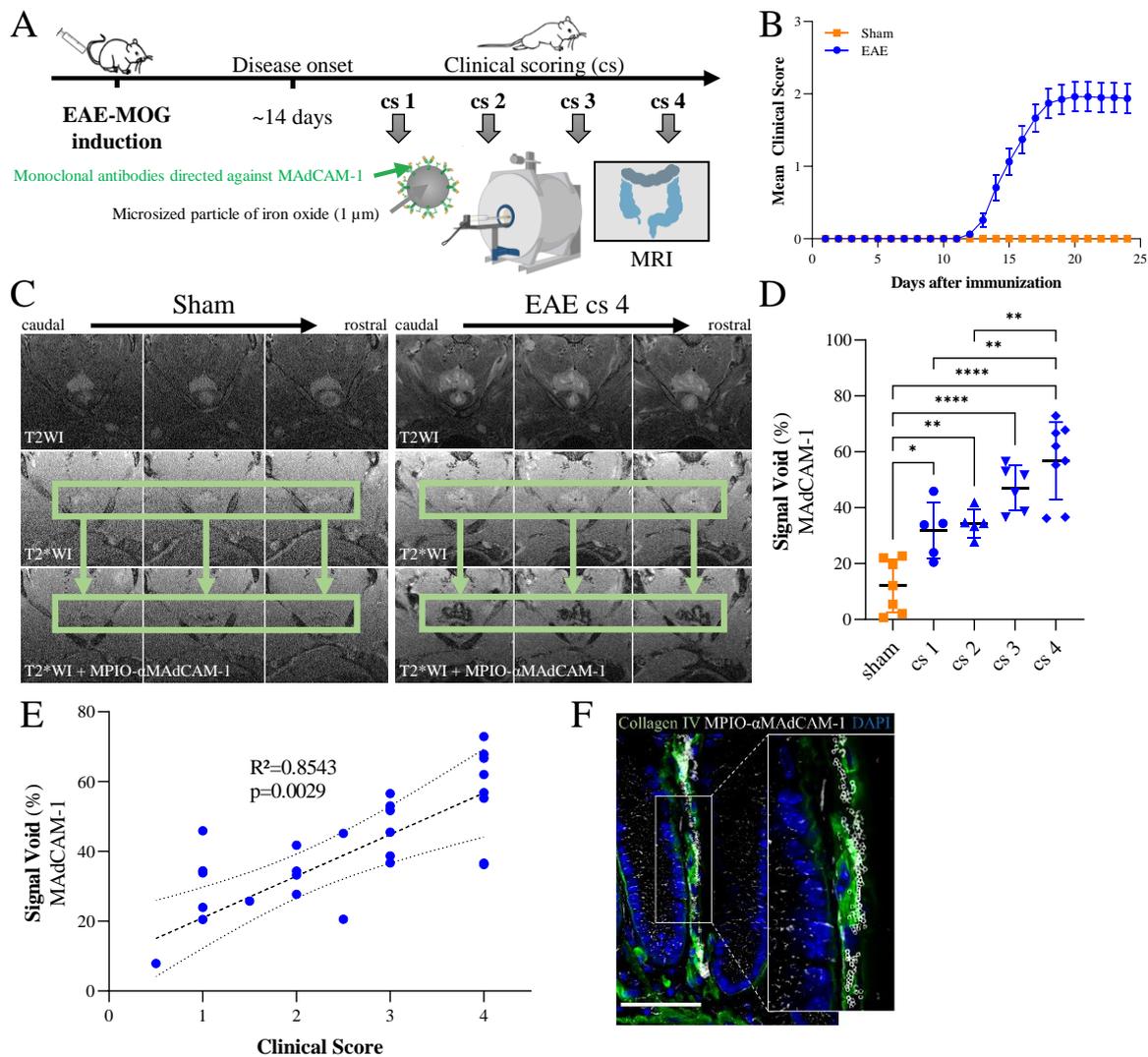
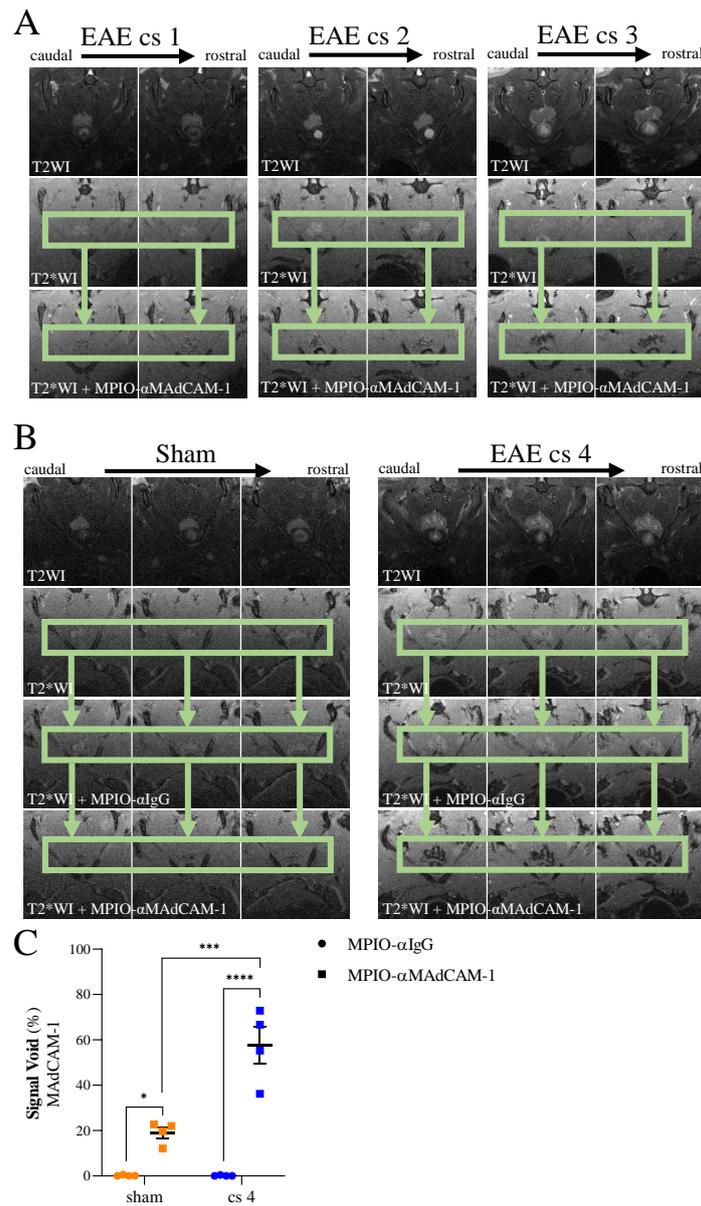


Figure 1: MADCAM-1 signal increases with clinical score in EAE-MOG animals.

(A) Schematic representation of the experimental design. EAE-MOG was induced and MPIO- α MAdCAM-1 enhanced MRI was performed at different clinical scores (cs 1 to 4). (B) Graphical representation of the mean clinical score in sham (orange squares) and EAE-MOG (blue circles) animals. (C) Representative T2-weighted (T2WI), T2*-weighted (T2*WI) and T2*-weighted after injection of MPIO- α MAdCAM-1 (T2*WI + MPIO- α MAdCAM-1) images in sham and in EAE at clinical score 4 (cs 4) animals. (D) Signal void quantification in sham and in EAE-MOG animals at several clinical scores (cs 1 to 4; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; **** $P < 0.0001$, One-way ANOVA + Bonferroni's multiple comparison). (E) Correlation between the signal void in T2*-weighted images after MPIO- α MAdCAM-1 and the clinical score in EAE-MOG animals ($P = 0.0029$; $R^2 = 0.8543$, Pearson's correlation test). (F) Representative immunofluorescence staining showing MPIO- α MAdCAM-1 (in grey) binding to a collagen-IV positive vessel (in green) in the lamina propria of a colon in an EAE-MOG animal at cs 4 (scale bar 50 μ m; DAPI in blue).



Supplementary Figure 1: MPIO-αMAdCAM-1 binding to the mucosal surface increases with the clinical score in EAE-MOG animals while MPIO-αIgG fail to induce contrast changes.

(A) Representative T2-weighted (T2WI), T2*-weighted (T2*WI) and T2*-weighted after injection of MPIO-αMAdCAM-1 (T2*WI + MPIO-αMAdCAM-1) images in EAE at clinical score 2, 3 and 4 (cs 2, 3 and 4) animals. (B) Representative T2-weighted (T2WI), T2*-weighted (T2*WI), T2*-weighted after injection of MPIO-αIgG (T2*WI + MPIO-αIgG) and T2*-weighted after injection of MPIO-αMAdCAM-1 (T2*WI + MPIO-αMAdCAM-1) images in sham and in EAE animals at clinical score 4 (cs 4). (C) Signal void quantification in sham (orange) and in EAE-MOG animals at clinical score 4 (blue) after injection of MPIO-αIgG (circles) or MPIO-αMAdCAM-1 (squares; *P<0.05; ***P<0.001; ****P<0.0001, Two-way ANOVA + Bonferroni's multiple comparison).

MPIO- α MAdCAM-1 signal is correlated with spatiotemporal distribution of TCD4⁺ and B lymphocyte populations in the ileum and the spinal cord of MOG-induced EAE.

Since MAdCAM-1 is involved in lymphocytes trafficking toward intestinal tissue, we next evaluated if the MAdCAM-1 signal void could be related with this immune cells' infiltration. For this, we performed immunohistochemistry and flow cytometry to evaluate the infiltration of T and B lymphocytes (CD3⁺ and B220⁺ cells, respectively) and more precisely TCD4⁺ (CD3⁻ and CD4⁻ positive cells) and T-CD8⁺ lymphocytes (CD3⁻ and CD8⁻ positive cells) in the ileum and the colon of sham and MOG-induced EAE mice.

In the colon, we observed after immunohistological quantification, that EAE animals at clinical score 2 and 4 presented a significant increase of T lymphocytes (CD3 positive cells) compared to sham animals (**Figure 2A, 2B** and **Supplementary Figure 2A**). The exact same profile is observed for TCD8⁺ lymphocytes (**Figure 2A, 2C**, and **Supplementary Figure 2A**). Regarding TCD4⁺ and B lymphocytes, no significant difference were detected between EAE and sham animals (**Figure 2A, 2D, 2E** and **Supplementary Figure 2A**). Unexpectedly, we were not able to detect any significant difference in each lymphocyte population between both groups by flow cytometry (**Supplementary Figure 3**). In addition, no correlation was detected between the MPIO- α MAdCAM-1 signal void and the number of each lymphocyte population (**Figure 2F, 2G** and **Supplementary Figure 2B, 2C**).

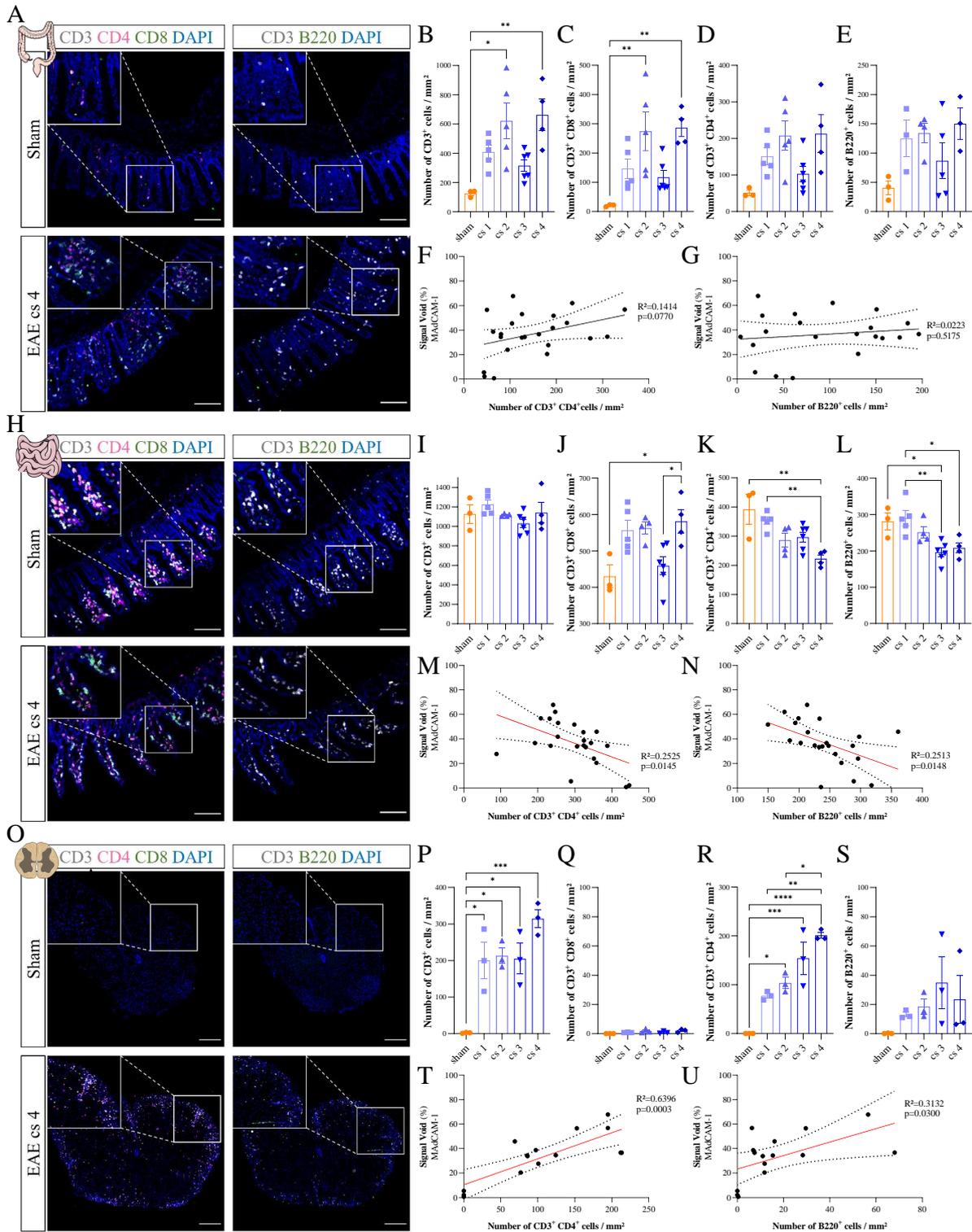


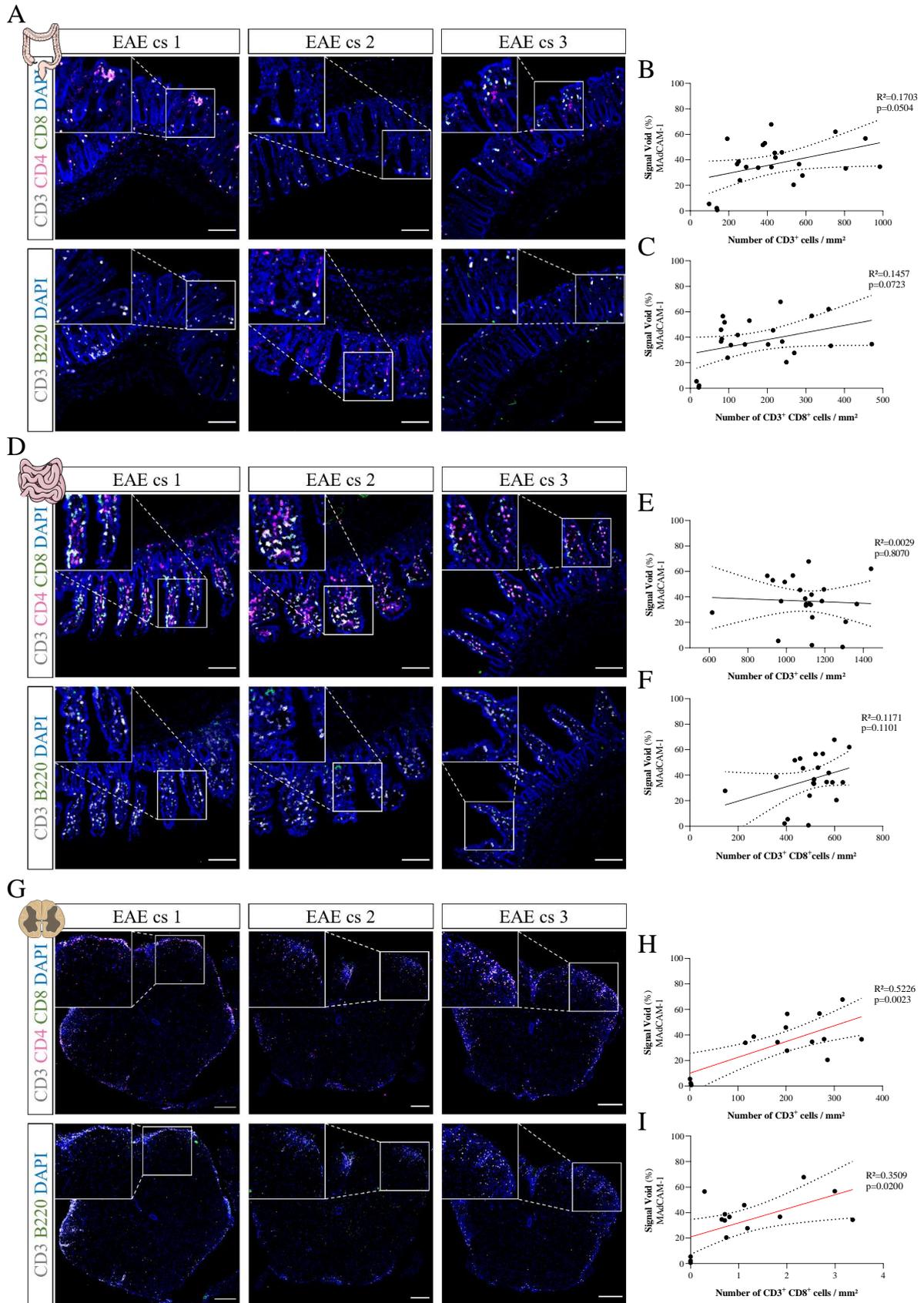
Figure 2: Immunofluorescence analysis of immune cell populations in the colon, the ileum and the spinal cord of sham and EAE-MOG animals.

(A-E) Representative immunohistological images of the CD3, CD4, CD8 and B220 markers in the colon of sham and EAE animals at clinical score 4 (A; cs 4; Scale bar 250µm) and quantification of the number of CD3⁺ (B), CD3⁺/CD8⁺ (C), CD3⁺/CD4⁺ (D) and B220⁺ (E) cells per mm² in sham and in EAE animals at clinical score 1 to 4 (cs 1 to 4; *P<0.05; **P<0.01, One-way ANOVA + Bonferroni's multiple comparison or Kruskal-Wallis test + Dunn's multiple comparison).

(F-G) Correlations between MAdCAM-1 signal void and the number of CD3⁺/CD4⁺ (F) or B220⁺ (G) cells per mm² respectively in the colon of sham and EAE animals (P=0.0770; R²=0.1414 and P=0.5175; R²=0.0223 respectively,

Pearson's correlation test). **(H-L)** Representative immunohistological images of the CD3, CD4, CD8 and B220 markers in the ileum of sham and EAE animals at clinical score 4 (**H**; cs 4; Scale bar 250 μ m) and quantification of the number of CD3⁺ (**I**), CD3⁺/CD8⁺ (**J**), CD3⁺/CD4⁺ (**K**) and B220⁺ (**L**) cells per mm² in sham and in EAE animals at clinical score 1 to 4 (**I-L**; cs 1 to 4; *P<0.05; **P<0.01, One-way ANOVA + Bonferroni's multiple comparison or Kruskal-Wallis test + Dunn's multiple comparison). **(M-N)** Correlations between MAdCAM-1 signal void and the number of CD3⁺/CD4⁺ (**M**) or B220⁺ (**N**) cells per mm² respectively in the ileum of sham and EAE animals (P=0.0145; R²=0.2525 and P=0.0148; R²=0.2513 respectively, Pearson's correlation test). **(O-S)** Representative immunohistological images of the CD3, CD4, CD8 and B220 markers in the spinal cord of sham and EAE animals at clinical score 4 (**O**; cs 4; Scale bar 100 μ m) and quantification of the number of CD3⁺ (**P**), CD3⁺/CD8⁺ (**Q**), CD3⁺/CD4⁺ (**R**) and B220⁺ (**S**) cells per mm² in sham and in EAE animals at clinical score 1 to 4 (**P-S**; cs 1 to 4; *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001; ****P<0.0001, One-way ANOVA + Bonferroni's multiple comparison or Kruskal-Wallis test + Dunn's multiple comparison). **(T-U)** Correlations between MAdCAM-1 signal void and the number of CD3⁺/CD4⁺ (**T**) or B220⁺ (**U**) cells per mm² respectively in the spinal cord of sham and EAE animals (P=0.0003; R²=0.6396 and P=0.0300; R²=0.3132 respectively, Pearson's correlation test).

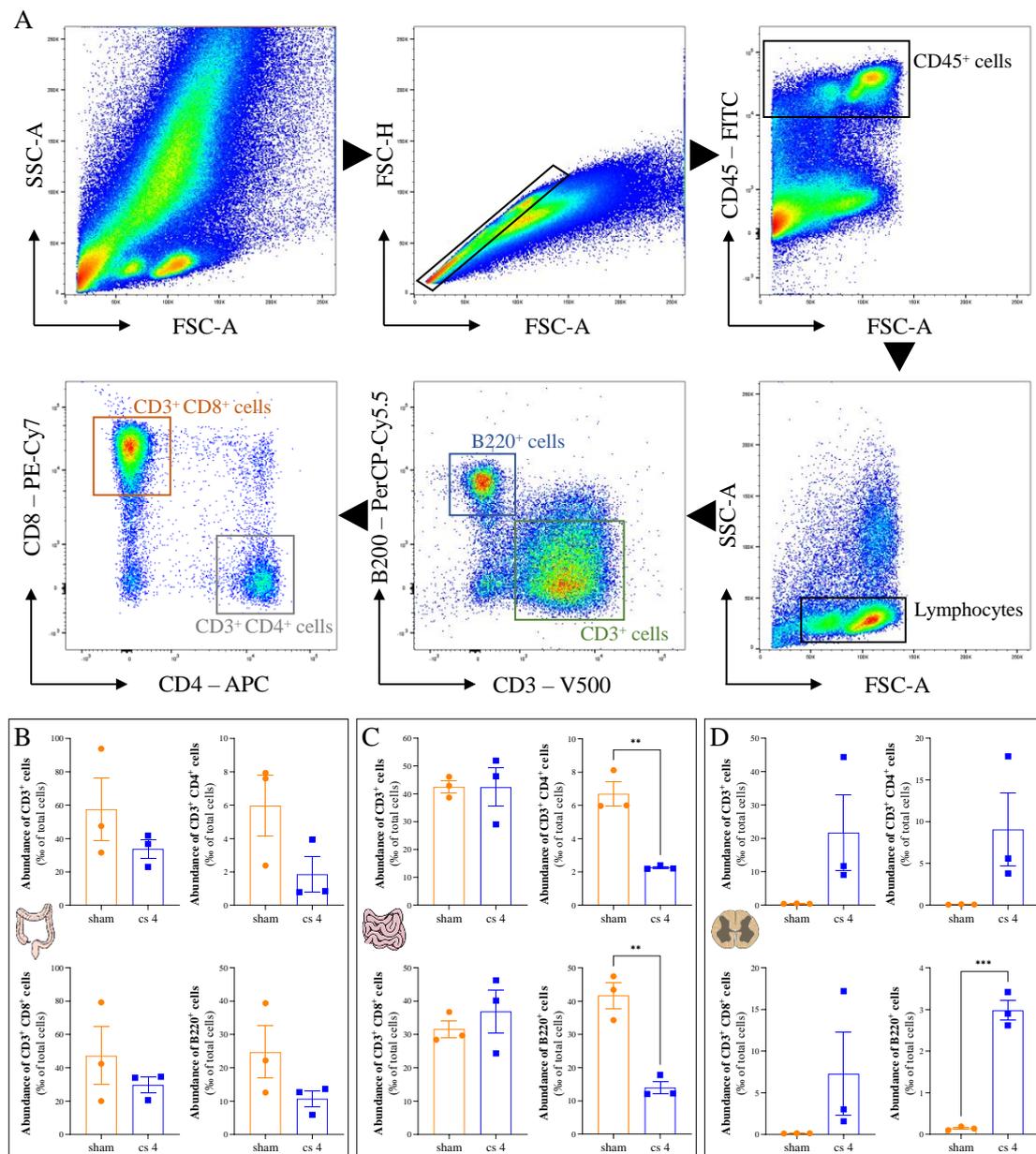
The representativity of the immune cells in the ileum and the colon presents different patterns (**Figure 2H-2N**). Indeed, the same quantity of CD3-positive cells were observed at every clinical score of EAE mice in the ileum by immunohistochemistry and flow cytometry and no difference were detected between EAE and sham animals (**Figure 2H, 2I** and **Supplementary Figure 2D, Supplementary Figure 3C**). In the ileum, TCD8⁺ population is increased in EAE animals compared to sham animals and more precisely at clinical score 4 (**Figure 2H, 2J**, and **Supplementary Figure 2D**). The TCD4- and B220-immunopositive cells were significantly decreased at clinical score 4 in EAE animals compared to sham animals (**Figure 2H, 2K, 2L** and **Supplementary Figure 2D, Supplementary Figure 3C**). Furthermore, a significant diminution is observed during the time course of EAE where the number of TCD4⁺ and B lymphocytes are significantly lower at high clinical score (4) compared to clinical score 1 (**Figure 2H, 2K, 2L**). Interestingly, only these two last populations revealed a negative correlation with the MPIO- α MAdCAM-1 signal void (**Figure 2M, 2N** and **Supplementary Figure 2E, 2F**) showing that in the ileum, a high intestinal inflammation lead to a decrease of B220-positive and TCD4-positive lymphocytes.



Supplementary Figure 2: Immunofluorescence analysis of immune cell populations in the colon, the ileum and the spinal cord of sham and EAE-MOG animals.

(A) Representative immunohistological images of the CD3, CD4, CD8 and B220 markers in the colon of EAE animals at clinical score 1, 2 and 3 (cs 1, 2 and 3; Scale bar 250µm). (B-C) Correlations between

MAdCAM-1 signal void and the number of CD3⁺ (B) or CD3⁺/CD8⁺ (C) cells per mm² respectively in the colon of sham and EAE animals (P=0.0504; R²=0.1703 and P=0.0723; R²=0.1457 respectively, Pearson's correlation test). (D) Representative immunohistological images of the CD3, CD4, CD8 and B220 markers in the ileum of EAE animals at clinical score 1, 2 and 3 (cs 1, 2 and 3; Scale bar 250µm). (E-F) Correlations between MAdCAM-1 signal void and the number of CD3⁺ (E) or CD3⁺/CD8⁺ (F) cells per mm² respectively in the ileum of sham and EAE animals (P=0.8070; R²=0.0029 and P=0.1101; R²=0.1171 respectively, Pearson's correlation test). (G) Representative immunohistological images of the CD3, CD4, CD8 and B220 markers in the spinal cord of EAE animals at clinical score 1, 2 and 3 (cs 1, 2 and 3; Scale bar 100µm). (H-I) Correlations between MAdCAM-1 signal void and the number of CD3⁺ (H) or CD3⁺/CD8⁺ (I) cells per mm² respectively in the spinal cord of sham and EAE animals (P=0.0023; R²=0.5226 and P=0.0200; R²=0.3509 respectively, Pearson's correlation test).



Supplementary Figure 3: Flow cytometry analysis of immune cells populations in the colon, the ileum and the spinal cord of sham and EAE-MOG animals at clinical score 4.

(A) Flow cytometry gating strategy used to identify CD3⁺, CD3⁺ CD4⁺, CD3⁺ CD8⁺ and B220⁺ populations. (B-D) Corresponding quantifications in the colon (B), the ileum (C) and the spinal cord (D) of sham and EAE animals at clinical score 4 (cs 4; **P<0.01; ***P<0.001, t-test).

These specific distributions of immune cell populations led us to investigate if the intestinal inflammation (*i.e.* MPIO- α MAdCAM-1 signal void) could match with the lymphocyte infiltration in the CNS. So, we analyzed, by immunohistochemistry and flow cytometry the same populations as before in the spinal cord of sham and EAE mice. The number of CD3-positive cells is significantly enhanced in MOG-induced EAE compared to sham mice (**Figure 2O, 2P** and **Supplementary Figure 2G, Supplementary Figure 3D**). Although there is no difference in the number of TCD8-positive cells between both groups, a surge of TCD4 positive cells was noticed only in the spinal cord of EAE mice (**Figure 2O, 2Q, 2R** and **Supplementary Figure 2G, Supplementary Figure 3D**). We detected, only by flow cytometry, an increase of B lymphocytes quantity in MOG-induced EAE compared to sham animals (**Figure 2O, 2S** and **Supplementary Figure 2G, Supplementary Figure 3D**). As previously, we correlated each lymphocyte population with the MPIO- α MAdCAM-1 signal void. In the spinal cord, the number of each lymphocyte population (T, TCD4⁺, TCD8⁺ and B220⁺) is positively correlated with the intestinal inflammation (**Figure 2T, 2U**, and **Supplementary Figure 2H, 2I**). Hence, we can conclude that intestinal inflammation, revealed by MPIO- α MAdCAM-1 induced signal perfectly matched with the lymphocyte distribution in the spinal cord.

Altogether, these data shown that TCD4⁺ and B lymphocytes are negatively correlated with MPIOs- α MAdCAM-1 signal in the ileum whereas these two populations are positively correlated with MAdCAM-1 signal void in the spinal cord. This could indicate that during MOG-induced EAE, immune cells could migrate from the intestine towards the CNS.

High expression of MAdCAM-1 in pre-symptomatic phase delays the disease onset

The correlation between MPIO- α MAdCAM-1 signal and clinical score of MOG-induced EAE mice lead us to investigate whether this technique would predict the appearance of motor symptoms (**Figure 3**). Sham and asymptomatic animals (clinical score 0) were injected with MPIO- α MAdCAM-1 at day 10, 11 or 12 and subjected to molecular imaging (**Figure 3A, 3B**). At pre-symptomatic stages, we detected that EAE animals displayed two MAdCAM-1 different profiles: MAdCAM-1^{low} and MAdCAM-1^{high} (**Figure 3B, 3C**). Thus, we separated EAE mice in two groups based on their endothelial

activation profile (**Figure 3B, 3C, 3D**). The first group (MAdCAM-1^{low}) showed a signal void in MRI similar to the signal void obtained in sham animals (15.3±2.3% vs. 16.6±2.1% respectively; **Figure 3A, 3B and 3C**). The second group (MAdCAM-1^{high}) displayed substantial MPIO-αMAdCAM-1 signal void in MRI (40.3±2.5%; **Figure 3B, 3D**).

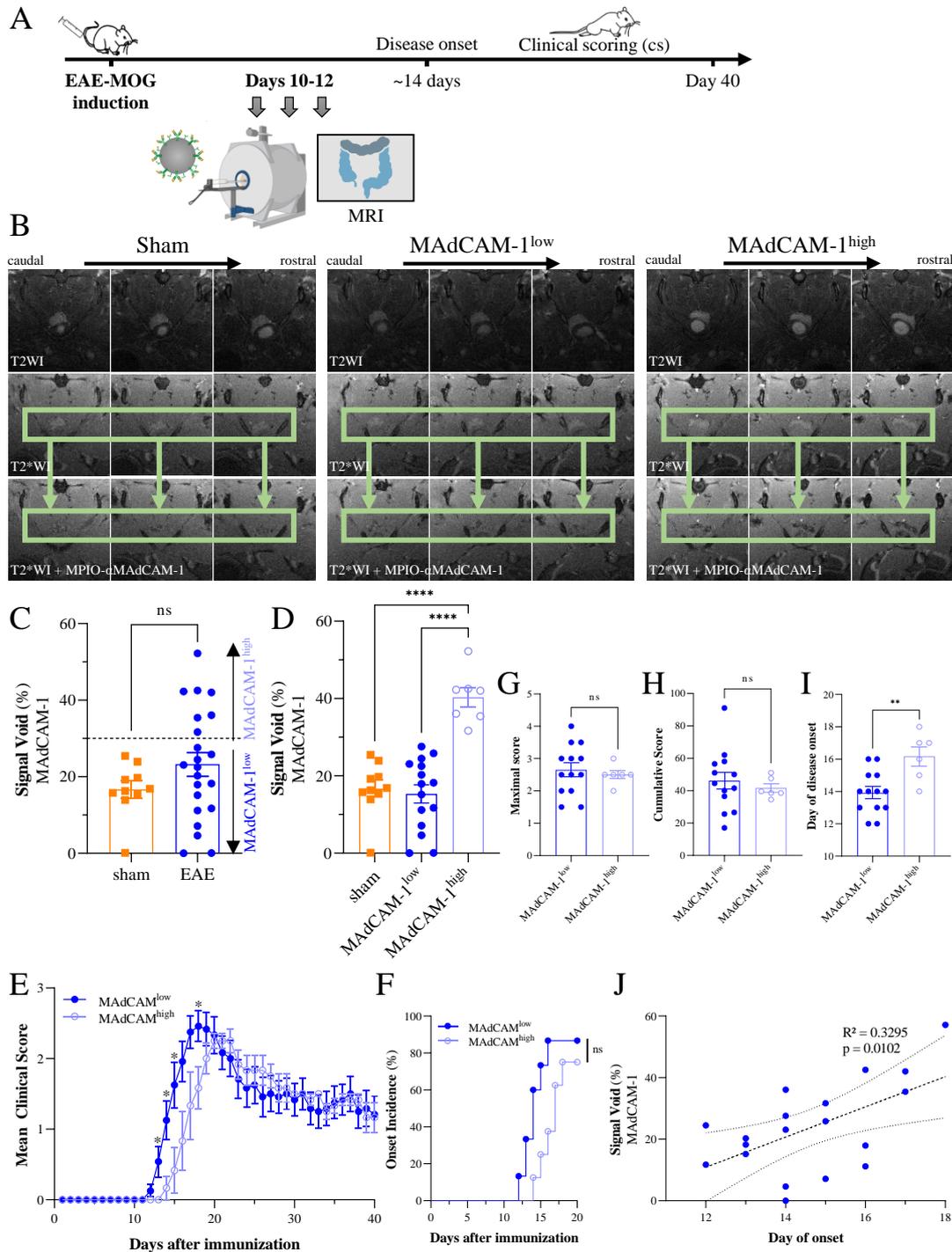


Figure 3: High expression of MAdCAM-1 during pre-symptomatic phase delays the disease onset while have no effect on disease incidence and severity in EAE-MOG animals.

(A) Schematic representation of the experimental design. EAE-MOG was induced and MPIO-αMAdCAM-1 enhanced MRI was performed during pre-symptomatic phase at days 10 to 12 after

immunization. **(B)** Representative T2-weighted (T2WI), T2*-weighted (T2*WI) and T2*-weighted after injection of MPIO- α MAdCAM-1 (T2*WI + MPIO- α MAdCAM-1) images in sham and in MAdCAM-1^{low} and MAdCAM-1^{high} EAE animals. **(C-D)** Signal void quantification in sham (orange squares) and in EAE (blue circles) animals at days 10 to 12 after immunization before (**C**; t-test) and after split between MAdCAM-1^{low} (dark blue circles) and MAdCAM-1^{high} (light blue circles) animals (**D** ; *** $P < 0.0001$, One-way ANOVA + Bonferroni's multiple comparison). **(E)** Mean clinical score in MAdCAM-1^{low} (dark blue circles) and MAdCAM-1^{high} (light blue circles) EAE animals ($*P < 0.05$, Two-way ANOVA + Bonferroni's multiple comparison). **(F)** Onset incidence over time after immunization in MAdCAM-1^{low} (dark blue circles) and MAdCAM-1^{high} (light blue circles) EAE animals (Mantel-Cox test). **(G-I)** Maximal score (**G**), cumulative score (**H**) and day of disease onset (**I**) in MAdCAM-1^{low} (dark blue circles) and MAdCAM-1^{high} (light blue circles) EAE animals ($**P < 0.01$, t-test or Mann Whitney test). **(J)** Correlation between the MAdCAM-1 signal void at days 10 to 12 after immunization and the day of onset in EAE animals ($P = 0.0102$; $R^2 = 0.3295$, Pearson's correlation test).

Then, we evaluated the clinical score of these animals (MAdCAM-1^{low} and MAdCAM-1^{high} mice) for 40 days (**Figure 3A, E**). Both groups showed a classical course of MOG-induced EAE (**Figure 3E**) with no significant differences in the incidence, the maximal clinical score and the cumulative clinical score (**Figure 3F, 3G, 3H**, respectively). Interestingly, MAdCAM-1^{low} mice exhibited an earlier day of onset compared to MAdCAM-1^{high} (13.9 ± 0.3 vs. 16.1 ± 0.6 ; **Figure 3E, 3I**). Accordingly, MPIO- α MAdCAM-1 signal void is positively correlated with the day of onset (**Figure 3J**).

These results indicated that high expression of MAdCAM-1 in the intestine during pre-symptomatic phase delays the onset of the disease suggesting that intestinal inflammation is implicated in the early development of the disease and gut could be a privileged site of autoreactive immune cells reactivation.

MAdCAM-1 signal is highly detected from high clinical scores in PLP-induced EAE.

Next, we addressed whether MPIO- α MAdCAM-1 signal could also follow the disease activity in a relapsing-remitting model (PLP-induced EAE). For this, we assessed the MPIO- α MAdCAM-1 signal void (T2*-weighted imaging before and after MPIO- α MAdCAM-1 intravenous injection) by MRI at typical stages of PLP-induced EAE (clinical scores 2, 4 and remitting score 2; **Figure 4A, 4B**). In sham animals, after intravenous injection of MPIO- α MAdCAM-1, signal void was low (around 20% of structure area) in the intestine (**Figure 4C and 4D**). In EAE mice, at clinical score 2, thanks to morphological T2-weighted images, the signal of MAdCAM-1 is not significantly different from sham animals (**Figure 4C, 4D**, and **Supplementary Figure 4A**). With increase of motor symptoms (clinical score 4), we observed an enhancement of MPIO- α MAdCAM-1-signal compared to sham animals

(**Figure 4C, 4D**). Injection of untargeted MPIO- α IgG failed to induce substantial contrast change, confirming the specificity of the contrast agent in this model (**Supplementary Figure 4B, 4C**). Moreover, in these mice (PLP-induced EAE at clinical score 4), numerous MPIO- α MAdCAM-1 were fixed to vessels in the LP of the colon (**Figure 4E**). Interestingly, during remitting phase (at clinical score 2 remitting), MPIO- α MAdCAM-1 signal void display an equivalent pattern compared with the clinical score 4 (**Figure 4C, 4D** and **Supplementary Figure 4A**). At this stage, we can spot that MAdCAM-1 imaging in these animals presents two specific profiles: one with higher signal void compared to clinical score 4 and another one with lower signal void (**Figure 4D**).

Thus, the MPIO- α MAdCAM-1 signal is increased and last in EAE relapsing-remitting model only from severe motor symptoms contrary to MOG-induced EAE model where it is highly correlated with clinical scores.

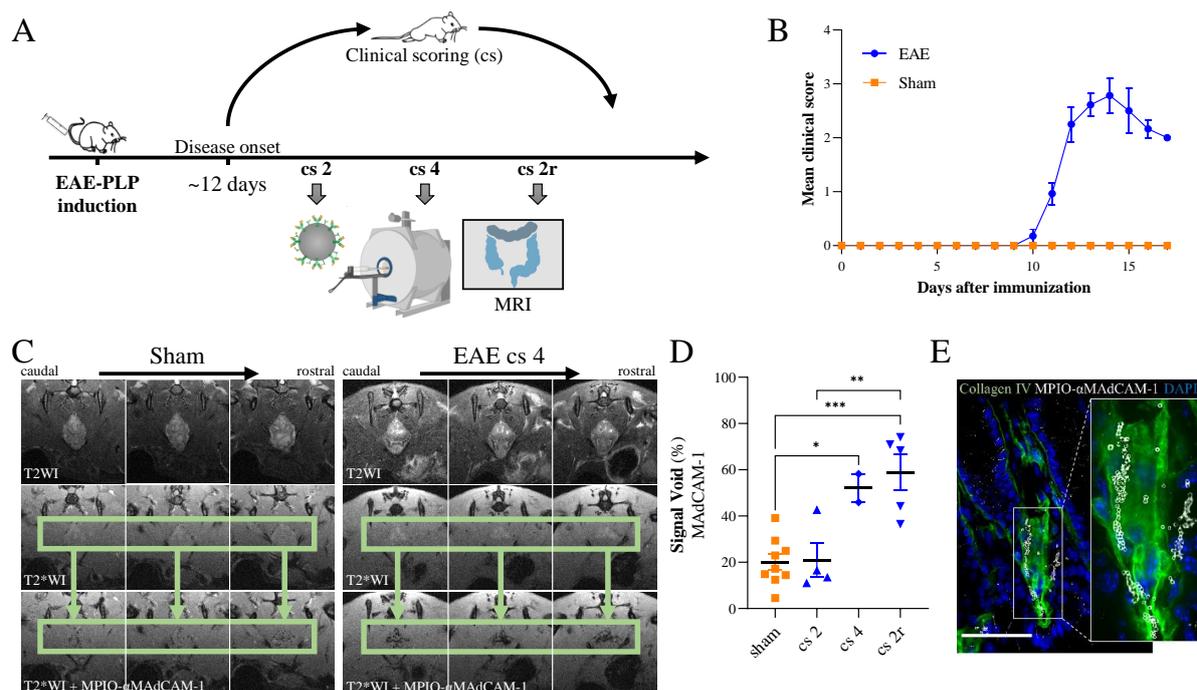
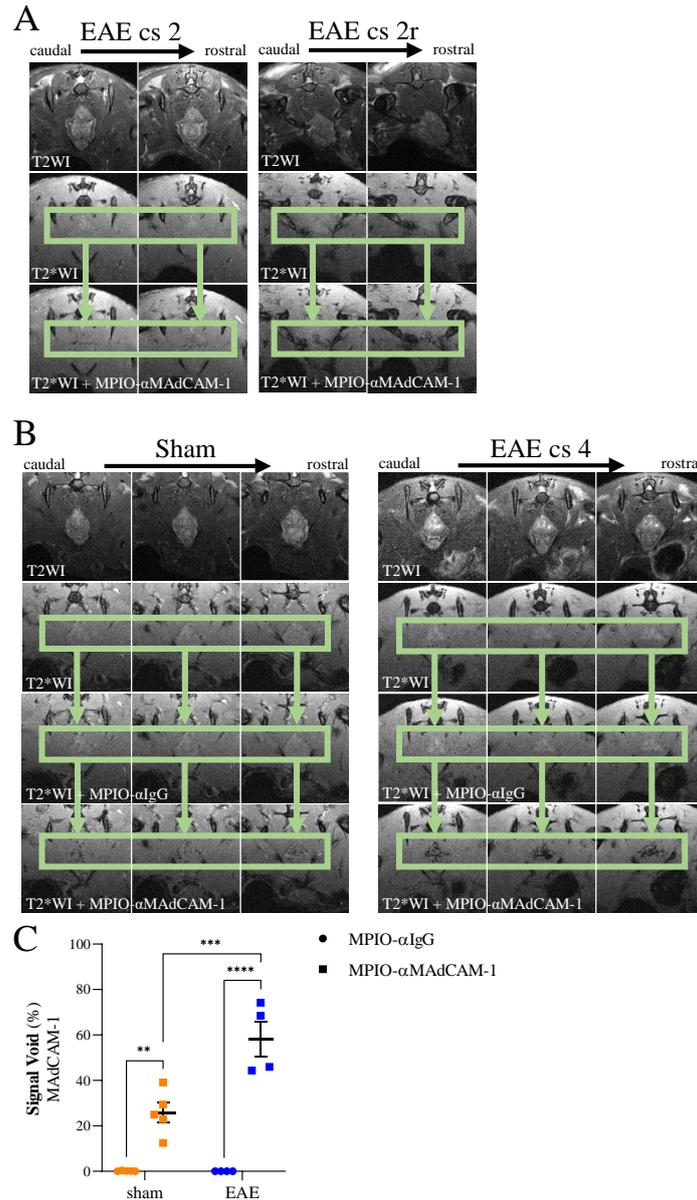


Figure 4: MAdCAM-1 signal increases from high clinical score in EAE-PLP animals.

(**A**) Schematic representation of the experimental design. EAE-PLP was induced and MPIO- α MAdCAM-1 enhanced MRI was performed at several clinical scores (cs 2, 4, 2r). (**B**) Graphical representation of the mean clinical score in sham (orange squares) and EAE-PLP (blue circles) animals. (**C**) Representative T2-weighted (T2WI), T2*-weighted (T2*WI) and T2*-weighted after injection of MPIO- α MAdCAM-1 (T2*WI + MPIO- α MAdCAM-1) images in sham and in EAE-PLP animals at clinical score 4 (cs 4). (**D**) Signal void quantification in sham (orange squares) and in EAE-PLP (blue circles) animals at several clinical score (cs 2, 4, 2r; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$, One-way ANOVA + Bonferroni's multiple comparison). (**E**) Representative immunofluorescence staining showing MPIO- α MAdCAM-1 (in grey) binding to a collagen IV positive vessel (in green) in the lamina propria from a colon of an EAE-PLP at cs 4 animal (scale bar 50 μ m; DAPI in blue).



Supplementary Figure 4: MPIO-αMAdCAM-1 binding to the mucosal surface increases from high clinical score in EAE-PLP animals while MPIO-αIgG fail to induce contrast changes.

(A) Representative T2-weighted (T2WI), T2*-weighted (T2*WI) and T2*-weighted after injection of MPIO-αMAdCAM-1 (T2*WI + MPIO-αMAdCAM-1) images in EAE at clinical score 2 and 2 remitting (cs 2 and 2r) animals. (B) Representative T2-weighted (T2WI), T2*-weighted (T2*WI), T2*-weighted after injection of MPIO-αIgG (T2*WI + MPIO-αIgG) and T2*-weighted after injection of MPIO-αMAdCAM-1 (T2*WI + MPIO-αMAdCAM-1) images in sham and in EAE animals at clinical score 4 (cs 4). (C) Signal void quantification in sham (orange) and in EAE-PLP animals at clinical score 4 (blue) after injection of MPIO-αIgG (circles) or MPIO-αMAdCAM-1 (squares; **P<0.01; ***P<0.001; ****P<0.0001, Two-way ANOVA + Bonferroni's multiple comparison).

Distribution of TCD4 and B lymphocyte populations in PLP-induced EAE.

After performing molecular imaging of MAdCAM-1, we collected colon, ileum and spinal cord from sham and PLP-induced EAE animals (at clinical score 2, 4 and remitting score 2) and performed immunostaining to characterize the number of T (CD4⁺ and CD8⁺) and B lymphocytes.

In the colon, although the number of CD3 positive cells decreased between the clinical score 2 and 2 remitting in EAE mice, it does not significantly change between sham and EAE animals (**Figure 5A, 5B** and **Supplementary Figure 5A, 5B**). By focusing on T lymphocytes, the number of TCD8⁺ remain stable between groups whereas TCD4⁺ cells paralleled the pattern of lymphocyte CD3⁺ (**Figure 5A, 5C, 5D** and **Supplementary Figure 5A**). No difference was detected on B220⁺ lymphocytes quantification between groups (**Figure 5A, 5E** and **Supplementary Figure 5A**). Furthermore, MPIO- α MAdCAM-1 signal void did not correlate with any lymphocyte population (**Figure 5F, 5G** and **Supplementary Figure 5B, 5C**).

By measuring the quantity of several lymphocyte population in the ileum, we did not notice any significant difference in the number of CD3- and T-CD8-positive cells between the groups (**Figure 5H, 5I, 5J**, and **Supplementary Figure 5D**) and no correlation between their quantity and the MPIO- α MAdCAM-1 signal void is detected (**Supplementary Figure 5E, 5F**). The quantity of CD3/CD4-positive lymphocytes is significantly decreased in PLP-induced EAE animals at score 2 remitting compared to sham mice (**Figure 5H, 5K** and **Supplementary Figure 5D**). We also observed a significant diminution during the time course of EAE (between the score 2 and the score 2 remitting) in EAE mice (**Figure 5H, 5K** and **Supplementary Figure 5D**). Interestingly, in the ileum, MPIO- α MAdCAM-1 signal void is negatively correlated with the number of TCD4-positive cells and tends towards significative diminution with B lymphocyte (**Figure 5M, 5N**).

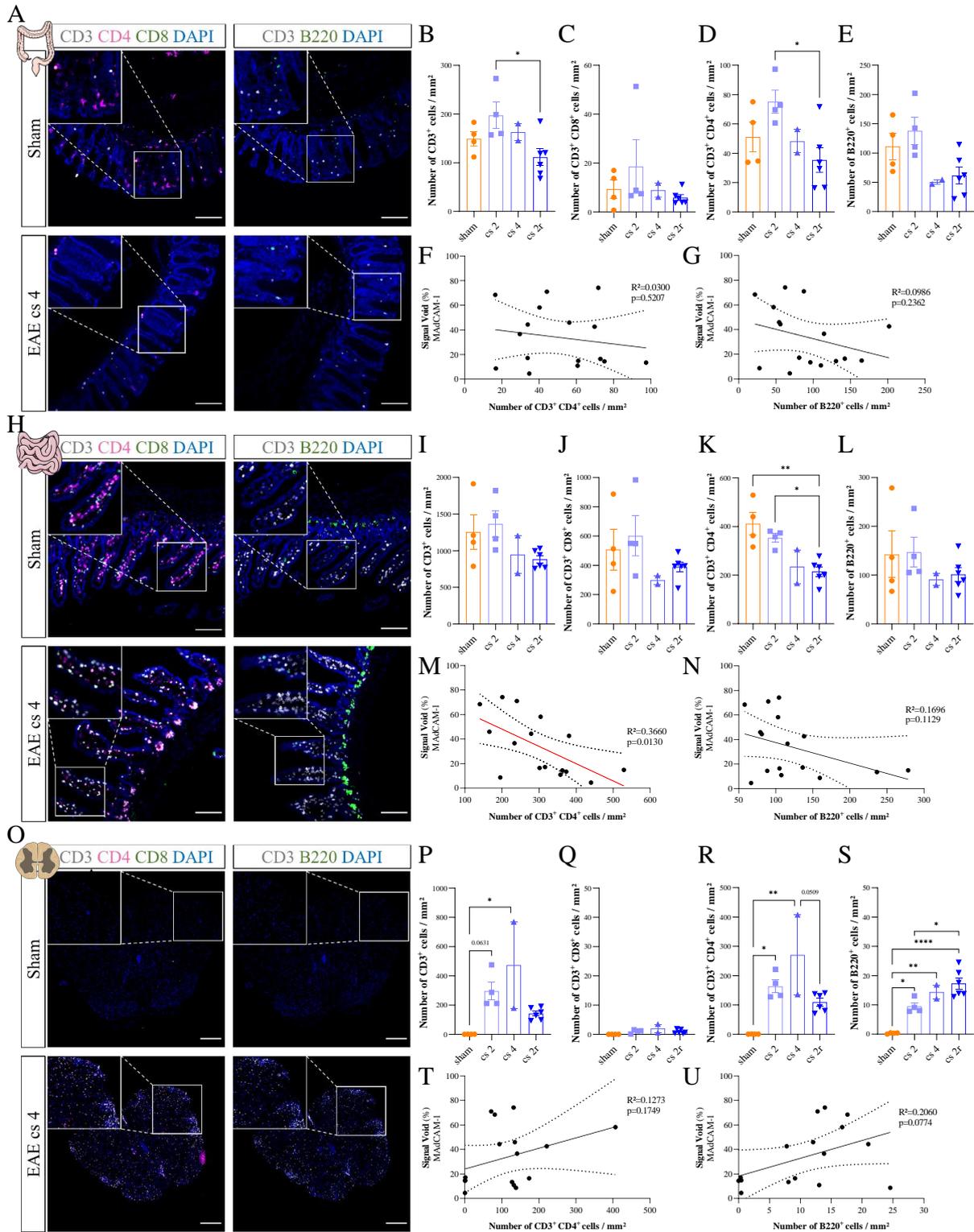


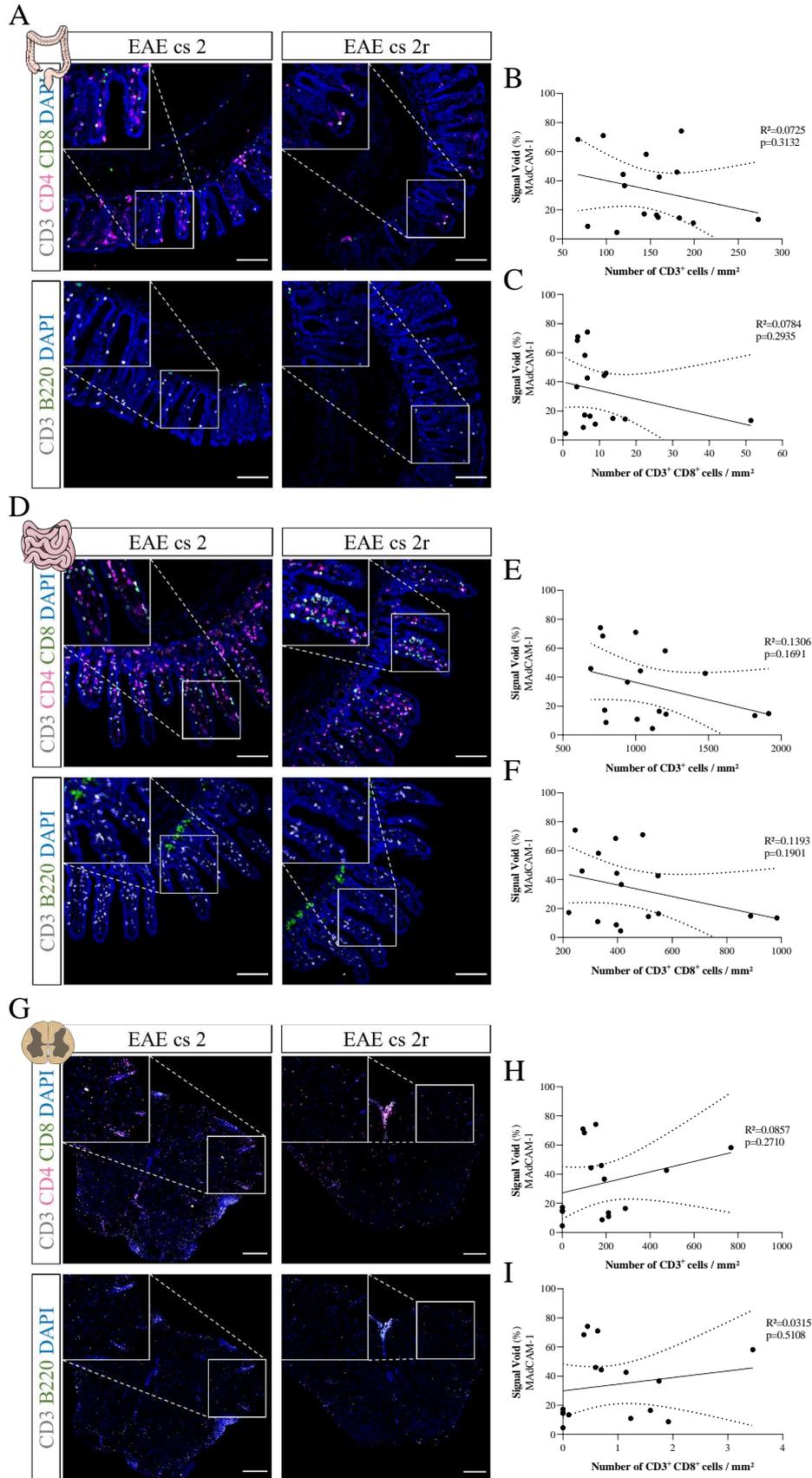
Figure. 5: Immunohistofluorescence analysis of immune cells populations in the colon, the ileum and the spinal cord of sham and EAE-PLP animals.

(A-E) Representative immunohistological images of the CD3, CD4, CD8 and B220 markers in the colon of sham and EAE animals at clinical score 4 (A; cs 4; Scale bar 250µm) and quantification of the number of CD3⁺ (B), CD3⁺/CD8⁺ (C), CD3⁺/CD4⁺ (D) and B220⁺ (E) cells per mm² in sham and in EAE animals at clinical score 2, 4 and 2 remitting (B-E; cs 1, 2 and 2r; *P<0.05, One-way ANOVA + Bonferroni's multiple comparison or Kruskal-Wallis test + Dunn's multiple comparison).

(F-G) Correlations between MAdCAM-1 signal void and the number of CD3⁺/CD4⁺ (F) or B220⁺ (G) cells per mm² respectively in the colon of sham and EAE animals (P=0.5207; R²=0.0300 and P=0.2362; R²=0.0986 respectively).

Pearson's correlation test). **(H-L)** Representative immunohistological images of the CD3, CD4, CD8 and B220 markers in the ileum of sham and EAE animals at clinical score 4 (**H**; cs 4; Scale bar 250 μ m) and quantification of the number of CD3⁺ (**I**), CD3⁺/CD8⁺ (**J**), CD3⁺/CD4⁺ (**K**) and B220⁺ (**L**) cells per mm² in sham and in EAE animals at clinical score 2, 4 and 2 remitting (**I-L**; cs 1, 2 and 2r; *P<0.05; **P<0.01, One-way ANOVA + Bonferroni's multiple comparison or Kruskal-Wallis test + Dunn's multiple comparison). **(M-N)** Correlations between MAdCAM-1 signal void and the number of CD3⁺/CD4⁺ (**M**) or B220⁺ (**N**) cells per mm² respectively in the ileum of sham and EAE animals (P=0.0130; R²=0.3660 and P=0.1129; R²=0.1696 respectively, Pearson's correlation test). **(O-S)** Representative immunohistological images of the CD3, CD4, CD8 and B220 markers in the spinal cord of sham and EAE animals at clinical score 4 (**O**; cs 4; Scale bar 100 μ m) and quantification of the number of CD3⁺ (**P**), CD3⁺/CD8⁺ (**Q**), CD3⁺/CD4⁺ (**R**) and B220⁺ (**S**) cells per mm² in sham and in EAE animals at clinical score 2, 4 and 2 remitting (**P-S**; cs 1, 2 and 2r; *P<0.05; **P<0.01; ****P<0.0001, One-way ANOVA + Bonferroni's multiple comparison or Kruskal-Wallis test + Dunn's multiple comparison). **(T-U)** Correlations between MAdCAM-1 signal void and the number of CD3⁺/CD4⁺ (**T**) or B220⁺ (**U**) cells per mm² respectively in the spinal cord of sham and EAE animals (P=0.1749; R²=0.1273 and P=0.0774; R²=0.2060 respectively, Pearson's correlation test).

In the spinal cord, the number of CD3-positive cells follows the disease activity in EAE animals. Indeed, we noted that CD3-positive cells increased from score 2 to score 4 and then decreased during remitting phase (**Figure 5O, 5P** and **Supplementary Figure 5G**). Thus, the MPIO- α MAdCAM-1 signal void is not correlated with this quantification (**Supplementary Figure 5H**). No CD3 positive cells are detected in sham animals (**Figure 5O, 5P**). The number of TCD8-positive cells did not differ between groups (**Figure 5O, 5Q** and **Supplementary Figure 5G**). Accordingly, there is no correlation between intestinal inflammation and CD8 quantification (**Supplementary Figure 5I**). The number of CD4-positive cells is significantly enhanced in PLP-induced EAE compared to sham mice (**Figure 5O, 5R** and **Supplementary Figure 5G**). In sham animals, we did not detect any B lymphocytes while in EAE animals, an increase is seen during the time course of the disease (*e.g.* a significant enhancement is observed between the score 2 remitting and the score 2; **Figure 5O, 5S** and **Supplementary Figure 5G**). By correlating the MPIO- α MAdCAM-1 signal void with the number of TCD4⁺ and B220⁺ lymphocyte, we noticed that the number of these immune cells increases with the intestinal inflammation (**Figure 5T, 5U**).



Supplementary Figure 5: Immunofluorescence analysis of immune cell populations in the colon, the ileum and the spinal cord of sham and EAE-PLP animals.

(A) Representative immunohistological images of the CD3, CD4, CD8 and B220 markers in the colon of EAE animals at clinical score 2 and 2 remitting (cs 2 and 2r; Scale bar 250µm). (B-C) Correlations

between MAdCAM-1 signal void and the number of CD3⁺ (**B**) or CD3⁺/CD8⁺ (**C**) cells per mm² respectively in the colon of sham and EAE animals (P=0.3132; R²=0.0725 and P=0.2935; R²=0.0784 respectively, Pearson's correlation test). (**D**) Representative immunohistological images of the CD3, CD4, CD8 and B220 markers in the ileum of EAE animals at clinical score 2 and 2 remitting (cs 2 and 2r; Scale bar 250µm). (**E-F**) Correlations between MAdCAM-1 signal void and the number of CD3⁺ (**E**) or CD3⁺/CD8⁺ (**F**) cells per mm² respectively in the ileum of sham and EAE animals (P=0.1691; R²=0.1306 and P=0.1901; R²=0.1193 respectively, Pearson's correlation test). (**G**) Representative immunohistological images of the CD3, CD4, CD8 and B220 markers in the spinal cord of EAE animals at clinical score 2 and 2 remitting (cs 2 and 2r; Scale bar 100µm). (**H-I**) Correlations between MAdCAM-1 signal void and the number CD3⁺ (**H**) or CD3⁺/CD8⁺ (**I**) cells per mm² respectively in the spinal cord of sham and EAE animals (P=0.2710; R²=0.0857 and P=0.5108; R²=0.0315 respectively, Pearson's correlation test).

Thus, these data shown that, in PLP-induced EAE model, TCD4⁺ and B lymphocytes are negatively correlated with MPIO-αMAdCAM-1 signal in the ileum whereas these two populations tend to be positively correlated with MAdCAM-1 signal void in the spinal cord. This could indicate that, like in MOG-induced EAE model, immune cells could migrate from the intestine towards the CNS in PLP-induced EAE animals.

Low expression of MAdCAM-1 during remission phase of PLP-induced EAE is associated to a higher risk for conversion into secondary-progressive EAE.

The presence of two MPIO-αMAdCAM-1 signal profiles at clinical score 2 remitting of PLP mice suggests a different evolution of the disease in these both groups. Thus, we investigated the impact of intestinal inflammation on relapses in PLP animals. To do so, after two consecutive days of complete recovery, we administered intravenously MPIO-αMAdCAM-1 and performed molecular imaging on asymptomatic animals (clinical score 0; **Figure 6A**). The same experiment was realized on sham mice. After quantifying the signal void in PLP-induced EAE mice, we observed that animals with a complete recovery presented various profiles of MAdCAM-1 expression (**Figure 6B, 6C**). By comparing the signal void of MAdCAM-1 in EAE mice with sham animals, we decided to separate PLP animals into two groups (MAdCAM-1^{low} and MAdCAM-1^{high}; **Figure 6C**). The split was applied at the highest signal void in MRI obtained in sham animals (40%; **Figure 6B and 6C**). So, the MPIO-αMAdCAM-1 signal void in MRI is significantly higher in MAdCAM-1^{high} group compared to MAdCAM-1^{low} and sham animals (47.9±2.1% vs. 25.9±2.1% and 20.0±3.4% respectively; **Figure 6B, 6C, 6D**).

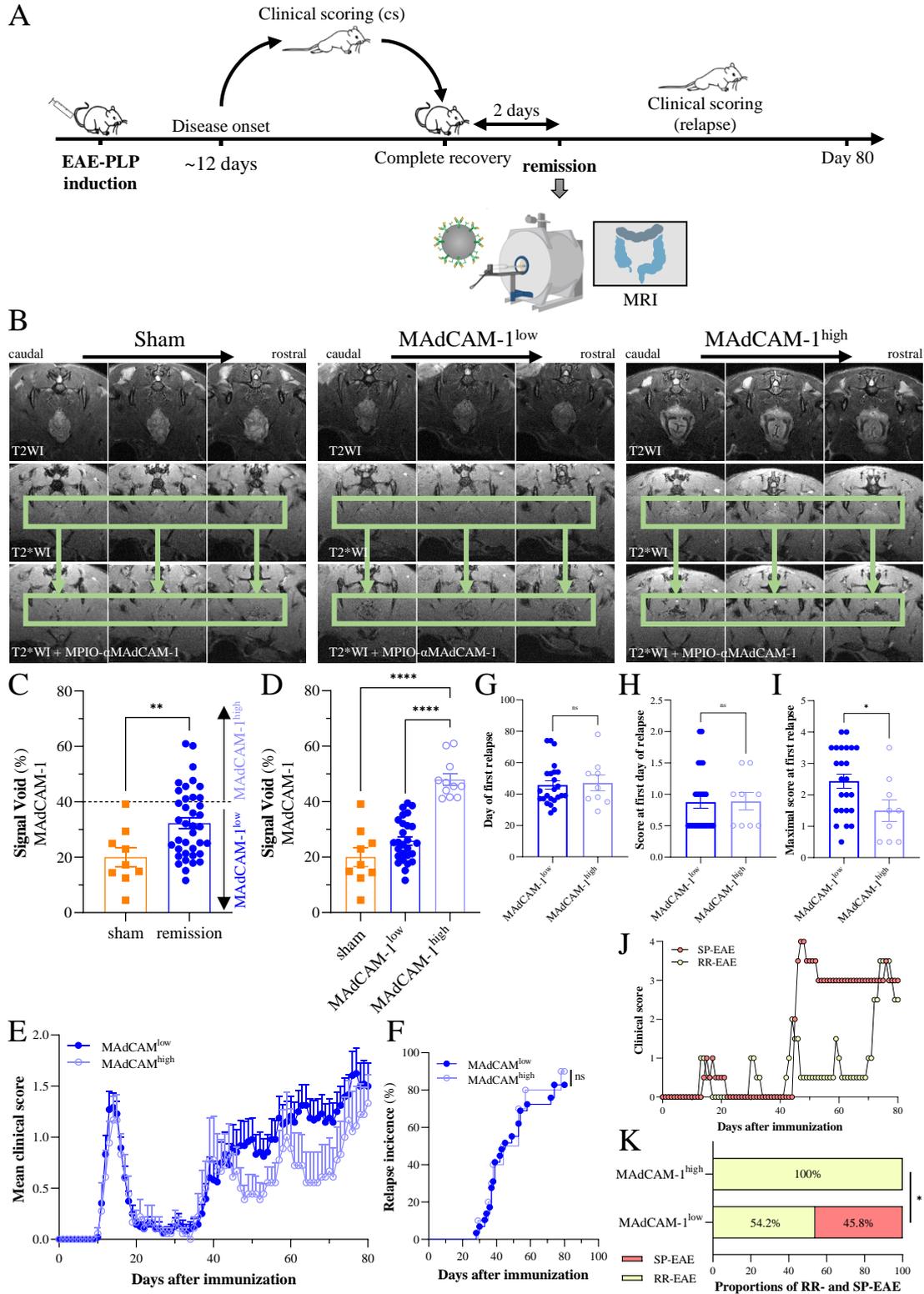


Figure 6: High MADCAM-1 expression during the remission period of EAE-PLP is associated with a higher proportion of relapsing-remitting form of the disease while its low expression is associated with a higher risk for conversion to secondary-progressive EAE.

(A) Schematic representation of the experimental design. EAE-PLP was induced and MPIO- α MAdCAM-1 enhanced MRI was performed two days after complete remission. (B) Representative T2-weighted (T2WI), T2*-weighted (T2*WI) and T2*-weighted after injection of MPIO- α MAdCAM-1 (T2*WI + MPIO- α MAdCAM-1) images in sham, in MADCAM-1^{low} and MADCAM-1^{high} EAE animals.

(C-D) Signal void quantification in sham (orange squares) and in EAE (blue circles) animals at days 10 to 12 after immunization before (**C** ; ** $P < 0.01$, t-test) and after split between MAdCAM-1^{low} (dark blue circles) and MAdCAM-1^{high} (light blue circles) animals (**D** ; **** $P < 0.0001$, One-way ANOVA + Bonferroni's multiple comparison). **(E)** Mean clinical score in MAdCAM-1^{low} (dark blue circles) and MAdCAM-1^{high} (light blue circles) EAE animals (Two-way ANOVA + Bonferroni's multiple comparison). **(F)** Relapse incidence over time in MAdCAM-1^{low} (dark blue circles) and MAdCAM-1^{high} (light blue circles) EAE animals (Mantel-Cox test). **(G-I)** Day of first relapse (**G**), score at first day of relapse (**H**) and maximal score at first relapse (**I**) in MAdCAM-1^{low} (dark blue circles) and MAdCAM-1^{high} (light blue circles) EAE animals (* $P < 0.05$, t-test or Mann Whitney test). **(J)** Representative example of a secondary progressive (SP-EAE) and a relapsing-remitting (RR-EAE) course of the disease. **(K)** Proportions of SP-EAE and RR-EAE in MAdCAM-1^{low} (dark blue circles) and MAdCAM-1^{high} (light blue circles) EAE-PLP animals (* $P < 0.05$, Fisher's exact test).

Next, we looked at PLP-induced EAE disease course in the two MAdCAM-1 groups (**Figure 6E**). In both groups, we observed a classical course of EAE with a first surge between 10 dpi and 14 dpi, a progressive recovery between 15 dpi and 22 dpi and a nearly complete remission between 23 dpi and 34 dpi (**Figure 6E**). By clinically monitoring the occurrence of relapses for 80 days, we noticed that the expression of MAdCAM-1 did not influence the incidence, the day and the score of the first relapse (**Figure 6F, 6G, 6H**). Interestingly, animals with MAdCAM-1^{low} signal during remission experienced a first relapse with a higher clinical score compared to MAdCAM-1^{high} mice (2.4 ± 0.2 vs. 1.5 ± 0.3 ; **Figure 6I**).

After the first relapse, we continued to clinically monitor MAdCAM-1^{low} and MAdCAM-1^{high} animals (**Figure 6E**). Surprisingly, we identified various profiles (relapsing-remitting form and secondary progressive form; **Figure 6E**). For the relapsing-remitting form, a relapse is defined as a sustained increase of ≥ 1 in clinical score after a remission period (cs 0 or 0.5) during at least 2 days. The other profiles are defined as secondary progressive form. We noticed that 100% of MAdCAM-1^{high} animals had a relapsing-remitting form while only 54.2% of MAdCAM-1^{low} mice presented this form (**Figure 6E, 6J, 6K**). Indeed, 45.8% of MAdCAM-1^{low} mice has a secondary progressive form (**Figure 6K**).

Altogether, these data suggest that a maintenance of an elevated intestinal inflammation could influence the disease course by promoting relapsing-remitting form while its decrease is linked with a higher susceptibility to a chronic installation of motor deficits.

Mild intestinal inflammation before EAE-MOG induction modifies disease evolution

Our previous results showed that intestinal inflammation modifications can influence disease evolution. In order to investigate whether an early intestinal inflammation (before the induction of the pathology) could modify the disease evolution, animals were subjected to DSS model of acute colitis (Fournier et al., 2020). DSS induces intestinal inflammation by disrupting epithelium, leading to the entry of luminal bacteria and associated antigens into the mucosa, triggering an immune response. Mice were fed during 5 days with 1.5% of DSS in the drinking water (**Figure 7A**). At baseline and after 5 days of treatment, we performed molecular imaging of the colon with T2*-weighted sequences both before and after MPIO- α MAdCAM-1 injection. Clinical symptoms of colitis were evident in mice treated with 1.5% of DSS. Indeed, mice treated with DSS had a loss of weight compared to control animals (**Figure 7B**). Furthermore, we observed that DSS treated animals presents a MAdCAM-1 signal void significantly superior to control animals (**Figure 7C, 7D**). All these observations confirmed disease activity.

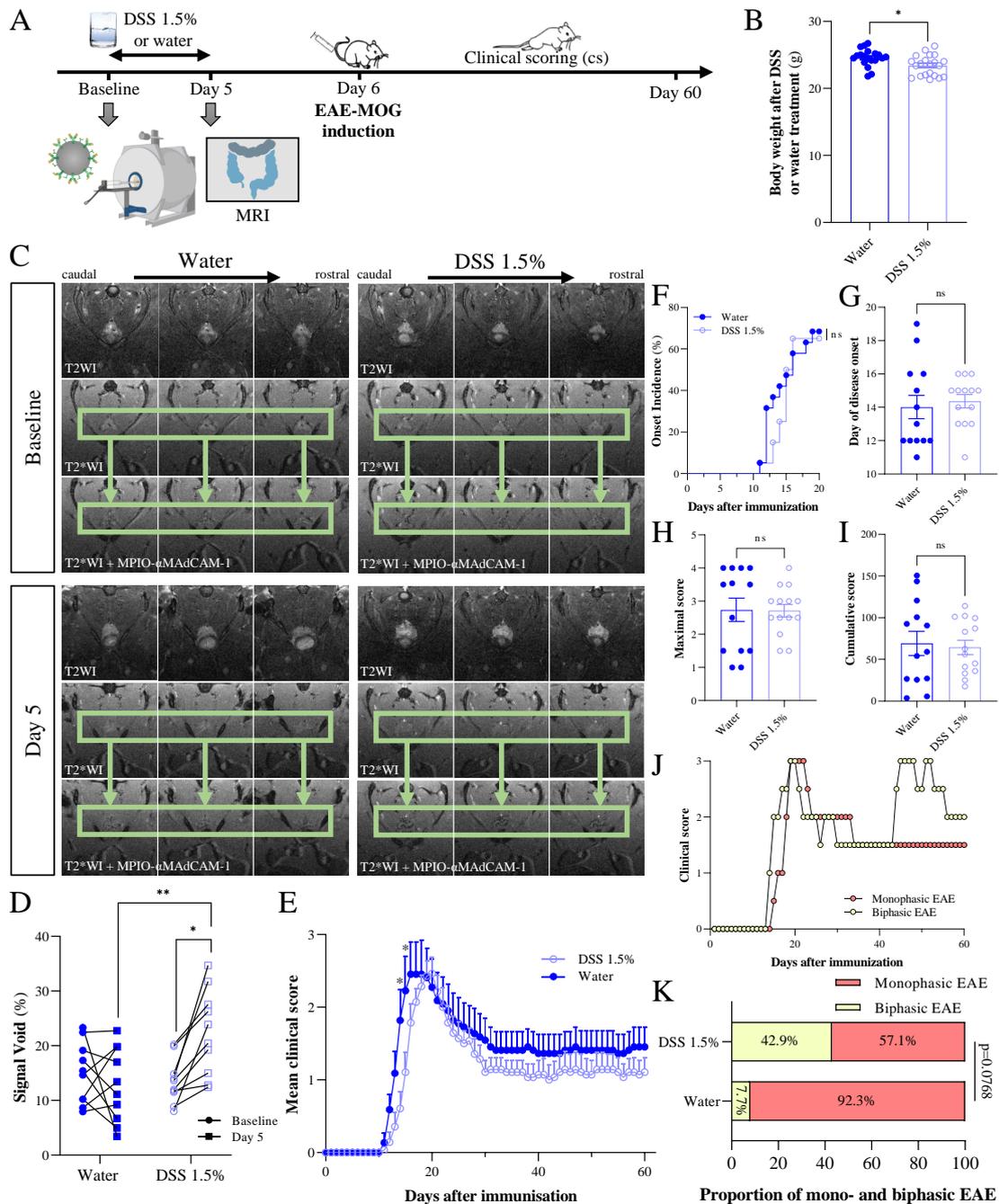


Figure 7: Moderate DSS-induced intestinal inflammation before EAE induction tends to delay the disease onset and to increase the proportion of biphasic EAE-MOG.

(A) Schematic representation of the experimental design. Animals were treated with or without DSS 1.5% in drinking water during 5 days before EAE-MOG induction and MPIO- α MAdCAM-1 enhanced MRI was performed at baseline and at day 5. (B) Body weight after 5 days of water (filled blue circles) or DSS 1.5% treatment (empty blue circles; * $P < 0.05$, t-test). (C) Representative T2-weighted (T2WI), T2*-weighted (T2*WI) and T2*-weighted after injection of MPIO- α MAdCAM-1 (T2*WI + MPIO- α MAdCAM-1) images in water and DSS 1.5% treated animals at baseline and 5 days after. (D) Signal void quantification in water (dark blue) and in DSS 1.5% (light blue) treated animals at baseline (circles) and day 5 (squares; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$, Two-way ANOVA + Bonferroni's multiple comparison). (E) Mean clinical score in water (filled blue circles) and DSS 1.5% (empty blue circles) pretreated animals (* $P < 0.05$, Two-way ANOVA + Bonferroni's multiple comparison). (F) Onset incidence over time after immunization in water (filled blue circles) and DSS 1.5% (empty blue circles) pretreated EAE animals

(Mantel-Cox test). **(G-I)** Day of disease onset **(G)**, maximal score **(H)** and cumulative score **(I)** in water (filled blue circles) and DSS 1.5% (empty blue circles) pretreated EAE animals (t-test or Mann Whitney test). **(J)** Representative example of a monophasic (in red) and a biphasic (in yellow) course of the disease. **(K)** Proportions of monophasic (in red) and biphasic (in yellow) course of the disease in water and DSS 1.5% pretreated EAE-MOG animals ($P=0,0768$, Fisher's exact test).

Then, animals were subjected to a MOG-induced EAE and their clinical score were evaluated for 60 days (**Figure 7A, 7E**). Both groups displayed a similar clinical score curve (**Figure 7E**). Although DSS-animals presented an intestinal inflammation compared to water-treated animals, no significant differences were detected on the onset incidence, the day of disease onset, the maximal clinical score and their cumulative score during the disease (**Figure 7F, 7G, 7H, 7I**, respectively). We continued to clinically monitor these both groups for 60 days. Most of the animals presented a classical MOG-induced EAE clinical curve corresponding to a monophasic curve with an increase of clinical symptoms, a decrease of around 1 point on the clinical score scale and then, this clinical score lasts until the end of the experiment (**Figure 7E, 7J**). Astonishingly, we observed that some animals presented a different profile. After the slight decrease of clinical score, they had a relapse with an increase of ≥ 1 in clinical score for at least two days (**Figure 7J**). We noticed that 92,3% of water-treated animals had a monophasic form while only 57.1% of DSS-treated mice presented this form (**Figure 7K**). Moreover, almost 43% of DSS-treated animals presented a biphasic form compared to 7.7% of controls animals.

Thus, this data showed that an early moderated intestinal inflammation can modify the EAE disease course without having effect on disease severity.

Discussion

The present study reported the kinetic of MAdCAM-1 expression in the two main animal models of MS (EAE-MOG and EAE-PLP) by molecular MRI directed against MAdCAM-1. We first showed that MAdCAM-1 signal increases with clinical score in EAE-MOG and that a high expression of MAdCAM-1 during the pre-symptomatic phase delays the disease onset without affecting disease incidence and

severity in EAE-MOG animals. Then, regarding PLP-induced EAE, we noticed that MAdCAM-1 expression is increased only at high clinical score in EAE animals. Moreover, two different profiles were observed during remission period. A high MAdCAM-1 expression during the remission period is associated with a higher proportion of relapsing-remitting form of the disease while its low expression is associated with a higher risk for conversion to secondary-progressive EAE. Furthermore, MPIO- α MAdCAM-1 signal is correlated with spatiotemporal distribution of T-CD4⁺ and B lymphocyte populations in the ileum and the spinal cord of EAE animals. Finally, moderate DSS-induced intestinal inflammation before EAE induction tends to delay the disease onset and to increase the proportion of biphasic EAE-MOG.

By investigating the expression of MAdCAM-1 by molecular MRI in the intestine during EAE time course, we first showed that MAdCAM-1 signal increases with the clinical score in both EAE-MOG and EAE-PLP animals. While several studies have shown an upregulation of MAdCAM-1 expression in the intestine of IBD patients as well as their animal models (Souza *et al.*, 1999; Connor *et al.*, 1999; Arihiro *et al.*, 2002), only a few have investigated its expression during EAE (Kuhbandner *et al.*, 2019; Duc *et al.*, 2019). Nevertheless, none study in our knowledge characterized such MAdCAM-1 expression profile at several stages of the disease. Thanks to a novel method of *in vivo* MRI assessment of MAdCAM-1 expression developed by our group (Fournier *et al.*, 2020), we were able for the first time to evaluate its expression all along the disease course in two different models of EAE. Thus, our study allows us to determine that MAdCAM-1 signal could be predictive for the disease evolution.

Then, we analyzed the quantity of lymphocytes population and more precisely the T (CD4⁺ and CD8⁺) and B lymphocytes by immunohistochemistry in the ileum, colon and spinal cord of MOG- and PLP-induced EAE animals. A decrease in B and T-CD4⁺ cells in the ileum of EAE animals concomitantly with their increase in the spinal cord was revealed in both models. These results suggest a migration from the ileum to the spinal cord in the two EAE models we used. These data are in agreement with a recent study reporting that adoptively transferred autoreactive T cells migrated first in the colon before reaching the spinal cord in EAE- animals (Duc *et al.*, 2019). These results suggest that an intestinal reactivation of those autoreactive T cells is necessary before their migration to the CNS.

Ongoing experiments will determine the specific lymphocyte subpopulations such as Th17, Th1 and Treg populations. Indeed, these subpopulations are known to be implicated in MS and in EAE models (Stromnes *et al.*, 2008; Reddy *et al.*, 2004; Gärtner *et al.*, 2006). Furthermore, these data support the hypothesis of a peripheral origin of the disease, especially by cross-reactivity or molecular mimicry with pathogen agents (Olson *et al.*, 2001; Harkiolaki *et al.*, 2009). So, autoreactive immune cells activated in peripheral organs, such as the intestine, would migrate through the peripheral lymph nodes and then to the CNS where they will be able to promote myelin sheath damages (Henderson *et al.*, 2009; Hemmer *et al.*, 2015). Nevertheless, in our study, although we observed a decrease in the B and T-CD4⁺ cells in the small intestine concomitant to an increase of these cells in the CNS, we are not able to confirm that the same B and T-CD4⁺ cells migrate from the small intestine to the CNS. Moreover, we could not confirm the autoreactive nature of B and T-CD4⁺ cells observed in the ileum. Future works may address this hypothesis.

We then investigated if the level of MAdCAM-1 expression before the disease onset could predict the apparition of motor symptoms in EAE-MOG animals. We showed that MAdCAM-1 MRI signal at days 10 to 12 after immunization was positively correlated with the day of onset of the disease. These data suggest that an early intestinal inflammation influences the development of motor impairments and that a low MAdCAM-1 expression lead to an early disease onset compared to high MAdCAM-1 expression. In order to confirm the influence of an early intestinal inflammation on disease course, we next pretreated animals with DSS before the induction of EAE. We observed that DSS pretreatment trends to delay the EAE-MOG disease onset confirming the influence of intestinal inflammation in onset disease. In the literature, it has been shown that in Th17 cell adoptive transfer EAE model, treatment with monoclonal antibodies directed against the $\alpha_4\beta_7$ integrin delayed the disease onset and reduced EAE severity (Duc *et al.*, 2019). Altogether, we hypothesize that high MAdCAM-1 expression could promote immune cell retention in the intestinal tissue, and especially in the ileum, and thus delay their migration to the CNS. Conversely, EAE animals that exhibit low MAdCAM-1 MRI signals at days 10-12 after immunization have probably already finalized the immune cells reactivation in the intestine, which allow them to migrate to the spinal cord leading to the appearance of motor symptoms. Further

investigations appear necessary to better understand the link between differential MAdCAM-1 expressions at early stage of the disease and the dynamic of leucocytes populations in EAE animals.

In the last part of this study, we investigated if MAdCAM-1 expression during the remission period of PLP-induced EAE animals could influence relapses during the disease. Regarding the MAdCAM-1 MRI signal, we were able to distinguish two different profiles (MAdCAM-1^{low} and MAdCAM-1^{high}, like during pre-symptomatic phase in EAE-MOG mice). Interestingly, we found that EAE animals with low expression of MAdCAM-1 during the remission period (MAdCAM-1^{low}) were more likely to convert into a secondary-progressive EAE contrary to MAdCAM-1^{high} animals. Moreover, MAdCAM-1^{high} animals showed a decrease of the maximal clinical score reached during the first relapse. Thus, these data suggest that high MAdCAM-1 expression during the remission period dampened the severity of relapses and promote a relapsing-remitting course of the disease.

Furthermore, MAdCAM-1 MRI signal assessment seems to highlight two distinct MAdCAM-1 expression profile during the remitting phase (clinical score 2 remitting). Indeed, some animals keep a high expression of MAdCAM-1 during the remitting phase while others exhibited a MAdCAM-1 decrease. These data could lead us to hypothesize that the MAdCAM-1 signal during remitting phase could foreshadow the maintenance or the diminution of intestinal inflammation at the remission period. These data could be reinforced by the DSS experiment. Indeed, DSS pretreated EAE-MOG mice were more likely to display a biphasic course compared to control animals.

Therefore, we presumed that the intestinal inflammation continuity (*via* a high MAdCAM-1 expression) could lead to the development of an immune tolerance against autoantigens causing the relapsing-remitting course of the disease. This hypothesis is reinforced by several studies. Indeed, a study has highlighted that MAdCAM-1 expression was needed to induce oral immunological tolerance (Cassani *et al.*, 2011). Treg are well known to be implicated in the establishment of immune tolerance (Lu *et al.*, 2017). Moreover, a depletion of Treg in EAE-PLP animals is associated with a conversion to a secondary-progressive disease course (Gärtner *et al.*, 2006). Finally, an increase of microbial strains such as *Clostridium*, already identified as promoting regulatory phenotypes in T-cells, has been observed

in relapsing-remitting EAE in comparison with primary-progressive EAE (Atarashi *et al.*, 2013; Gandy *et al.*, 2019). Further studies would help us to better understand the relationship between intestinal inflammation and autoimmune tolerance in relapsing-remitting multiple sclerosis.

Conclusion

Molecular MRI targeting MAdCAM-1 allowed us to assess the inflammatory status of the gut in animal models of MS. We highlighted two profiles of MAdCAM-1 expression in EAE animals during asymptomatic phases. Indeed, low MAdCAM-1 expression during the pre-symptomatic phase of a MOG-induced EAE or during the remission period of a PLP-induced EAE precipitates the disease onset and increases the risk for conversion to secondary progressive EAE, respectively. Altogether, these data suggest that the level of MAdCAM-1 expression could foreshadowed the evolution of the disease. So, its assessment, by using molecular MRI for example, could be a useful tool to stratify MS patients in order to provide personalized cares.

Acknowledgements

We thank VIRTUAL'HIS platform and Nicolas Elie from the University of Caen Normandy for the use of the Olympus VS120 slide scanning system. We thank the website biorender.com from which some figures were partly generated.

Fundings

This project was supported by grants from the French Ministry of Higher Education, the INSERM (French National Institute for Health and Medical Research), the regional Council of Normandy, the ARSEP foundation and the FRM (*Fondation pour la Recherche Médicale*).

References

- Arihiro S, Ohtani H, Suzuki M, Murata M, Ejima C, Oki M, Kinouchi Y, Fukushima K, Sasaki I, Nakamura S, Matsumoto T, Torii A, Toda G, Nagura H. 2002. Differential expression of mucosal addressin cell adhesion molecule-1 (MAdCAM-1) in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Pathol Int.* 52: 367-74.
- Ascherio A, Munger KL, White R, Köchert K, Simon KC, Polman CH, Freedman MS, Hartung HP, Miller DH, Montalbán X, Edan G, Barkhof F, Pleimes D, Radü EW, Sandbrink R, Kappos L, Pohl C. 2014. Vitamin D as an early predictor of multiple sclerosis activity and progression. *JAMA Neurol.* 71: 306-314.
- Atarashi K, Tanoue T, Oshima K, Suda W, Nagano Y, Nishikawa H, Fukuda S, Saito T, Narushima S, Hase K, Kim S, Fritz JV, Wilmes P, Ueha S, Matsushima K, Ohno H, Olle B, Sakaguchi S, Taniguchi T, Morita H, Hattori M, Honda K. 2013. Treg induction by a rationally selected mixture of Clostridia strains from the human microbiota. *Nature.* 500: 232-236.
- Berer K, Gerdes LA, Cekanaviciute E, Jia X, Xiao L, Xia Z, Liu C, Klotz L, Stauffer U, Baranzini SE, Kümpfel T, Hohlfeld R, Krishnamoorthy G, Wekerle H. 2017. Gut microbiota from multiple sclerosis patients enables spontaneous autoimmune encephalomyelitis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 114: 10719-10724.
- Berlin C, Berg EL, Briskin MJ, Andrew DP, Kilshaw PJ, Holzmann B, Weissman IL, Hamann A, Butcher EC. 1993. Alpha 4 beta 7 integrin mediates lymphocyte binding to the mucosal vascular addressin MAdCAM-1. *Cell.* 74: 185-195.
- Bjornevik K, Cortese M, Healy BC, Kuhle J, Mina MJ, Leng Y, Elledge SJ, Niebuhr DW, Scher AI, Munger KL, Ascherio A. 2022. Longitudinal analysis reveals high prevalence of Epstein-Barr virus associated with multiple sclerosis. *Science.* 375: 296-301.

- Cassani B, Villablanca EJ, Quintana FJ, Love PE, Lacy-Hulbert A, Blaner WS, Sparwasser T, Snapper SB, Weiner HL, Mora JR. 2011. Gut-tropic T cells that express integrin $\alpha 4\beta 7$ and CCR9 are required for induction of oral immune tolerance in mice. *Gastroenterology*. 141: 2109-18.
- Chen J, Chia N, Kalari KR, Yao JZ, Novotna M, Paz Soldan MM, Luckey DH, Marietta EV, Jeraldo PR, Chen X, Weinshenker BG, Rodriguez M, Kantarci OH, Nelson H, Murray JA, Mangalam AK. 2016. Multiple sclerosis patients have a distinct gut microbiota compared to healthy controls. *Sci Rep*. 6: 28484.
- Connor EM, Eppihimer MJ, Morise Z, Granger DN, Grisham MB. 1999. Expression of mucosal addressin cell adhesion molecule-1 (MAdCAM-1) in acute and chronic inflammation. *J Leukoc Biol*. 65: 349-55.
- Cortese A, Lova L, Comoli P, Volpe E, Villa S, Mallucci G, La Salvia S, Romani A, Franciotta D, Bollati V, Basso S, Guido I, Quartuccio G, Battistini L, Cereda C, Bergamaschi R. 2020. Air pollution as a contributor to the inflammatory activity of multiple sclerosis. *J Neuroinflammation*. 17: 334.
- Duc D, Vigne S, Bernier-Latmani J, Yersin Y, Ruiz F, Gaïa N, Leo S, Lazarevic V, Schrenzel J, Petrova TV, Pot C. 2019. Disrupting Myelin-Specific Th17 Cell Gut Homing Confers Protection in an Adoptive Transfer Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *Cell Rep*. 29: 378-390.
- Feagan BG, Rutgeerts P, Sands BE, Hanauer S, Colombel JF, Sandborn WJ, Van Assche G, Axler J, Kim HJ, Danese S, Fox I, Milch C, Sankoh S, Wyant T, Xu J, Parikh A; GEMINI 1 Study Group. 2013. Vedolizumab as induction and maintenance therapy for ulcerative colitis. *N Engl J Med*. 369: 699-710.
- Fournier AP, Martinez de Lizarrondo S, Rateau A, Gerard-Brisou A, Waldner MJ, Neurath MF, Vivien D, Docagne F, Gauberti M. 2020. Ultrasensitive molecular imaging of intestinal mucosal inflammation using leukocyte-mimicking particles targeted to MAdCAM-1 in mice. *Sci Transl Med*. 12: eaaz4047.

- Gandy KAO, Zhang J, Nagarkatti P, Nagarkatti M. 2019. The role of gut microbiota in shaping the relapse-remitting and chronic-progressive forms of multiple sclerosis in mouse models. *Sci Rep.* 9: 6923.
- Gärtner D, Hoff H, Gimsa U, Burmester GR, Brunner-Weinzierl MC. 2006. CD25 regulatory T cells determine secondary but not primary remission in EAE: impact on long-term disease progression. *J Neuroimmunol.* 172: 73-84.
- Gauberti M, Montagne A, Marcos-Contreras OA, Le Béhot A, Maubert E, Vivien D. 2013. Ultra-sensitive molecular MRI of vascular cell adhesion molecule-1 reveals a dynamic inflammatory penumbra after strokes. *Stroke.* 44: 1988-96.
- Harkioliaki M, Holmes SL, Svendsen P, Gregersen JW, Jensen LT, McMahon R, Friese MA, van Boxel G, Etzensperger R, Tzartos JS, Kranc K, Sainsbury S, Harlos K, Mellins ED, Palace J, Esiri MM, van der Merwe PA, Jones EY, Fugger L. 2009. T cell-mediated autoimmune disease due to low-affinity crossreactivity to common microbial peptides. *Immunity.* 30: 348-357.
- Hemmer B, Kerschensteiner M, Korn T. 2015. Role of the innate and adaptive immune responses in the course of multiple sclerosis. *Lancet Neurol.* 14: 406-419.
- Henderson AP, Barnett MH, Parratt JD, Prineas JW. 2009. Multiple sclerosis: distribution of inflammatory cells in newly forming lesions. *Ann Neurol.* 66: 739-753.
- International Multiple Sclerosis Genetics Consortium (IMSGC). 2019. Multiple sclerosis genomic map implicates peripheral immune cells and microglia in susceptibility. *Science.* 365: eaav7188.
- Jangi S, Gandhi R, Cox LM, Li N, von Glehn F, Yan R, Patel B, Mazzola MA, Liu S, Glanz BL, Cook S, Tankou S, Stuart F, Melo K, Nejad P, Smith K, Topçuoğlu BD, Holden J, Kivisäkk P, Chitnis T, De Jager PL, Quintana FJ, Gerber GK, Bry L, Weiner HL. 2016. Alterations of the human gut microbiome in multiple sclerosis. *Nat Commun.* 7: 12015.

- Kuhbandner K, Hammer A, Haase S, Terbrack E, Hoffmann A, Schippers A, Wagner N, Hussain RZ, Miller-Little WA, Koh AY, Stoolman JS, Segal BM, Linker RA, Stüve O. 2019. MAdCAM-1-Mediated Intestinal Lymphocyte Homing Is Critical for the Development of Active Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *Front Immunol.* 10: 903.
- Lee YK, Menezes JS, Umesaki Y, Mazmanian SK. 2011. Proinflammatory T-cell responses to gut microbiota promote experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proc Natl Acad Sci U S A. Suppl* 1: 4615-4622.
- Lu L, Barbi J, Pan F. 2017. The regulation of immune tolerance by FOXP3. *Nat Rev Immunol.* 17: 703-717.
- Nakache M, Berg EL, Streeter PR, Butcher EC. 1989. The mucosal vascular addressin is a tissue-specific endothelial cell adhesion molecule for circulating lymphocytes. *Nature.* 337: 179-81.
- Nouri M, Bredberg A, Weström B, Lavasani S. 2014. Intestinal barrier dysfunction develops at the onset of experimental autoimmune encephalomyelitis and can be induced by adoptive transfer of autoreactive T cells. *PLoS One.* 9: e106335.
- Olson JK, Croxford JL, Miller SD. 2001. Virus-induced autoimmunity: potential role of viruses in initiation, perpetuation, and progression of T-cell-mediated autoimmune disease. *Viral Immunol.* 14: 227-250.
- Reddy J, Illes Z, Zhang X, Encinas J, Pyrdol J, Nicholson L, Sobel RA, Wucherpfennig KW, Kuchroo VK. 2004. Myelin proteolipid protein-specific CD4+CD25+ regulatory cells mediate genetic resistance to experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101: 15434-15439.
- Sandborn WJ, Feagan BG, Rutgeerts P, Hanauer S, Colombel JF, Sands BE, Lukas M, Fedorak RN, Lee S, Bressler B, Fox I, Rosario M, Sankoh S, Xu J, Stephens K, Milch C, Parikh A; GEMINI 2 Study

- Group. 2013. Vedolizumab as induction and maintenance therapy for Crohn's disease. *N Engl J Med.* 369: 711-721.
- Souza HS, Elia CC, Spencer J, MacDonald TT. 1999. Expression of lymphocyte-endothelial receptor-ligand pairs, alpha4beta7/MAdCAM-1 and OX40/OX40 ligand in the colon and jejunum of patients with inflammatory bowel disease. *Gut.* 45: 856-863.
- Streeter PR, Berg EL, Rouse BT, Bargatze RF, Butcher EC. 1988. A tissue-specific endothelial cell molecule involved in lymphocyte homing. *Nature.* 331: 41-46.
- Stromnes IM, Cerretti LM, Liggitt D, Harris RA, Goverman JM. 2008. Differential regulation of central nervous system autoimmunity by T(H)1 and T(H)17 cells. *Nat Med.* 14: 337-342.
- Wekerle H. 2017. Brain Autoimmunity and Intestinal Microbiota: 100 Trillion Game Changers. *Trends Immunol.* 38: 483-497.
- Zundler S, Becker E, Schulze LL, Neurath MF. 2019. Immune cell trafficking and retention in inflammatory bowel disease: mechanistic insights and therapeutic advances. *Gut.* 68: 1688-1700.

DISCUSSION

DISCUSSION

I. Etude du stress et de l'enrichissement environnemental dans l'EAE-PLP.

I.1. Un stress aigu répété pendant la phase de rémission des symptômes de l'EAE-PLP précipite la survenue de poussées et en augmente l'incidence.

Les données de la littérature scientifique semblent toutes converger vers un effet délétère du stress psychologique à la fois dans le déclenchement de la SEP (voir [Table 3](#)) et dans la survenue de poussées chez les patients atteints de la forme RR (voir [Table 4](#)). Cependant, les études des effets du stress dans les divers modèles animaux de SEP s'avèrent moins unanimes. En effet, il apparaît que le stress puisse être bénéfique ou délétère en fonction qu'il s'agisse d'un stress chronique ou aigu (voir partie [II.2.](#)). De plus, les études ayant utilisé des modèles animaux de RR-SEP sont très minoritaires. Seule une étude, à notre connaissance, s'était intéressée à explorer les effets d'un stress aigu dans l'EAE-PLP. Dans celle-ci, les auteurs avaient conclu à une précipitation de l'apparition des symptômes moteurs chez des animaux ayant été soumis à un stress aigu aux jours 2 et 3 post-immunisation (Chandler *et al.*, 2002). Cependant, aucune étude ne s'était intéressée aux effets d'un tel stress aigu appliqué pendant la phase de rémission des symptômes moteurs d'une EAE-PLP sur l'évolution future de ceux-ci. A l'instar des résultats obtenus par Chandler et ses collaborateurs, notre étude a mis en évidence qu'une exposition aiguë répétée à un stress d'évitement de l'eau (WAS) pendant la phase de rémission d'une EAE-PLP précipitait la survenue des rechutes (jour 40.53 ± 3.43 vs 55.33 ± 4.92 , WAS vs contrôle respectivement) et en augmentait leur incidence (53.6% vs 34.6%, WAS vs contrôle respectivement). Bien que notre étude ait été en mesure de montrer qu'un stress aigu répété survenant pendant la phase de rémission d'une EAE-PLP augmentait le risque de survenue de poussées d'un facteur 1.58, celle-ci ne permet cependant pas de trancher quant aux origines physiopathologiques de ces effets délétères observés.

L'une des explications privilégiées par Chandler et ses collaborateurs pour expliquer les effets délétères observés d'un tel stress aigu repose sur l'ouverture de la BHE (Chandler *et al.*, 2002). En effet, les auteurs avaient pu mettre en évidence que les souris stressées montraient une augmentation de la perméabilité de la BHE en comparaison avec leurs homologues non stressées. Cette hypothèse d'un

effet délétère de stress aigu médiée par une ouverture de la BHE est supportée par d'autres travaux ayant montré une telle association (Esposito *et al.*, 2001). En effet, les auteurs de cette étude ont également mis en évidence, chez des animaux soumis à un stress aigu, une ouverture de la BHE due à une activation des mastocytes. De plus, d'autres travaux réalisés par cette équipe ont montré qu'un tel événement stressant était dans l'incapacité d'induire une ouverture de la BHE chez des animaux déficients en mastocytes (Esposito *et al.*, 2002).

Les effets délétères du stress aigu pourraient également être la conséquence d'une activation accrue des cellules microgliales. En effet, il a été montré que l'exposition à un stress aigu était en mesure d'activer les cellules microgliales, notamment par l'intermédiaire d'une production accrue de CRH, et de permettre ainsi la production et la libération de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1, l'IL-6 et le TNF α (Sugama *et al.*, 2011 ; Zhang *et al.*, 2012).

Enfin, une autre hypothèse, non exclusive, pourrait permettre d'expliquer au moins en partie les effets délétères du stress aigu sur l'occurrence des poussées dans l'EAE-PLP. Celle-ci entend que l'arrivée à échéance de l'évènement stressant, plus que l'évènement en lui-même, entrainerait un emballement de la réaction auto-immune. En effet, la baisse des concentrations plasmatiques de corticostérone à la fin de l'évènement stressant induirait une levée d'inhibition des cellules immunitaires entraînant une sur-activation de celles-ci (Moht et Pelletier, 2006).

Ainsi, d'autres études semblent nécessaires pour mieux comprendre les mécanismes délétères du stress aigu observés dans notre étude. Notamment, il apparaît nécessaire d'évaluer des effets du WAS sur la perméabilité de la BHE, et sur l'état d'activation des mastocytes et des cellules microgliales. Enfin, des mesures longitudinales des concentrations plasmatiques de corticostérone au cours et à la suite du stress aigu répété, ainsi qu'une étude de l'état d'activation des cellules auto-réactives permettrait de confronter la véracité de l'hypothèse de la résolution du stress comme facteur aggravant de la pathologie (Mohr et Pelletier, 2006).

I.2. L'enrichissement environnemental diminue l'incidence et la sévérité de l'EAE-PLP.

L'enrichissement environnemental, un paradigme chez l'animal pouvant se rapporter chez l'humain à une augmentation de l'activité physique, cognitive et sociale, apporte de nombreux bénéfices notamment en termes de plasticité cérébrale (Li et Tang, 2005 ; Nithianantharajah et Hannan, 2006). En effet, il a été montré que des animaux hébergés dans ce type d'environnement complexe par groupes sociaux importants présentaient une neurogénèse hippocampique optimisée, un nombre plus important ainsi qu'une plus grande ramification des dendrites, et une LTP plus efficace se traduisant par une augmentation de leurs capacités de mémoire et d'apprentissage (Kempermann *et al.*, 1998 ; Faherty *et al.*, 2003 ; Greenough et Volkmar, 1973 ; Foster et Dumas, 2001 ; Tang *et al.*, 2001). Ainsi, certains auteurs ont émis l'hypothèse qu'un tel hébergement pouvait présenter des effets protecteurs dans des modèles animaux de SEP. Ceci a notamment été démontré dans une étude publiée en 2007 dans laquelle des animaux immunisés contre le peptide MOG₃₅₋₅₅ et hébergés dans un environnement enrichi déclaraient la pathologie plus tardivement que leurs homologues hébergés en environnement standard et, contrairement à ces derniers, présentaient une récupération complète des symptômes moteurs (Magalon *et al.*, 2007). A l'instar des observations soulevées par ces travaux, nous avons, dans notre étude, été en mesure de montrer que l'enrichissement environnemental (EE) tendait à retarder l'apparition des symptômes moteurs dans une EAE-PLP en comparaison avec des animaux hébergés en conditions standard (STD ; jour 14.67 ± 0.41 vs 13.74 ± 0.35 respectivement). Cependant, contrairement à l'étude de Magalon et ses collaborateurs, nous avons également montré qu'un tel hébergement permettait de réduire de façon importante l'incidence de déclaration de la pathologie (47.1% vs 71.7%, EE vs STD). De plus, l'originalité de nos investigations a été de s'intéresser à la survenue de rechutes dans le modèle murin de RR-SEP (EAE-PLP). Nous avons ainsi pu montrer que l'enrichissement environnemental permettait également de protéger contre la survenue de poussées surnuméraires (incidence de rechute : 33.3% vs 68.8%, EE vs STD). Enfin, à l'instar d'autres travaux réalisés dans le modèle d'EAE-MOG (Bonfiglio *et al.*, 2019 ; Xiao *et al.*, 2019), nous avons mis en évidence que l'enrichissement de l'environnement diminuait la sévérité des symptômes moteurs à la fois pendant la première poussée et dans les rechutes suivantes (score maximal première poussée : 1.27 ± 0.16 vs 1.64

± 0.17 , EE vs STD ; rechutes : 1.63 ± 0.47 vs 2.77 ± 0.37 , EE vs STD). Bien que les effets de l'enrichissement environnemental dans l'EAE-PLP soient frappant, notre étude ne s'est malheureusement pas intéressée aux mécanismes physiologiques sous-jacents. Cependant, la littérature préexistante propose quelques mécanismes permettant d'expliquer ces effets. Par exemple, dans leurs travaux publiés en 2007, Magalon et ses collaborateurs ont mis en évidence une augmentation de la prolifération de progéniteurs neuraux issus de la zone sous-ventriculaire ainsi qu'une augmentation de leur différenciation en oligodendrocytes matures. Bien que cette hypothèse explicative permette de rendre compte des effets observés sur la récupération fonctionnelle, elle ne permet pas d'élucider les effets de l'enrichissement environnemental sur l'incidence de déclaration et sur la sévérité de la pathologie. Ainsi, d'autres mécanismes semblent être impliqués dans la protection contre la pathologie induite par l'enrichissement environnemental. Notamment, des auteurs ont pu mettre en évidence que ce type d'hébergement permettait de diminuer la prolifération et la différenciation des thymocytes par l'intermédiaire d'une activation de l'axe HPA et des récepteurs aux glucocorticoïdes par la corticostérone plasmatique (Xiao *et al.*, 2019). Les auteurs avaient de plus mis en évidence une diminution des populations lymphocytaires Th1 et Th17 ainsi qu'une augmentation des populations Treg au niveau du SNC des animaux hébergés en environnement enrichi. Cependant, l'absence de consensus quant aux effets de l'enrichissement environnemental sur l'activité de l'axe HPA et notamment sur les concentrations plasmatiques de corticostéroïdes nous laisse à penser que d'autres mécanismes pourraient être impliqués. Ces effets pourraient en particulier être médiés par une augmentation de l'intégrité de la BHE. En effet, il a été mis en évidence que l'hébergement d'animaux dans un environnement enrichi diminuait son altération dans un modèle d'hypoxie-ischémie cérébrale (Diaz *et al.*, 2016). Ainsi, la caractérisation des effets de l'enrichissement environnemental dans les modèles animaux de SEP nécessiterait davantage d'investigations. Notamment, il semble nécessaire de mieux caractériser ses effets sur les populations lymphocytaires impliquées dans la physiopathologie de la SEP. De plus, caractériser les effets d'un tel hébergement sur l'intégrité de la BHE dans le modèle de RR-SEP que nous avons utilisé apparaît une piste intéressante.

I.3. L'enrichissement environnemental inhibe les effets délétères d'un stress aigu répété sur l'incidence des rechutes.

L'utilisation de stratégies de réduction du stress chez l'humain semble apporter des bénéfices aux patients atteints de SEP, et notamment sur l'occurrence des poussées chez ceux atteints de la forme RR (Mohr *et al.*, 2002). L'enrichissement environnemental, outre ses effets sur la plasticité cérébrale précédemment exposés, peut se rapprocher, chez l'animal, de telles stratégies de réduction du stress. En effet, les études sur le sujet convergent vers une association entre enrichissement de l'environnement et diminution de la réponse à un évènement stressant. Ainsi, nous nous sommes intéressés à savoir si un tel paradigme permettait de protéger les animaux des effets délétères d'un stress aigu appliqué pendant la phase de rémission des symptômes moteurs. Nous avons pu mettre en évidence que l'hébergement d'animaux en environnement enrichi abolissait totalement la précipitation des rechutes (jour 61.00 ± 0 vs 43.73 ± 3.15) et l'augmentation de leur incidence (8.3% vs 71.4%) induites par le stress aigu répété. Plusieurs hypothèses ont été soulevées par la littérature scientifique pour tenter d'expliquer cet effet antagoniste entre enrichissement environnemental et stress. Certains auteurs ont pu mettre en évidence que l'hébergement d'animaux dans un environnement enrichi entraînait une augmentation des concentrations plasmatiques basales de corticostérone. Néanmoins, ces animaux ne présentaient pas d'augmentation de la production de corticostéroïdes à la suite de leur exposition à un évènement stressant (Figure 47A ; Benaroya-Milshtein *et al.*, 2004). Ainsi, l'enrichissement environnemental réduirait les effets du stress par l'intermédiaire d'une diminution de la réactivité de l'axe HPA, probablement induite par les concentrations plasmatiques anormalement élevées de corticostéroïdes à l'état basal. Cependant, une autre étude a mis en évidence qu'il n'existait aucune différence dans les concentrations plasmatiques en corticostérone entre animaux hébergés en environnement enrichi et animaux hébergés en environnement standard, que ce soit à l'état basal ou après exposition à un évènement stressant (Figure 47B ; Novaes *et al.*, 2017). Dans cette étude, les auteurs avaient conclu à un effet protecteur de l'enrichissement environnemental non pas médié par des modifications de concentrations plasmatiques en glucocorticoïdes mais par une plus grande résistance à ceux-ci. En effet, les auteurs avaient mis en évidence une diminution de la translocation nucléaire de leurs récepteurs (GR) au niveau des cellules de l'amygdale basolatérale. Nous avons également souhaité déterminer les

conséquences du WAS et de l'enrichissement environnemental sur l'axe HPA et notamment la synthèse de corticostéroïdes. Cependant, nous n'avons pas souhaité réaliser des dosages plasmatiques de cette hormone en raison du caractère potentiellement stressant que peuvent avoir les prélèvements sanguins *in vivo* (Gärtner *et al.*, 1980 ; Amario *et al.*, 1986 ; Haemisch *et al.*, 1999). Ainsi, nous avons effectué des dosages immuno-enzymatiques des métabolites fécaux de la corticostérone pour nous affranchir du caractère stressant des prélèvements répétés (Touma *et al.*, 2004). Cependant, la nécessité de rassembler les fèces de plusieurs animaux pour disposer d'échantillons suffisants pour de tels dosages nous empêche de réaliser les tests statistiques nécessaires à l'obtention d'une conclusion certaine quant à ceux-ci. Nos résultats préliminaires paraissent aller dans le sens des observations de Novaes et ses collaborateurs. En effet, ceux-ci semblent ne pas montrer de différence dans les concentrations des métabolites fécaux de la corticostérone entre animaux hébergés dans un environnement enrichi et animaux hébergés dans un environnement standard, que ce soit à l'état basal ou pendant le WAS (Figure 47C).

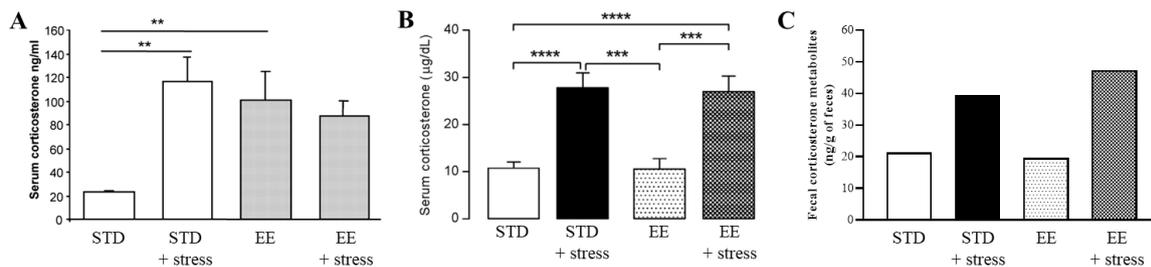


Figure 47 : Comparaison des résultats de trois études concernant les effets de l'enrichissement environnemental sur les concentrations en corticostérone. (A) La première étude montre une augmentation des concentrations plasmatiques en corticostérone à l'état basal chez des animaux hébergés en environnement enrichi (EE). Cependant, la survenue d'un évènement stressant échoue à provoquer une augmentation des concentrations plasmatiques en corticostérone chez les animaux hébergés en EE contrairement aux animaux hébergés en conditions standards (STD ; adapté de Benaroya-Milshtein *et al.*, 2004). (B) La seconde étude quant à elle ne montre aucune différence dans les concentrations plasmatiques en corticostérone à l'état basal entre animaux EE et animaux STD. De plus, l'exposition à un évènement stressant des animaux EE et des animaux STD entraîne une augmentation similaire de ces concentrations plasmatiques (adapté de Novaes *et al.*, 2017). (C) Les dosages des métabolites de la corticostérone dans les fèces des animaux de notre étude ne montrent pas non plus de différence entre animaux EE et STD. STD : Environnement standard ; EE : Environnement Enrichi.

Cependant, bien que nos résultats et ceux de Novaes et ses collaborateurs semblent converger, ils remettent en question les résultats de Xiao et ses collaborateurs publiés en 2019 selon lesquels l'enrichissement environnemental atténuait une EAE-MOG par l'intermédiaire d'une inhibition des thymocytes médiée par la corticostérone circulante. Ainsi, d'autres investigations pourraient permettre de mieux comprendre les mécanismes physiologiques à l'origine des effets bénéfiques de l'enrichissement environnemental sur l'EAE. Une des pistes pourrait faire intervenir une réduction de

l'ouverture de la BHE, possiblement médiée par une inhibition des mastocytes. En effet, certaines études ont mis en évidence que l'enrichissement environnemental permettait le maintien de l'intégrité de la BHE dans des modèles dans lesquels celle-ci est normalement altérée (Diaz *et al.*, 2016). De plus, alors que l'étude de Belz et ses collaborateurs ne montrait pas de différence dans les concentrations plasmatiques en corticostérone entre animaux hébergés en environnement enrichi et animaux contrôles, ni à l'état basal, ni à la suite d'un stress modéré, une forte diminution des concentration plasmatiques d'ACTH avait pu être mise en évidence chez ces animaux (Belz *et al.*, 2003). Celle-ci pourrait alors être le reflet d'une diminution de la production hypothalamique de CRH. Or, il a été montré qu'un événement stressant conduisait à une ouverture de la BHE, notamment *via* l'activation des mastocytes par la CRH (Esposito *et al.*, 2002). Ainsi, une diminution de la production hypothalamique de CRH induite par l'enrichissement environnemental pourrait être à l'origine de maintien de l'intégrité de la BHE et réduire de ce fait l'apparition et la sévérité des symptômes moteurs dans l'EAE. Ainsi, une caractérisation plus précise des effets de l'enrichissement environnemental sur l'activité de l'axe HPA, ne se basant pas uniquement sur les concentrations plasmatiques de corticostérone, mais prenant également en compte la production de CRH et d'ACTH par l'hypothalamus et l'hypophyse respectivement, permettrait d'appuyer cette hypothèse.

Bien que les mécanismes à l'origine des bienfaits de l'enrichissement environnemental ne soient pas complètement élucidés, ce type d'environnement a montré des bénéfices assez remarquables dans les modèles animaux de SEP. Cependant, notre étude n'a seulement exploré les effets d'un tel environnement appliqué pendant toute la durée de l'expérimentation. En effet, nous n'avons pas évalué si un enrichissement de l'environnement pouvait avoir les mêmes effets bénéfiques lorsqu'appliqué après l'apparition des premiers symptômes moteurs. Néanmoins, l'élaboration de protocoles standardisés chez l'humain, couplant activité physique, sociale et intellectuelle, en addition avec les traitements pharmacologiques disponibles, pourrait permettre d'atténuer les symptômes de la SEP et d'en réduire l'occurrence. En effet, certaines fonctions stimulées par l'enrichissement environnemental ont déjà montré chez l'humain des résultats bénéfiques. Par exemple, l'activité physique adaptée semble augmenter les capacités ambulatories des patients et réduire les symptômes dépressifs et la fatigue

ressentie. De plus, une telle activité physique semble diminuer l'incidence des poussées et ralentir la progression de la maladie (Motl *et al.*, 2017).

II. Etude de l'inflammation intestinale dans l'EAE-MOG et l'EAE-PLP.

De nombreuses études indiquent qu'une dysbiose intestinale serait impliquée dans la physiopathologie de la SEP et ses modèles animaux (Goverman *et al.*, 1993 ; Lee *et al.*, 2011 ; Berer *et al.*, 2017). De plus, des modifications précoces de l'homéostasie intestinale ont été révélées dans l'EAE. Notamment, une augmentation de la perméabilité intestinale a été identifiée dès les premiers jours après induction d'une EAE en association avec une augmentation des populations lymphocytaires Th1 et Th17 et une diminution des populations Treg au niveau de la *lamina propria*, des plaques de Peyer et des MLN (Nouri *et al.*, 2014). D'autres auteurs ont étudié les effets d'une inhibition du trafic lymphocytaire vers le tissu intestinal en inhibant les interactions entre l'intégrine $\alpha_4\beta_7$ exprimée à la surface des lymphocytes et la protéine MAdCAM-1 exprimée par les cellules endothéliales intestinales (Kuhbandner *et al.*, 2019 ; Duc *et al.*, 2019). Ces études ont ainsi pu mettre en évidence que de telles inhibitions diminuaient le recrutement de lymphocytes Th1 et Th17 à la fois au niveau du tractus intestinal mais également au niveau de la moelle épinière des animaux, et diminuait par conséquent la sévérité des pathologies induites.

Dans notre seconde étude, nous avons souhaité mieux comprendre la cinétique d'expression de MAdCAM-1 et son implication dans l'émergence des symptômes moteurs dans les deux principaux modèles animaux de SEP : l'EAE-MOG et l'EAE-PLP. Pour accéder à cette expression *in vivo*, nous avons utilisé l'IRM moléculaire dirigée contre MAdCAM-1 telle que précédemment décrite dans une autre étude de notre groupe (Fournier *et al.*, 2020).

II.1. L'expression de MAdCAM-1 augmente avec les symptômes moteurs dans l'EAE-MOG et l'EAE-PLP.

Notre étude a permis de mettre en évidence une augmentation de l'expression de la protéine MAdCAM-1 avec le score clinique dans l'EAE-MOG. De plus, nous avons pu mettre en évidence une diminution significative des populations lymphocytaires Th et B dans la *lamina propria* de l'iléon avec

le score clinique, parallèlement à leur augmentation dans la moelle épinière des animaux. L'étude des populations lymphocytaires par cytométrie en flux a permis de confirmer ces résultats, à savoir une diminution de l'abondance en cellules Th et B dans la *lamina propria* de l'iléon des animaux EAE-MOG parallèlement à leur augmentation dans la moelle épinière. Cette même étude a de plus permis de mettre en évidence une diminution de l'abondance de lymphocytes Th17 et Th2 au niveau de l'iléon de ces mêmes animaux (Figure 48). Cependant, nous ne disposons malheureusement pas de cette donnée au niveau de la moelle épinière en raison du trop faible nombre de cellules qu'il nous a été capable d'obtenir.

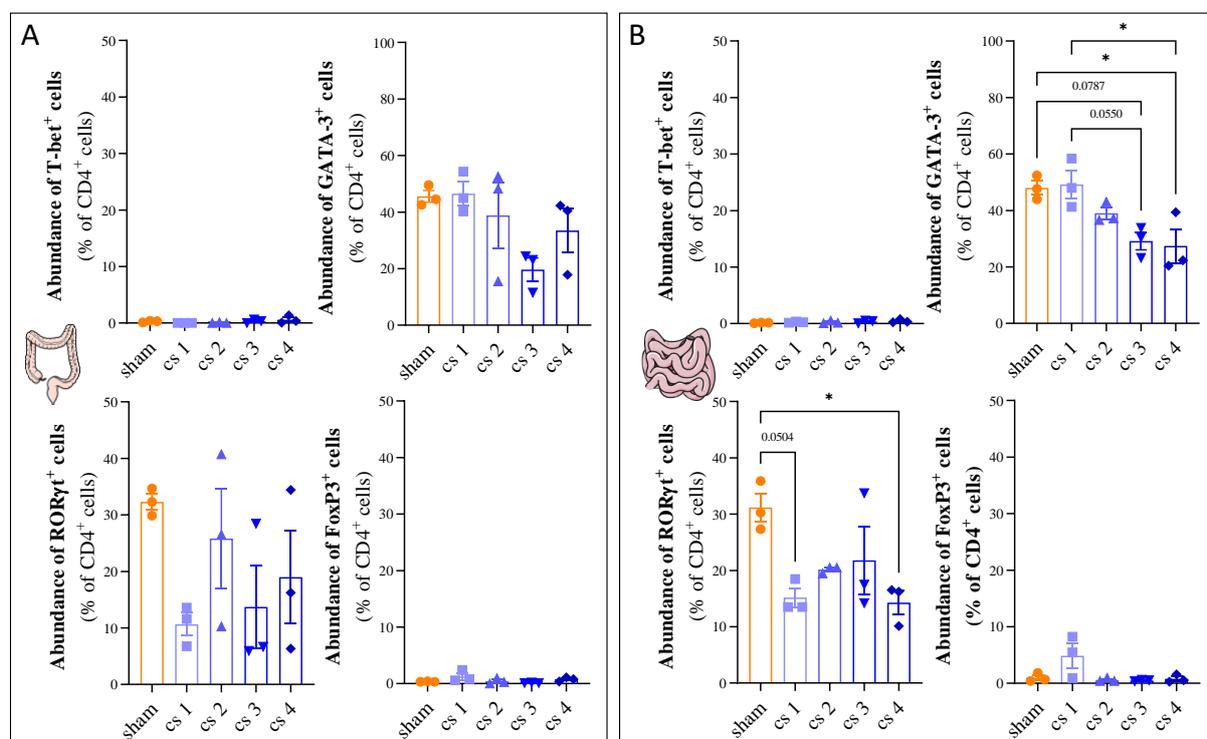


Figure 48 : Analyse des sous-populations lymphocytaires T par cytométrie en flux au niveau (A) du colon et (B) de l'iléon de souris EAE-MOG aux scores cliniques (cs) 1 à 4 et de souris sham. Les Th1, Th2, Th17 et Treg ont été révélées en ciblant respectivement les marqueurs T-bet, GATA-3, RORγt et FoxP3. *P<0.05, One-way ANOVA + comparaison multiple de Bonferroni.

Ainsi, ces données suggèrent qu'il puisse exister une migration de cellules auto-réactives appartenant aux populations lymphocytaires B et Th, et notamment Th17, depuis l'iléon vers la moelle épinière où elles causeront les dommages à la gaine de myéline à l'origine des symptômes moteurs observés (Panitch *et al.*, 1987 ; Langrish *et al.*, 2005 ; Kroenke *et al.*, 2008 ; Lovato *et al.*, 2011). Cette idée d'une migration des cellules auto-réactives depuis le tissu intestinal vers le SNC d'animaux EAE est confortée par la littérature préexistante. En effet, dans une étude publiée en 2019, les auteurs avaient montré une

diminution du nombre de lymphocytes Th17 auto-réactifs dans le colon d'animaux EAE parallèlement à leur augmentation au niveau de la moelle épinière (Duc *et al.*, 2019). Cette étude et la nôtre semblent ainsi étayer l'hypothèse selon laquelle une activation des lymphocytes auto-réactifs dans des organes périphériques (poumons, intestins), par réactivité croisée ou mimétisme moléculaire avec des antigènes provenant d'agents infectieux, pourrait être à l'origine du déclenchement de la pathologie (Olson *et al.*, 2001 ; Harkiolaki *et al.*, 2009). Les lymphocytes ainsi activés migreraient ensuite vers les ganglions lymphatiques puis le SNC où ils seront en mesure d'induire les dommages à la gaine de myéline à l'origine des symptômes observés (Henderson *et al.*, 2009 ; Hemmer *et al.*, 2015). Cependant, alors que cette migration semblait avoir lieu entre le colon et la moelle épinière des animaux dans l'étude de Duc et ses collaborateurs, notre étude semble quant à elle démontrer qu'elle proviendrait davantage de l'iléon. En effet, les résultats des analyses histologiques au niveau du colon semblent à l'inverse montrer une augmentation des populations lymphocytaires Th et B. Cependant, notre étude ne permet pas de conclure de façon certaine quant à la nature auto-réactive de ces populations lymphocytaires retrouvées dans l'iléon, ni que leur diminution soit effectivement liée à une migration vers le SNC. Ainsi, il apparaît nécessaire de confirmer dans un premier temps la présence de lymphocytes auto-réactifs au niveau de la muqueuse intestinale par l'intermédiaire par exemple de techniques de cytométrie en flux utilisant des tétramères du CMH-II couplés à l'antigène de myéline utilisés pour l'immunisation (Reddy *et al.*, 2003 ; Korn *et al.*, 2007). De plus, des méthodes de suivi des populations lymphocytaires, par exemple par utilisation de transfert adoptifs de lymphocytes auto-réactifs préalablement marqués par un fluorochrome, permettrait de confirmer la suite d'évènements proposée dans la mise en place de la réaction auto-immune (Berger *et al.*, 2007).

Ensuite, nous avons souhaité accéder au niveau d'expression de MAdCAM-1 dans un modèle de RR-EAE. Ainsi, nous avons pu observer que l'expression de MAdCAM-1 semblait également augmenter avec le score clinique dans l'EAE-PLP, bien que nous ne disposions pas de suffisamment de données pour l'affirmer avec certitude. De plus, l'étude histologique des populations lymphocytaires semble montrer une diminution du nombre de lymphocytes Th dans la *lamina propria* de l'iléon, parallèlement à une augmentation de ceux-ci dans la moelle épinière des animaux. Cependant, à

l'inverse de l'étude réalisée sur des animaux immunisés contre le peptide MOG₃₅₋₅₅, nous n'avons pas été en mesure d'observer une diminution significative du nombre de lymphocytes B dans la *lamina propria* de l'iléon, bien qu'une augmentation de leur nombre soit observée dans la moelle épinière. De manière générale, les changements observés dans l'EAE-MOG semblent beaucoup moins flagrants dans l'EAE-PLP. L'une des explications possible quant aux différences observées entre ces deux modèles pourrait être liée aux souches murines utilisées et à une différence dans les structures anatomiques intestinales impliquées. En effet, alors que les signaux MAdCAM-1 obtenus à l'IRM semblent équivalents entre animaux EAE-MOG et animaux EAE-PLP, les observations histologiques des tissus intestinaux divergent. Il semble que les souris de la souche SJL/J immunisées contre le peptide PLP₁₃₉₋₁₅₁ montrent une fixation réduite des MPIOs-MAdCAM-1 dans les vaisseaux sanguins de la *lamina propria* comparativement aux animaux de la souche C57BL/6J immunisés contre le peptide MOG₃₅₋₅₅. Ainsi, nous émettons l'hypothèse selon laquelle l'augmentation du signal MAdCAM-1 observée chez les souris EAE-PLP reflèterait une augmentation de l'expression de MAdCAM-1 au niveau des vaisseaux sanguins des GALT et non de la *lamina propria*. Ainsi, à l'inverse de ce qui est observé dans l'EAE-MOG, les GALT seraient les structures intestinales les plus impliquées dans la physiopathologie de l'EAE-PLP. Cette hypothèse est notamment confortée par la susceptibilité génétique inhérente à la souche murine SJL/J à développer spontanément des sarcomes débutant de manière privilégiée dans les plaques de Peyer et les nœuds lymphatiques mésentériques (Haran-Ghera *et al.*, 1967 ; Chow et Ho, 1988). Ainsi, cette implication différentielle probable des GALT, et notamment des plaques de Peyer, dans la physiopathologie de l'EAE en fonction de la souche murine utilisée mériterait davantage d'investigations. Notamment, l'inclusion de l'étude des populations lymphocytaires y résidant, par cytométrie en flux par exemple, pourrait répondre à ce questionnement. D'autre part, augmenter la sensibilité de l'IRM moléculaire dirigée contre MAdCAM-1 pourrait nous permettre de distinguer le signal provenant de la *lamina propria* de celui des GALT.

Ainsi, la première partie de cette étude conforte l'idée d'une implication du tissu intestinal, et notamment de l'iléon, dans la physiopathologie de l'EAE-MOG et de l'EAE-PLP. De plus, celle-ci

confirme l'efficacité de l'IRM moléculaire dirigée contre MAdCAM-1 dans la visualisation non invasive de l'inflammation intestinale dans ces deux modèles animaux de SEP.

II.2. Le niveau d'expression de MAdCAM-1 pendant la phase présymptomatique influe sur l'apparition des symptômes moteurs dans l'EAE-MOG.

Dans la seconde partie de cette étude, nous nous sommes intéressés à évaluer le niveau d'expression de MAdCAM-1 par IRM moléculaire avant l'apparition des symptômes moteurs suite à l'immunisation d'animaux contre le peptide MOG₃₅₋₅₅. Ainsi, nous avons constaté que les souris présentant un signal MAdCAM-1 en IRM plus élevés aux jours 10 à 12 post-immunisation (MAdCAM-1^{high}) déclaraient la pathologie plus tardivement que les animaux avec un signal MAdCAM-1 plus faible (MAdCAM-1^{low} ; jour 16.2 ± 1.5 vs 13.9 ± 1.3 respectivement). De manière intéressante, plus le signal MAdCAM-1 était élevé à ce stade, plus les symptômes moteurs apparaissaient tardivement. De façon similaire, le pré-traitement d'animaux, avant l'induction d'une EAE-MOG, avec une faible dose de DSS, à l'origine d'une inflammation intestinale minime sans symptômes apparents, semblait retarder l'apparition des symptômes moteurs, bien qu'aucune différence significative n'ait été observée. Ainsi, une inflammation intestinale précoce, notamment par l'intermédiaire d'une augmentation de l'expression de MAdCAM-1 semble retarder le début de la pathologie. Cependant, ces données apparaissent de prime abord en contradiction avec la littérature scientifique. A l'instar des études ayant mis en évidence les effets protecteurs d'immunothérapies dirigées contre l'intégrine $\alpha_4\beta_7$ dans les MICI (Feagan *et al.*, 2013 ; Sandborn *et al.*, 2013), certains auteurs se sont intéressés aux effets d'une inhibition des interactions entre la protéine MAdCAM-1 et l'intégrine $\alpha_4\beta_7$ dans le développement de l'EAE. Dans la première d'entre elles, les auteurs avaient pu mettre en évidence une forte réduction dans l'incidence de déclaration d'une EAE-MOG ainsi qu'une réduction de la sévérité de celle-ci chez des animaux déficients en MAdCAM-1 (MAdCAM-1-KO ; Kuhbandner *et al.*, 2019). Ces animaux présentaient de plus une réduction des populations lymphocytaires Th1, Th17 et B dans la moelle épinière et l'intestin grêle. Cependant, le traitement d'animaux EAE de type sauvage par des anticorps monoclonaux dirigés contre MAdCAM-1 entre le jour 5 et le jour 15 après immunisation ne permettait pas une telle réduction de la sévérité de la maladie. D'autres auteurs ont ainsi proposé que l'absence d'effet d'une telle

immunothérapie résultait d'une intervention trop tardive (Duc *et al.*, 2019). Ces auteurs ont en effet pu mettre en évidence que des injections répétées d'anticorps monoclonaux dirigés contre l'intégrine $\alpha_4\beta_7$ pendant la phase pré-symptomatique d'animaux immunisés par transfert adoptif de lymphocytes Th17 auto-réactifs diminuait la sévérité de l'EAE. Cependant, ils n'avaient pas pu mettre en évidence d'influence d'un tel traitement sur une EAE induite par immunisation active. Ainsi, nos résultats ne sont pas contradictoires avec les études précédemment citées. En effet, l'originalité de nos travaux a été d'évaluer le niveau d'expression de MAdCAM-1 à un instant unique précédant l'apparition des premiers symptômes de l'EAE sans en inhiber la fonction. Notre étude ne nous a pas permis d'accéder aux niveaux d'expression de MAdCAM-1 en amont de cet instant. Ainsi, nous émettons l'hypothèse selon laquelle une forte expression de MAdCAM-1 pendant la période pré-symptomatique d'une EAE-MOG entraîne une rétention des cellules auto-réactives, et en particulier des lymphocytes Th17 et B, au niveau du tissu intestinal, retardant de ce fait leur migration vers le SNC et par conséquent l'apparition des symptômes moteurs. Inversement, les animaux MAdCAM-1^{low} auraient aux jours 10 à 12 déjà achevé la réactivation intestinale de ces mêmes lymphocytes alors en mesure de migrer vers le SNC et d'entraîner les dommages à la gaine de myéline responsables de l'apparition des déficits moteurs (Figure 49).

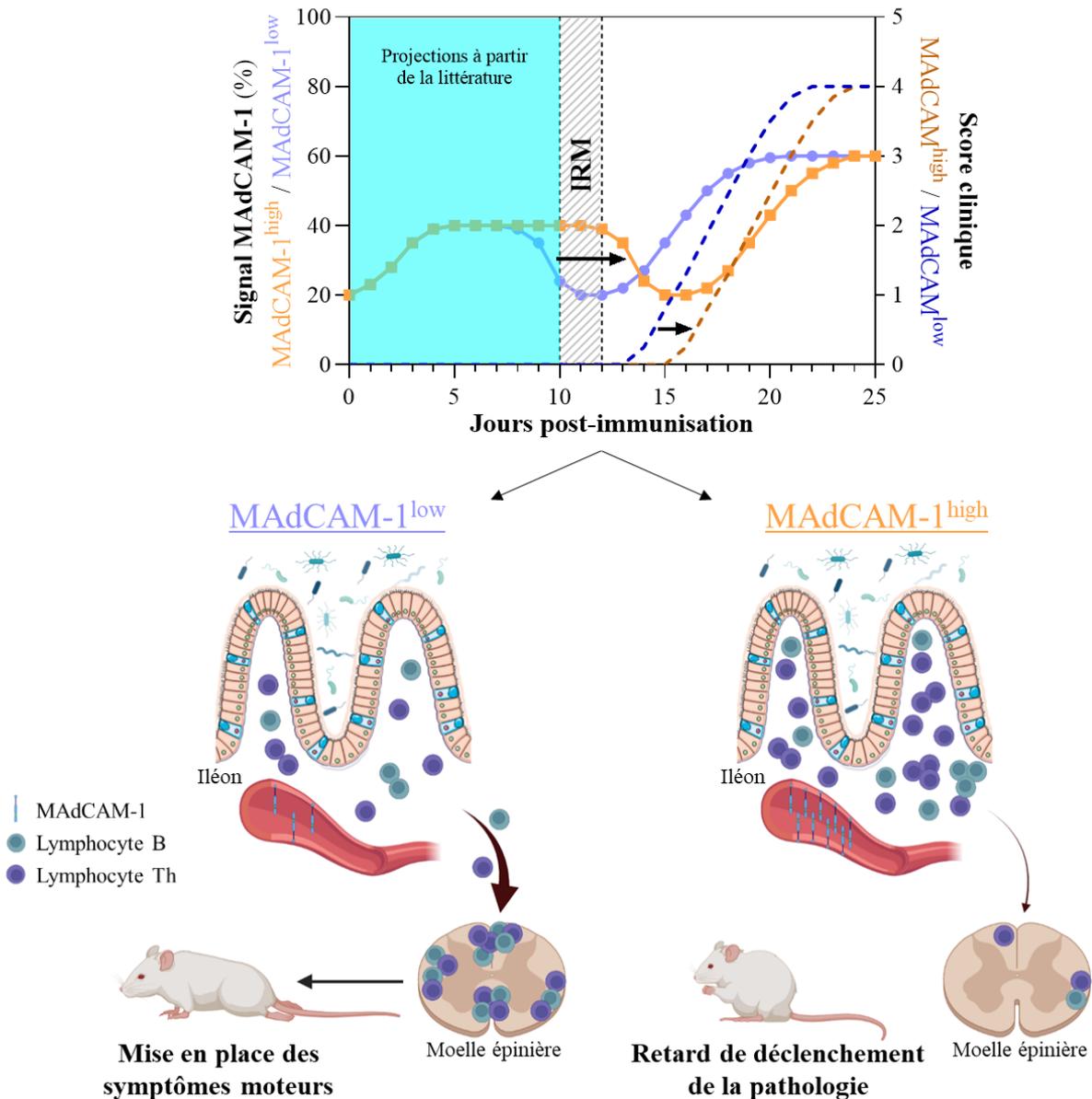


Figure 49 : Proposition d’une suite temporelle d’évènements quant à l’implication d’une inflammation intestinale dans le développement d’une EAE-MOG.

Notre hypothèse propose qu’une augmentation de l’expression de MAdCAM-1 se produise dans les premiers jours après l’immunisation des animaux contre le peptide MOG₃₅₋₅₅. A cette augmentation est associée une rétention des lymphocytes T et B auto-réactifs dans l’iléon des animaux ainsi que leur réactivation *in situ*. Une fois cette première phase de réactivation terminée, les lymphocytes T et B vont commencer leur migration vers la moelle épinière des animaux, parallèlement à une diminution de l’expression de MAdCAM-1. Après une infiltration suffisante de ceux-ci au niveau du SNC, les premiers symptômes moteurs vont apparaître. S’en suivra alors une inflammation systémique croissante à l’origine d’une augmentation secondaire de l’expression de MAdCAM-1. Le retard de déclaration de l’EAE chez les animaux MAdCAM^{high} s’expliquerait alors par une phase de réactivation intestinale prolongée retardant de ce fait la suite des évènements précédemment présentés.

Cependant, aucune donnée à notre disposition ne permet de confirmer de façon certaine notre hypothèse. En effet, d’autres investigations semblent nécessaires pour confirmer la proposition faite quant à la suite d’évènements impliquant le tissu intestinal dans la physiopathologie de l’EAE-MOG. En effet, il serait intéressant d’évaluer plus précocement le niveau d’expression de MAdCAM-1 par

l'intermédiaire de l'IRM moléculaire et de le mettre en relation avec d'éventuelles modifications dans l'abondance des diverses populations lymphocytaires, en particulier B et Th17. Nous avons cependant été en mesure d'obtenir quelques données préliminaires quant à ces populations lymphocytaires en phases pré-symptomatique, aux jours 11 et 12 post-immunisation (Figure 50).

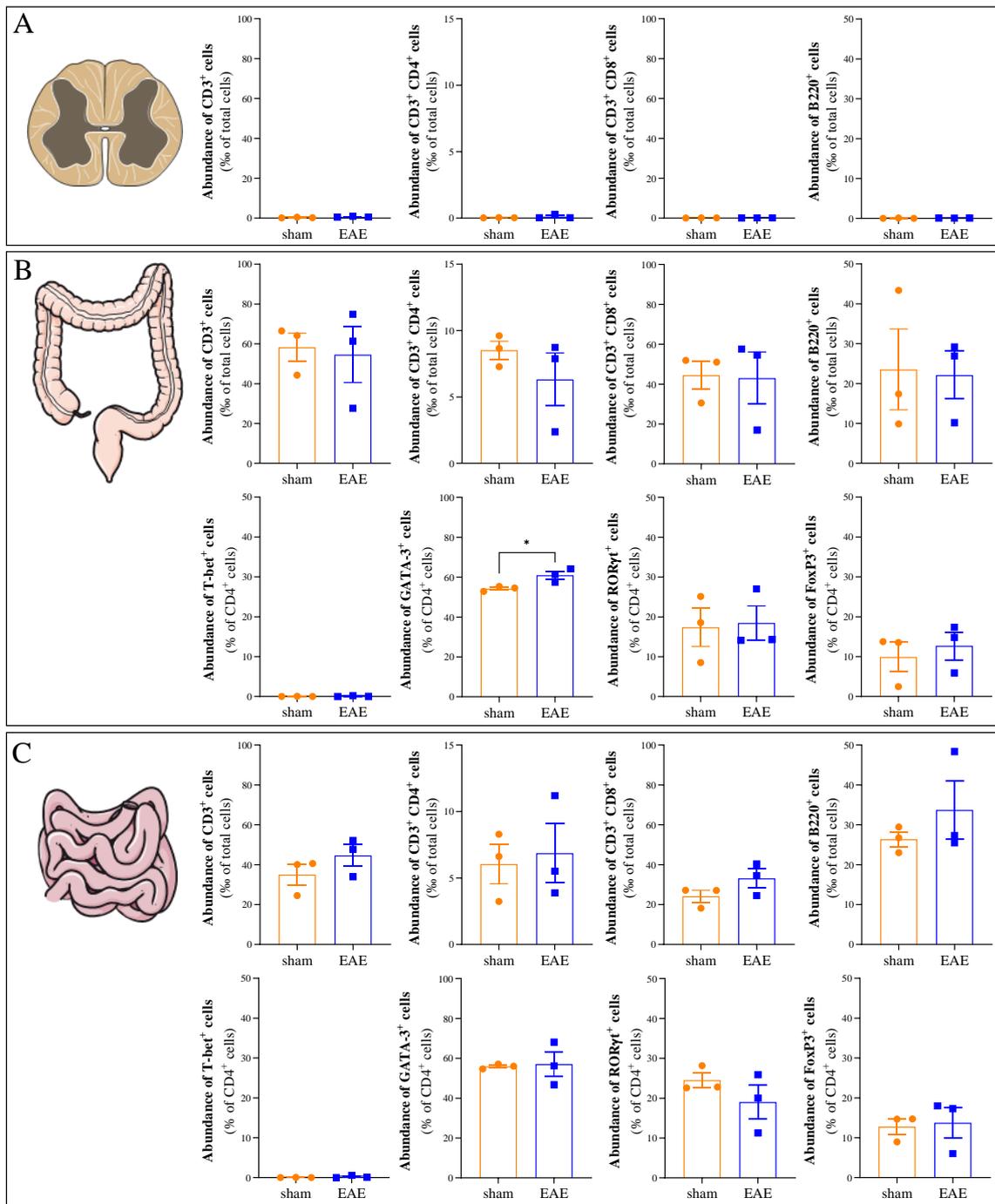


Figure 50 : Analyses des populations lymphocytaires Th, Tc et B, ainsi que les sous-populations lymphocytaires Th1, Th2, Th17 et Treg par cytométrie en flux au niveau de (A) la moelle épinière, (B) du colon et (C) de l'iléon de souris EAE-MOG aux jours 11 et 12 après immunisation et de souris sham. Les lymphocytes T totaux, Th, Tc et B ont été révélés en ciblant respectivement les marqueurs CD3, CD4, CD8 et B220. Les Th1, Th2, Th17 et Treg ont été révélés en ciblant respectivement les marqueurs T-bet, GATA-3, RORγt et FoxP3. *P<0.05, t-test ou test de Mann-Whitney.

Nous n'avons pas été capables d'observer quelconques modifications que ce soit en termes de représentation des lymphocytes B et T, ou dans les sous-populations de lymphocytes Th étudiées (Th1, Th2, Th17 et Treg) au niveau de la moelle épinière, du colon et de l'iléon des animaux. De plus, nous n'avions pas eu accès au signal MAdCAM-1 en IRM chez les animaux utilisés dans cette étude. Néanmoins, le faible nombre d'animaux utilisés pour cette étude (n=3) ne permet pas d'obtenir une représentation statistiquement satisfaisante, d'autant que les animaux MAdCAM-1^{high} aux temps étudiés ne représentent qu'environ 1/3 de la population générale. Cependant, nos résultats semblent montrer une certaine diversité dans l'abondance des populations lymphocytaires B et Th dans l'iléon chez les animaux EAE comparativement aux animaux sham. L'augmentation du nombre d'animaux pour l'étude des populations lymphocytaires à ces temps pré-symptomatiques, ainsi que leur mise en relation avec les niveaux d'expression de MAdCAM-1, nous permettrait d'étayer davantage notre hypothèse quant à la rétention ou non des cellules immunitaires en lien avec l'expression de MAdCAM-1.

II.3. Le niveau d'expression de MAdCAM-1 pendant la phase de rémission d'une EAE-PLP conditionne l'évolution subséquente des symptômes moteurs.

Au regard de nos précédentes observations faites dans l'EAE-MOG quant au retard d'apparition des symptômes moteurs chez les animaux présentant une plus grande expression de MAdCAM-1 à la fin de la période pré-symptomatique, nous avons souhaité savoir si une telle hétérogénéité d'expression de MAdCAM-1 était également retrouvée pendant la phase de rémission d'une EAE-PLP et si, le cas échéant, celle-ci pouvait avoir une conséquence quant à la survenue des poussées par la suite. Nous avons ainsi été capables de distinguer deux populations d'animaux en fonction du signal MAdCAM-1 obtenu par IRM pendant la phase de rémission des symptômes moteurs. En effet, certains animaux présentaient des niveaux d'expression de MAdCAM-1 relativement faibles (MAdCAM-1^{low}) et d'autres montraient inversement des niveaux plus élevés (MAdCAM-1^{high}). Cependant, contrairement aux observations faites dans le modèle EAE-MOG, ce niveau d'expression de MAdCAM-1 n'influçait ni le délai d'apparition des rechutes par la suite, ni leur incidence. Nous avons néanmoins mis en évidence des différences entre animaux MAdCAM-1^{low} et animaux MAdCAM-1^{high} dans la cinétique des poussées. En effet, alors que l'ensemble des animaux MAdCAM-1^{high} montraient une évolution

récurrente-rémittente des symptômes, 45.8% des animaux MAdCAM-1^{low} avaient montré une conversion vers une EAE secondairement progressive (SP-EAE). De plus, les scores cliniques maximaux atteints pendant la première rechute chez les animaux MAdCAM-1^{high} étaient significativement inférieurs à ceux observés chez les animaux MAdCAM-1^{low}. Ainsi, une forte expression de MAdCAM-1 pendant la phase de rémission d'une EAE-PLP semble promouvoir une diminution de la sévérité des symptômes et une évolution récurrente-rémittente de ceux-ci. De manière étonnante, nous avons pu mettre en évidence que des souris de la souche C57BL/6J immunisées contre le peptide MOG₃₅₋₅₅ et prétraitées avec du DSS étaient plus à même de présenter une évolution biphasique de leurs symptômes moteurs que leurs homologues contrôles (42.9% vs 7.7%).

De plus, notre étude du niveau d'expression de MAdCAM-1 pendant la première poussée de l'EAE-PLP semble dégager deux profils distincts d'expression dès la phase de récupération des symptômes moteurs. En effet, au score clinique 2r, deux populations semblent se dessiner, à savoir une population d'animaux présentant de forts signaux MAdCAM-1 à l'IRM et une population voyant son expression diminuer avec le score clinique. Ainsi, les animaux MAdCAM-1^{low} verraient leur expression de MAdCAM-1 diminuer au cours de la récupération pour devenir minimale pendant la phase de rémission tandis que les animaux MAdCAM-1^{high} verraient son expression se maintenir à un niveau élevé. Le maintien de cette inflammation intestinale pourrait alors être à l'origine d'un changement dans la balance pro/anti-inflammatoire conduisant vers une évolution récurrente-rémittente des symptômes, notamment par l'intermédiaire de l'induction d'une tolérance immunitaire. En effet, une étude a mis en avant le caractère nécessaire de l'expression de MAdCAM-1 dans l'induction d'une tolérance immunitaire dans un modèle d'EAE (Cassani *et al.*, 2011). Alors que l'introduction par voie orale du peptide MOG₃₅₋₅₅ chez des animaux précédemment immunisés contre celui-ci induisait une tolérance immunitaire, l'administration conjointe d'anticorps monoclonaux dirigés contre MAdCAM-1 inhibait cet effet. Une telle tolérance immunitaire est en particulier médiée par l'induction de lymphocytes Treg. De manière intéressante, ces populations Treg ont montré un rôle primordial dans l'occurrence des rémissions d'une EAE-PLP (Gärtner *et al.*, 2006). De fait, les auteurs de cette étude ont mis en évidence qu'une déplétion en Treg empêche les phases de rémission, conduisant à la mise en place d'une SP-EAE. De plus, certains

auteurs ont montré que certaines bactéries commensales du tractus intestinal, telles que des bactéries des genres *Clostridium* et *Bacteroides*, et certains métabolites microbiens, tels que les acides gras à chaîne courte, étaient en mesure d'induire un phénotype régulateur à des lymphocytes T (Atarashi *et al.*, 2013 ; Arpaia *et al.*, 2013 ; Smith *et al.*, 2013 ; Miyake *et al.*, 2015). Ainsi, nous émettons l'hypothèse selon laquelle une inflammation intestinale persistante entraînerait des modifications structurelles durables du tissu intestinal, telle qu'une ouverture de la barrière intestinale, conduisant au développement d'une tolérance immunitaire croisée entre microorganismes commensaux de la lumière intestinale et antigènes de la gaine de myéline. Des données préliminaires obtenues par microscope STED (STimulated-Emission-Depletion) semblent de plus indiquer qu'une telle ouverture de la barrière intestinale se produise, tout particulièrement à un stade de la pathologie où l'expression de MAdCAM-1 est maximale (cs 4 ; Figure 51). Inversement, les animaux voyant leur niveau d'expression de MAdCAM-1 diminuer seraient moins à même de développer cette tolérance et par conséquent plus à risque de convertir vers une forme secondairement progressive. Cette hypothèse se trouve de plus être en adéquation avec les résultats de Cassani et ses collaborateurs mettant en évidence la nécessité d'une expression de MAdCAM-1 pour l'induction d'une tolérance immunitaire (Cassani *et al.*, 2011).

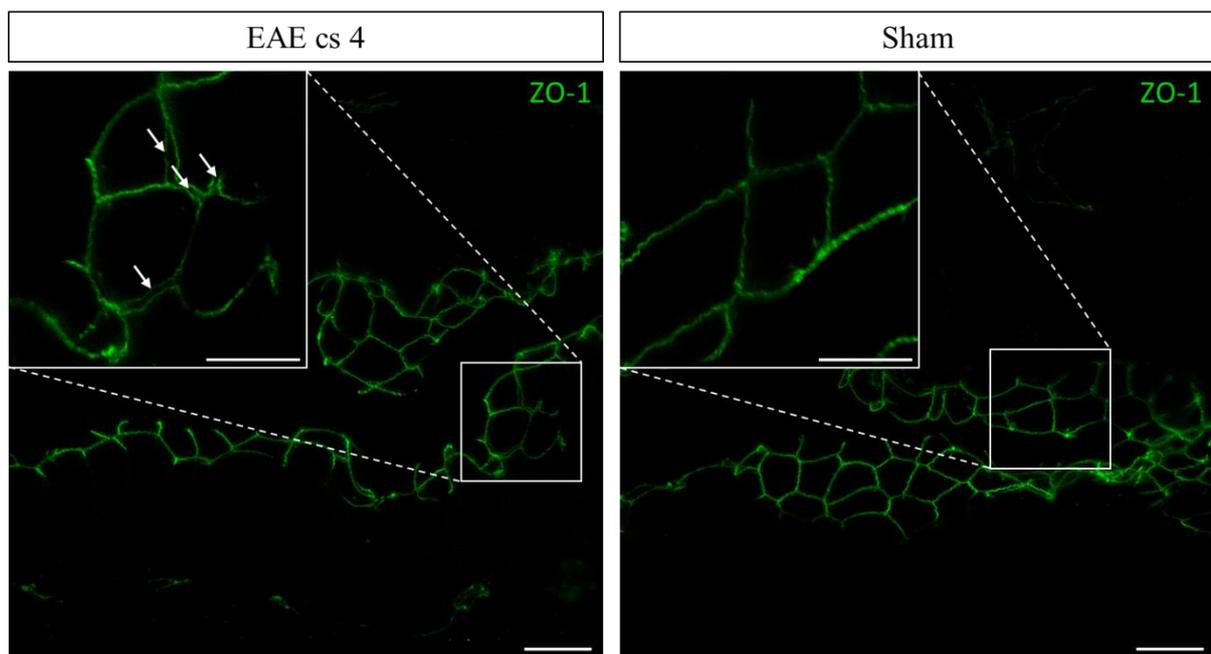


Figure 51 : Images en immunohistofluorescence de la protéine ZO-1 obtenues par microscopie STED chez une souris EAE-MOG au score clinique 4 (cs4) et une souris contrôle (sham). Les flèches pointent les zones où la barrière intestinale apparaît altérée. Les barres d'échelles correspondent à 2 μ m.

Cette hypothèse d'un lien entre tolérance induite par le microbiote intestinal et type d'évolution de la pathologie est confortée par une étude s'étant intéressée à comparer les microbiotes intestinaux des deux principales souches murines utilisées pour l'induction d'EAE, à savoir les souches C57BL/6J et SJL/J (Gandy *et al.*, 2019). Les auteurs de cette étude ont en effet pu mettre une évidence une augmentation des populations Treg chez les animaux RR-EAE (SJL/J) contrairement aux animaux PP-EAE (C57BL/6J). De telles différences dans les populations Treg étaient de plus associées à une plus grande représentation de souches microbiennes à même d'induire une tolérance immunitaire telles que des bactéries du genre *Clostridium* chez les souris RR-EAE et inversement, une plus grande représentation de souches décrites comme promouvant les phénotypes pro-inflammatoires Th1 et Th17 telles qu'*Akkermansia muciniphila* chez les souris PP-EAE (Gandy *et al.*, 2019).

Bien que ces travaux semblent mettre en évidence un lien entre inflammation intestinale et évolution récurrente-rémittente des symptômes moteurs dans l'EAE, de nombreuses autres investigations apparaissent nécessaires pour mieux appréhender les mécanismes sous-jacents impliqués. Notamment, la nécessité de maintenir les animaux vivants afin de suivre l'évolution des scores cliniques ne nous a pas permis d'évaluer les éventuelles modifications des populations lymphocytaires, notamment régulatrices, en lien avec le niveau d'expression de MAdCAM-1. De plus, nous n'avons pu évaluer l'expression de MAdCAM-1 que de manière ponctuelle et, qui plus est, sur des animaux différents. Ainsi, une étude longitudinale en IRM du signal MAdCAM-1 permettrait de confirmer l'installation d'une inflammation intestinale chronique chez les animaux MAdCAM-1^{high} à l'origine du développement d'une tolérance immunitaire. Enfin, des investigations plus poussées de l'intégrité de la barrière intestinale chez les animaux MAdCAM-1^{high} et MAdCAM-1^{low} en lien avec l'étude des populations lymphocytaires Treg intestinales permettraient de confronter notre hypothèse d'une évolution récurrente-rémittente des symptômes induite par l'installation chronique d'une inflammation intestinale.

Globalement, l'expression de la protéine MAdCAM-1, à laquelle nous sommes en mesure d'accéder de manière non-invasive, apparaît étroitement liée à la physiopathologie de l'EAE. Cependant, il s'avère que la cinétique de son expression puisse différenciellement influencer l'évolution des symptômes. En

effet, alors qu'une augmentation de son expression aux premiers jours d'une EAE a été associée à la mise en place des déficits moteurs, notamment en promouvant une réactivation intestinale de lymphocytes auto-réactifs, un maintien de son expression semble à l'inverse promouvoir le développement d'une tolérance immunitaire à l'origine d'une évolution récurrente-rémittente des symptômes.

III. Stress, inflammation intestinale et EAE.

Dans les travaux présentés précédemment, nous avons mis en évidence un effet délétère d'un stress aigu répété dans l'occurrence des rechutes dans un modèle murin de RR-SEP. Ses effets délétères du stress aigu pourraient être au moins en partie imputables à l'ouverture de la barrière intestinale. En effet, le paradigme de stress que nous avons utilisé (WAS) a été décrit par la littérature scientifique comme modifiant l'intégrité de la barrière intestinale *via* des modifications d'expression de certaines protéines constitutives des jonctions serrées telle que ZO-1 (Cameron et Perdue, 2005 ; Vanhaecke *et al.*, 2016). De plus, d'autres auteurs ont mis en évidence une augmentation de la perméabilité intestinale pendant la phase pré-symptomatique d'une EAE-MOG, en association avec une augmentation des populations lymphocytaires Th17 au niveau de la *lamina propria*, des plaques de Peyer et des nœuds lymphatiques mésentériques (Nouri *et al.*, 2014). Les auteurs avaient également pu mettre en évidence une augmentation de l'expression de la zonuline (une protéine impliquée dans le désassemblage des jonctions serrées ; Fasano *et al.*, 2011). D'autres études ont également pu mettre en évidence une augmentation de la perméabilité intestinale chez des patients atteints de SEP. Parmi elles, une étude publiée par Buscarinu et ses collaborateurs a montré une augmentation de la perméabilité intestinale chez des patients atteints de RR-SEP, sans pour autant pouvoir l'associer à une activité de la pathologie (Buscarinu *et al.*, 2017). Néanmoins, d'autres auteurs ont mis en évidence une altération de la barrière intestinale par l'intermédiaire d'une augmentation des concentrations plasmatiques de zonuline chez des patients SEP ayant été confronté à de nouvelles activités de la pathologie durant l'année précédente (Camara-Lemarro *et al.*, 2020). Ainsi, il semble que les phases actives de la pathologie puissent être associées à une augmentation de la perméabilité intestinale.

La perte soudaine d'intégrité de la barrière intestinale induite par le stress autoriserait une présentation accrue d'antigènes provenant du microbiote intestinal aux cellules immunitaires résidant dans le tissu intestinal et favoriserait l'emballement de la réaction auto-immune par mimétisme moléculaire (Ilchmann-Diounou et Menard, 2020). En effet, certaines études ont montré qu'une perméabilité intestinale élevée chez des patients atteints de la maladie de Crohn était associée à une augmentation du risque de rechutes de la pathologie (Wyatt *et al.*, 1993 ; D'Incà *et al.*, 1999). Nous avons ainsi souhaité savoir si le stress pouvait également induire une augmentation de l'expression de MAdCAM-1. Pour ce faire, nous avons effectué des IRM moléculaires dirigées contre MAdCAM-1 chez des animaux stressés au lendemain de la fin du protocole de WAS et chez des animaux contrôles. Cependant, nous n'avons pas été en mesure d'observer de différences significatives dans le signal obtenu à l'IRM entre animaux stressés et animaux contrôles, bien qu'une tendance à l'augmentation de l'expression de MAdCAM-1 induite par le stress semble apparaître (Figure 52). D'autres investigations seraient nécessaires pour confirmer cette augmentation de l'expression de MAdCAM-1 induite par le stress.

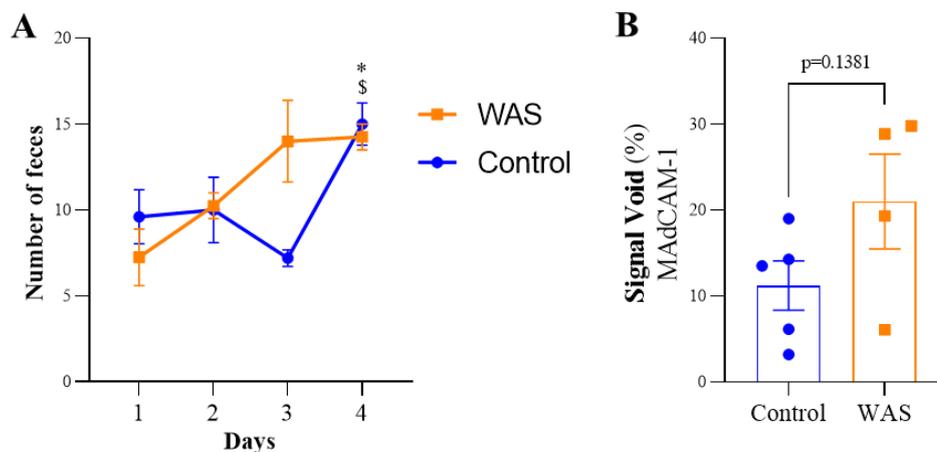


Figure 52 : Effets d'un stress aigu répété (WAS) sur l'expression de la protéine MAdCAM-1. (A) Quantité de fèces émises par les souris soumises au WAS et les souris contrôles comme indice d'une augmentation de la motilité colique induite par le stress (* $P < 0.05$: WAS jour 4 vs WAS jour 1 ; $\$P < 0.05$: Control jour 4 vs Control jour 3 ; Two-way ANOVA + comparaison multiple de Bonferroni). (B) Quantification des signaux MAdCAM-1 en IRM au lendemain du dernier jour de WAS ou du dernier jour en condition contrôle (t-test). WAS : Water Avoidance Stress.

Par conséquent, l'augmentation de la perméabilité intestinale couplée à une augmentation de l'expression de MAdCAM-1, autorisant de ce fait une plus grande extravasation des cellules immunitaires vers la *lamina propria* et les GALT, pourrait expliquer en partie les effets délétères d'évènements stressants dans la SEP et ses modèles animaux.

CONCLUSION

CONCLUSION

Les travaux présentés dans ce manuscrit ont dans un premier temps permis de mettre en évidence les effets délétères d'un stress aigu répété sur l'occurrence des rechutes dans un modèle murin de RR-SEP. A l'inverse, un milieu de vie autorisant de plus grandes activités motrices, sensibles, cognitives et sociales (enrichissement environnemental) montre une réduction flagrante de la sévérité de la maladie, et contrecarre les effets délétères du stress.

Dans un second temps, nous avons été en mesure d'appuyer l'hypothèse d'une implication du tractus intestinal dans la physiopathologie de la SEP. En effet, l'imagerie par résonance magnétique dirigée contre la protéine MAdCAM-1 nous a permis d'évaluer l'inflammation intestinale à différents temps de la pathologie et dans les deux principaux modèles murins de SEP (EAE-MOG et EAE-PLP). Cependant, nos résultats semblent indiquer des implications différentes d'une telle inflammation intestinale en fonction de la temporalité des événements observés. En effet, alors qu'une augmentation de l'expression de MAdCAM-1 dans les premiers jours de ces modèles semble être impliquée dans la mise en place de la réaction auto-immune, le maintien d'une inflammation intestinale élevée par la suite pourrait être à l'origine de l'apparition d'une tolérance immunitaire et conduire à des formes récurrente-rémittentes de la pathologie. Inversement, il semble qu'une diminution de l'expression de MAdCAM-1 soit associée à un plus grand risque de conversion vers une forme secondairement progressive. D'autres investigations s'avèrent alors nécessaires pour mieux comprendre la cinétique de l'inflammation intestinale au cours de la pathologie et son impact sur l'évolution de celle-ci.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

A

- Agland S, Lydon A, Shaw S, Lea R, Mortimer-Jones S, Lechner-Scott J. 2018. Can a stress management programme reduce stress and improve quality of life in people diagnosed with multiple sclerosis? *Mult Scler J Exp Transl Clin.* **4**: 2055217318813179.
- Agustí A, García-Pardo MP, López-Almela I, Campillo I, Maes M, Romani-Pérez M, Sanz Y. 2018. Interplay Between the Gut-Brain Axis, Obesity and Cognitive Function. *Front Neurosci.* **12**: 155.
- Ahmed S, Macfarlane GT, Fite A, McBain AJ, Gilbert P, Macfarlane S. 2007. Mucosa-associated bacterial diversity in relation to human terminal ileum and colonic biopsy samples. *Appl Environ Microbiol.* **73**: 7435-7442.
- Akira S, Hirano T, Taga T, Kishimoto T. 1990. Biology of multifunctional cytokines: IL 6 and related molecules (IL 1 and TNF). *FASEB J.* **4**: 2860-2867.
- Alfredsson L, Olsson T. 2019. Lifestyle and Environmental Factors in Multiple Sclerosis. *Cold Spring Harb Perspect Med.* **9**: a028944.
- Allam-Ndoul B, Castonguay-Paradis S, Veilleux A. 2020. Gut Microbiota and Intestinal Trans-Epithelial Permeability. *Int J Mol Sci.* **21**: 6402.
- Amor S, Groome N, Linington C, Morris MM, Dornmair K, Gardinier MV, Matthieu JM, Baker D. 1994. Identification of epitopes of myelin oligodendrocyte glycoprotein for the induction of experimental allergic encephalomyelitis in SJL and Biozzi AB/H mice. *J Immunol.* **153**: 4349-4356.
- Antel JP, Bania MB, Reder A, Cashman N. 1986. Activated suppressor cell dysfunction in progressive multiple sclerosis. *J Immunol.* **137**: 137-141.

- Armario A, Montero JL, Balasch J. 1986. Sensitivity of corticosterone and some metabolic variables to graded levels of low intensity stresses in adult male rats. *Physiol Behav.* **37**: 559-61.
- Arpaia N, Campbell C, Fan X, Dikiy S, van der Veecken J, deRoos P, Liu H, Cross JR, Pfeffer K, Coffey PJ, Rudensky AY. 2013. Metabolites produced by commensal bacteria promote peripheral regulatory T-cell generation. *Nature.* **504**: 451-5.
- Ascherio A, Munger KL, Lennette ET, Spiegelman D, Hernán MA, Olek MJ, Hankinson SE, Hunter DJ. 2001. Epstein-Barr virus antibodies and risk of multiple sclerosis: a prospective study. *JAMA.* **286**: 3083-3088.
- Ascherio A, Munger KL, White R, Köchert K, Simon KC, Polman CH, Freedman MS, Hartung HP, Miller DH, Montalbán X, Edan G, Barkhof F, Pleimes D, Radü EW, Sandbrink R, Kappos L, Pohl C. 2014. Vitamin D as an early predictor of multiple sclerosis activity and progression. *JAMA Neurol.* **71**: 306-314.
- Ascherio A, Munger KL. 2007. Environmental risk factors for multiple sclerosis. Part I: the role of infection. *Ann Neurol.* **61**: 288-299.
- Ascherio A, Munger KL. 2015. EBV and Autoimmunity. *Curr Top Microbiol Immunol.* **390**: 365-385.
- Atarashi K, Tanoue T, Oshima K, Suda W, Nagano Y, Nishikawa H, Fukuda S, Saito T, Narushima S, Hase K, Kim S, Fritz JV, Wilmes P, Ueha S, Matsushima K, Ohno H, Olle B, Sakaguchi S, Taniguchi T, Morita H, Hattori M, Honda K. 2013. Treg induction by a rationally selected mixture of Clostridia strains from the human microbiota. *Nature.* **500**: 232-236.
- Aubé B, Lévesque SA, Paré A, Chamma É, Kébir H, Gorina R, Lécuyer MA, Alvarez JI, De Koninck Y, Engelhardt B, Prat A, Côté D, Lacroix S. 2014. Neutrophils mediate blood-spinal cord barrier disruption in demyelinating neuroinflammatory diseases. *J Immunol.* **193**: 2438-2454.
- Avitsur R, Stark JL, Sheridan JF. 2001. Social stress induces glucocorticoid resistance in subordinate animals. *Horm Behav.* **39**: 247-257.

B

- Bäärnhielm M, Hedström AK, Kockum I, Sundqvist E, Gustafsson SA, Hillert J, Olsson T, Alfredsson L. 2012. Sunlight is associated with decreased multiple sclerosis risk: no interaction with human leukocyte antigen-DRB1*15. *Eur J Neurol.* **19**: 955-962.
- Bäärnhielm M, Olsson T, Alfredsson L. 2014. Fatty fish intake is associated with decreased occurrence of multiple sclerosis. *Mult Scler.* **20**: 726-732.
- Baecher-Allan C, Kaskow BJ, Weiner HL. 2018. Multiple Sclerosis: Mechanisms and Immunotherapy. *Neuron.* **97**: 742-768.
- Bailey SL, Schreiner B, McMahon EJ, Miller SD. 2007. CNS myeloid DCs presenting endogenous myelin peptides 'preferentially' polarize CD4+ T(H)-17 cells in relapsing EAE. *Nat Immunol.* **8**: 172-180.
- Barnett MH, Prineas JW. 2004 Relapsing and remitting multiple sclerosis: pathology of the newly forming lesion. *Ann Neurol.* **55**: 458-468.
- Bar-Or A, Fawaz L, Fan B, Darlington PJ, Rieger A, Ghorayeb C, Calabresi PA, Waubant E, Hauser SL, Zhang J, Smith CH. 2010. Abnormal B-cell cytokine responses a trigger of T-cell-mediated disease in MS?. *Ann Neurol.* **67**: 452-461.
- Barrat FJ, Cua DJ, Boonstra A, Richards DF, Crain C, Savelkoul HF, de Waal-Malefyt R, Coffman RL, Hawrylowicz CM, O'Garra A. 2002. In vitro generation of interleukin 10-producing regulatory CD4(+) T cells is induced by immunosuppressive drugs and inhibited by T helper type 1 (Th1)- and Th2-inducing cytokines. *J Exp Med.* **195**: 603-616.
- Barreau F, Ferrier L, Fioramonti J, Bueno L. 2004. Neonatal maternal deprivation triggers long term alterations in colonic epithelial barrier and mucosal immunity in rats. *Gut.* **53**: 501-506.

- Barzegar M, Najdaghi S, Afshari-Safavi A, Nehzat N, Mirmosayyeb O, Shaygannejad V. 2021. Early predictors of conversion to secondary progressive multiple sclerosis. *Mult Scler Relat Disord.* **54**: 103-115.
- Baughman EJ, Mendoza JP, Ortega SB, Ayers CL, Greenberg BM, Frohman EM, Karandikar NJ. 2011. Neuroantigen-specific CD8⁺ regulatory T-cell function is deficient during acute exacerbation of multiple sclerosis. *J Autoimmun.* **36**: 115-124.
- Beaugeri L, Sokol H. 2014. Les fondamentaux de la pathologie digestive. *CDU-HE / Editions Elsevier-Masson.*
- Becklund BR, Severson KS, Vang SV, DeLuca HF. 2010. UV radiation suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis independent of vitamin D production. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **107**: 6418-6423.
- Belz EE, Kennell JS, Czambel RK, Rubin RT, Rhodes ME. 2003. Environmental enrichment lowers stress-responsive hormones in singly housed male and female rats. *Pharmacol Biochem Behav.* **76**: 481-486.
- Benaroya-Milshtein N, Hollander N, Apter A, Kukulansky T, Raz N, Wilf A, Yaniv I, Pick CG. 2004. Environmental enrichment in mice decreases anxiety, attenuates stress responses and enhances natural killer cell activity. *Eur J Neurosci.* **20**: 1341-1347.
- Bennett JL, Blanchet MR, Zhao L, Zbytnuik L, Antignano F, Gold M, Kubes P, McNagny KM. 2009. Bone marrow-derived mast cells accumulate in the central nervous system during inflammation but are dispensable for experimental autoimmune encephalomyelitis pathogenesis. *J Immunol.* **182**: 5507-55144.
- Berer K, Gerdes LA, Cekanaviciute E, Jia X, Xiao L, Xia Z, Liu C, Klotz L, Stauffer U, Baranzini SE, Kämpfel T, Hohlfeld R, Krishnamoorthy G, Wekerle H. 2017. Gut microbiota from multiple

- sclerosis patients enables spontaneous autoimmune encephalomyelitis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **114**: 10719-10724.
- Berger C, Gremlich HU, Schmidt P, Cannet C, Kneuer R, Hiestand P, Rausch M, Rudin M. 2007. In vivo monitoring the fate of Cy5.5-Tat labeled T lymphocytes by quantitative near-infrared fluorescence imaging during acute brain inflammation in a rat model of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol Methods.* **323**: 65-77.
- Berlin C, Berg EL, Briskin MJ, Andrew DP, Kilshaw PJ, Holzmann B, Weissman IL, Hamann A, Butcher EC. 1993. Alpha 4 beta 7 integrin mediates lymphocyte binding to the mucosal vascular addressin MAdCAM-1. *Cell.* **74**: 185-195.
- Bernards N, Pottier G, Thézé B, Dollé F, Boisgard R. 2015. In vivo evaluation of inflammatory bowel disease with the aid of μ PET and the translocator protein 18 kDa radioligand [18F]DPA-714. *Mol Imaging Biol.* **17**: 67-75.
- Berthoud HR. 2008. Vagal and hormonal gut-brain communication: from satiation to satisfaction. *Neurogastroenterol Motil.* **Suppl 1**: 64-72.
- Bettelli E, Pagany M, Weiner HL, Linington C, Sobel RA, Kuchroo VK. 2003. Myelin oligodendrocyte glycoprotein-specific T cell receptor transgenic mice develop spontaneous autoimmune optic neuritis. *J Exp Med.* **197**: 1073-1081.
- Bischoff SC, Barbara G, Buurman W, Ockhuizen T, Schulzke JD, Serino M, Tilg H, Watson A, Wells JM. 2014. Intestinal permeability--a new target for disease prevention and therapy. *BMC Gastroenterol.* **14**: 189.
- Bitsch A, Kuhlmann T, Da Costa C, Bunkowski S, Polak T, Brück W. 2000. Tumour necrosis factor alpha mRNA expression in early multiple sclerosis lesions: correlation with demyelinating activity and oligodendrocyte pathology. *Glia.* **29**: 366-375.

- Bjarnadóttir K, Benkhoucha M, Merkler D, Weber MS, Payne NL, Bernard CCA, Molnarfi N, Lalive PH. 2016. B cell-derived transforming growth factor- β 1 expression limits the induction phase of autoimmune neuroinflammation. *Sci Rep.* **6**: 34594.
- Bjornevik K, Cortese M, Healy BC, Kuhle J, Mina MJ, Leng Y, Elledge SJ, Niebuhr DW, Scher AI, Munger KL, Ascherio A. 2022. Longitudinal analysis reveals high prevalence of Epstein-Barr virus associated with multiple sclerosis. *Science.* **375**: 296-301.
- Boismenu R, Havran WL. 1994. Modulation of epithelial cell growth by intraepithelial gamma delta T cells. *Science.* **266** : 1253-1255.
- Bonfiglio T, Olivero G, Vergassola M, Di Cesare Mannelli L, Pacini A, Iannuzzi F, Summa M, Bertorelli R, Feligioni M, Ghelardini C, Pittaluga A. 2019. Environmental training is beneficial to clinical symptoms and cortical presynaptic defects in mice suffering from experimental autoimmune encephalomyelitis. *Neuropharmacology.* **145**: 75-56.
- Brandtzaeg P, Carlsen H, Farstad IN. 2005. Mucosal Immunology. *Academic Press.* 3rd edition (eds Mestecky, J. et al.). 617–665.
- Brandtzaeg P, Johansen FE. 2005. Mucosal B cells: phenotypic characteristics, transcriptional regulation, and homing properties. *Immunol Rev.* **206**: 32-63.
- Breuer J, Schwab N, Schneider-Hohendorf T, Marziniak M, Mohan H, Bhatia U, Gross CC, Clausen BE, Weishaupt C, Luger TA, Meuth SG, Loser K, Wiendl H. 2014. Ultraviolet B light attenuates the systemic immune response in central nervous system autoimmunity. *Ann Neurol.* **75**: 739-758.
- Burns MN, Nawacki E, Kwasny MJ, Pelletier D, Mohr DC. 2014/ Do positive or negative stressful events predict the development of new brain lesions in people with multiple sclerosis? *Psychol Med.* **44**: 349-359.
- Buscarinu MC, Cerasoli B, Annibali V, Policano C, Lionetto L, Capi M, Mechelli R, Romano S, Fornasiero A, Mattei G, Piras E, Angelini DF, Battistini L, Simmaco M, Umeton R, Salvetti M,

Ristori G. 2017. Altered intestinal permeability in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis: A pilot study. *Mult Scler.* **23**: 442-446.

C

Cahn BR, Polich J. 2006. Meditation states and traits: EEG, ERP, and neuroimaging studies. *Psychol Bull.* **132**: 180-211.

Camara-Lemarroy CR, Silva C, Greenfield J, Liu WQ, Metz LM, Yong VW. 2020. Biomarkers of intestinal barrier function in multiple sclerosis are associated with disease activity. *Mult Scler.* **26**: 1340-1350.

Cameron HL, Perdue MH. 2005. Stress impairs murine intestinal barrier function: improvement by glucagon-like peptide-2. *J Pharmacol Exp Ther.* **314**: 214-220.

Campbell N, Reece, J, Faucher J. 2012. Biologie, Montreuil. 9^e édition. *Pearson Education*.

Capaldo CT, Powell DN, Kalman D. 2017. Layered defense: how mucus and tight junctions seal the intestinal barrier. *J Mol Med (Berl).* **95**: 927-934.

Carabotti M, Scirocco A, Maselli MA, Severi C. 2015. The gut-brain axis: interactions between enteric microbiota, central and enteric nervous systems. *Ann Gastroenterol.* **28**: 203-209.

Cassani B, Villablanca EJ, Quintana FJ, Love PE, Lacy-Hulbert A, Blaner WS, Sparwasser T, Snapper SB, Weiner HL, Mora JR. 2011. Gut-tropic T cells that express integrin $\alpha 4\beta 7$ and CCR9 are required for induction of oral immune tolerance in mice. *Gastroenterology.* **141**: 2109-18.

Cencioni MT, Mattosio M, Magliozzi R, Bar-Or A, Muraro PA. 2021. B cells in multiple sclerosis - from targeted depletion to immune reconstitution therapies. *Nat Rev Neurol.* **17**: 399-414.

Chandler N, Jacobson S, Esposito P, Connolly R, Theoharides TC. 2002. Acute stress shortens the time to onset of experimental allergic encephalomyelitis in SJL/J mice. *Brain Behav Immun.* **16**: 757-763.

- Charcot JM. 1877. Leçons sur les maladies du système nerveux v. 1. *Delahaye et Lecrosnier*. Vol. 1.
- Chen Y, Chou K, Fuchs E, Havran WL, Boismenu R. 2002. Protection of the intestinal mucosa by intraepithelial gamma delta T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **99**: 14338-14343.
- Chieppa M, Rescigno M, Huang AY, Germain RN. 2006. Dynamic imaging of dendritic cell extension into the small bowel lumen in response to epithelial cell TLR engagement. *J Exp Med*. **203**: 2841-2852.
- Chow EY, Ho FC. 1988. Age-related changes in the morphology and immunophenotype of spontaneous lymphomas of SJL/N mice. *J Pathol*. **156**: 331-9.
- Christy AL, Brown MA. 2007. The multitasking mast cell: positive and negative roles in the progression of autoimmunity. *J Immunol*. **179**: 2673-2679.
- Christy AL, Walker ME, Hessner MJ, Brown MA. 2013. Mast cell activation and neutrophil recruitment promotes early and robust inflammation in the meninges in EAE. *J Autoimmun*. **42**: 50-61.
- Chrousos GP. 1995. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis and immune-mediated inflammation. *N Engl J Med*. **332**: 1351-1362.
- Chrousos GP. 2009. Stress and disorders of the stress system. *Nat Rev Endocrinol*. **5**: 374-381.
- Cirulli F, Pistillo L, de Acetis L, Alleva E, Aloe L. 1998. Increased number of mast cells in the central nervous system of adult male mice following chronic subordination stress. *Brain Behav Immun*. **12**: 123-133.
- Comabella M, Montalban X, Münz C, Lünemann JD. 2010. Targeting dendritic cells to treat multiple sclerosis. *Nat Rev Neurol*. **6**: 499-507.
- Compston A, Coles A. 2008. Multiple sclerosis. *Lancet*. **372**: 1502-1517.

- Connor EM, Eppihimer MJ, Morise Z, Granger DN, Grisham MB. 1999. Expression of mucosal addressin cell adhesion molecule-1 (MAdCAM-1) in acute and chronic inflammation. *J Leukoc Biol.* **65**: 349-55.
- Connor JR, Wang EC, Diamond MC. 1982. Increased length of terminal dendritic segments in old adult rats' somatosensory cortex: an environmentally induced response. *Exp Neurol.* **78**: 466-470.
- Correa SG, Rodriguez-Galán MC, Rivero VE, Riera CM. 1998/ Chronic varied stress modulates experimental autoimmune encephalomyelitis in Wistar rats. *Brain Behav Immun.* **12**: 134-148.
- Correale J, Villa A. 2008. Isolation and characterization of CD8+ regulatory T cells in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* **195**: 121-134.
- Corripio-Miyar Y, Hayward A, Lemon H, Sweeny AR, Bal X, Kenyon F, Pilkington JG, Pemberton JM, Nussey DH, McNeilly TN. 2022. Functionally distinct T-helper cell phenotypes predict resistance to different types of parasites in a wild mammal. *Sci Rep.* **12**: 3197.
- Cortese A, Lova L, Comoli P, Volpe E, Villa S, Mallucci G, La Salvia S, Romani A, Franciotta D, Bollati V, Basso S, Guido I, Quartuccio G, Battistini L, Cereda C, Bergamaschi R. 2020. Air pollution as a contributor to the inflammatory activity of multiple sclerosis. *J Neuroinflammation.* **17**: 334.
- Cox LM, Maghzi AH, Liu S, Tankou SK, Dhang FH, Willocq V, Song A, Wasén C, Tauhid S, Chu R, Anderson MC, De Jager PL, Polgar-Turcsanyi M, Healy BC, Glanz BI, Bakshi R, Chitnis T, Weiner HL. 2021. Gut Microbiome in Progressive Multiple Sclerosis. *Ann Neurol.* **89**: 1195-1211.
- Crofton EJ, Zhang Y, Green TA. 2015. Inoculation stress hypothesis of environmental enrichment. *Neurosci Biobehav Rev.* **49**: 19-31.
- Cryan JF, O'Riordan KJ, Cowan CSM, Sandhu KV, Bastiaanssen TFS, Boehme M, Codagnone MG, Cussotto S, Fulling C, Golubeva AV, Guzzetta KE, Jaggar M, Long-Smith CM, Lyte JM, Martin JA, Molinero-Perez A, Moloney G, Morelli E, Morillas E, O'Connor R, Cruz-Pereira JS, Peterson VL,

Rea K, Ritz NL, Sherwin E, Spichak S, Teichman EM, van de Wouw M, Ventura-Silva AP, Wallace-Fitzsimons SE, Hyland N, Clarke G, Dinan TG. 2019. The Microbiota-Gut-Brain Axis. *Physiol Rev.* **99**: 1877-2013.

D

De Bondt M, Hellings N, Opdenakker G, Struyf S. 2020. Neutrophils: Underestimated Players in the Pathogenesis of Multiple Sclerosis (MS). *Int J Mol Sci.* **21**: 4558.

Dendrou CA, Fugger L, Friese MA. 2015. Immunopathology of multiple sclerosis. *Nat Rev Immunol.* **15**: 545-558.

Denning TL, Norris BA, Medina-Contreras O, Manicassamy S, Geem D, Madan R, Karp CL, Pulendran B. 2011. Functional specializations of intestinal dendritic cell and macrophage subsets that control Th17 and regulatory T cell responses are dependent on the T cell/APC ratio, source of mouse strain, and regional localization. *J Immunol.* **187**: 733-747.

DeRijk RH, Eskandari F, Sternberg EM. 2004. Corticosteroid resistance in a subpopulation of multiple sclerosis patients as measured by ex vivo dexamethasone inhibition of LPS induced IL-6 production. *J Neuroimmunol.* **151**: 180-188.

Diamond MC, Rosenzweig MR, Bennett EL, Lindner B, Lyon L. 1972. Effects of environmental enrichment and impoverishment on rat cerebral cortex. *J Neurobiol.* **3**: 47-64.

Diaz R, Miguel PM, Deniz BF, Confortim HD, Barbosa S, Mendonça MCP, da Cruz-Höfling MA, Pereira LO. 2016. Environmental enrichment attenuates the blood brain barrier dysfunction induced by the neonatal hypoxia-ischemia. *Int J Dev Neurosci.* **53**: 35-45.

Dimitrijević M, Laban O, von Hoersten S, Marković BM, Janković BD. 1994. Neonatal sound stress and development of experimental allergic encephalomyelitis in Lewis and DA rats. *Int J Neurosci.* **78**: 135-143.

- D'Inca R, Di Leo V, Corrao G, Martines D, D'Odorico A, Mestriner C, Venturi C, Longo G, Sturniolo GC. 1999. Intestinal permeability test as a predictor of clinical course in Crohn's disease. *Am J Gastroenterol.* **94**: 2956-60.
- Dobson R, Ramagopalan S, Davis A, Giovannoni G. 2013. Cerebrospinal fluid oligoclonal bands in multiple sclerosis and clinically isolated syndromes: a meta-analysis of prevalence, prognosis and effect of latitude. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* **84**: 909-914.
- Drake RL, Vogl AW, Mitchell AH, Duparc F, Duparc J. 2020. Gray's Anatomie - Le Manuel pour les étudiants. 4^e édition. *Elsevier Health Sciences.*
- Duc D, Vigne S, Bernier-Latmani J, Yersin Y, Ruiz F, Gaïa N, Leo S, Lazarevic V, Schrenzel J, Petrova TV, Pot C. 2019. Disrupting Myelin-Specific Th17 Cell Gut Homing Confers Protection in an Adoptive Transfer Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *Cell Rep.* **29**: 378-390.
- Duddy M, Niino M, Adatia F, Hebert S, Freedman M, Atkins H, Kim HJ, Bar-Or A. 2007. Distinct effector cytokine profiles of memory and naive human B cell subsets and implication in multiple sclerosis. *J Immunol.* **178**: 6092-6099.
- During MJ, Cao L. 2006. VEGF, a mediator of the effect of experience on hippocampal neurogenesis. *Curr Alzheimer Res.* **3**: 29-33.

E

- Esposito P, Chandler N, Kandere K, Basu S, Jacobson S, Connolly R, Tutor D, Theoharides TC. 2002. Corticotropin-releasing hormone and brain mast cells regulate blood-brain-barrier permeability induced by acute stress. *J Pharmacol Exp Ther.* **303**: 1061-1066.
- Esposito P, Gheorghe D, Kandere K, Pang X, Connolly R, Jacobson S, Theoharides TC. 2001. Acute stress increases permeability of the blood-brain-barrier through activation of brain mast cells. *Brain Res.* **888**: 117-127.

Eylar EH, Caccam J, Jackson JJ, Westall FC, Robinson AB. 1970. Experimental allergic encephalomyelitis: synthesis of disease-inducing site of the basic protein. *Science*. **168**: 1220-1223.

F

Faherty CJ, Kerley D, Smeyne RJ. 2003. A Golgi-Cox morphological analysis of neuronal changes induced by environmental enrichment. *Brain Res Dev Brain Res*. **141**: 55-61.

Fasano A. 2011. Zonulin and its regulation of intestinal barrier function: the biological door to inflammation, autoimmunity, and cancer. *Physiol Rev*. **91**: 151-175.

Feagan BG, Rutgeerts P, Sands BE, Hanauer S, Colombel JF, Sandborn WJ, Van Assche G, Axler J, Kim HJ, Danese S, Fox I, Milch C, Sankoh S, Wyant T, Xu J, Parikh A; GEMINI 1 Study Group. 2013. Vedolizumab as induction and maintenance therapy for ulcerative colitis. *N Engl J Med*. **369**: 699-710.

Ferber IA, Brocke S, Taylor-Edwards C, Ridgway W, Dinisco C, Steinman L, Dalton D, Fathman CG. 1996. Mice with a disrupted IFN-gamma gene are susceptible to the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *J Immunol*. **156**: 5-7.

Filippi M, Rocca MA. 2011. MR imaging of multiple sclerosis. *Radiology*. **259**: 659-81.

Fischer MT, Sharma R, Lim JL, Haider L, Frischer JM, Drexhage J, Mahad D, Bradl M, van Horssen J, Lassmann H. 2012. NADPH oxidase expression in active multiple sclerosis lesions in relation to oxidative tissue damage and mitochondrial injury. *Brain*. **135**: 886-899.

Foster TC, Dumas TC. 2001. Mechanism for increased hippocampal synaptic strength following differential experience. *J Neurophysiol*. **85**: 1377-1383.

Fournier AP, Martinez de Lizarrondo S, Rateau A, Gerard-Brisou A, Waldner MJ, Neurath MF, Vivien D, Docagne F, Gauberti M. 2020. Ultrasensitive molecular imaging of intestinal mucosal

inflammation using leukocyte-mimicking particles targeted to MAdCAM-1 in mice. *Sci Transl Med.* **12:** eaaz4047.

Fournier AP, Quenault A, Martinez de Lizarrondo S, Gauberti M, 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. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **114:** 6116-6121.

Freund J, Stern ER, Pisani TM. 1947. Isoallergic encephalomyelitis and radiculitis in guinea pigs after one injection of brain and Mycobacteria in water-in-oil emulsion. *J Immunol.* **57:** 179-194.

Frühbeck G. 2004. The adipose tissue as a source of vasoactive factors. *Curr Med Chem Cardiovasc Hematol Agents.* **2:** 197-208.

G

Gandy KAO, Zhang J, Nagarkatti P, Nagarkatti M. 2019. The role of gut microbiota in shaping the relapse-remitting and chronic-progressive forms of multiple sclerosis in mouse models. *Sci Rep.* **9:** 6923.

Gärtner D, Hoff H, Gimsa U, Burmester GR, Brunner-Weinzierl MC. 2006. CD25 regulatory T cells determine secondary but not primary remission in EAE: impact on long-term disease progression. *J Neuroimmunol.* **172:** 73-84.

Gärtner K, Büttner D, Döhler K, Friedel R, Lindena J, Trautschold I. 1980. Stress response of rats to handling and experimental procedures. *Lab Anim.* **14:** 267-74.

Gauberti M, Montagne A, Marcos-Contreras OA, Le Béhot A, Maubert E, Vivien D. 2013. Ultra-sensitive molecular MRI of vascular cell adhesion molecule-1 reveals a dynamic inflammatory penumbra after strokes. *Stroke.* **44:** 1988-1996.

- Gerrard B, Singh V, Babenko O, Gauthier I, Wee Yong V, Kovalchuk I, Luczak A, Metz GAS. 2017. Chronic mild stress exacerbates severity of experimental autoimmune encephalomyelitis in association with altered non-coding RNA and metabolic biomarkers. *Neuroscience*. **359**: 299-307.
- Gersemann M, Becker S, Kübler I, Koslowski M, Wang G, Herrlinger KR, Griger J, Fritz P, Fellermann K, Schwab M, Wehkamp J, Stange EF. 2009. Differences in goblet cell differentiation between Crohn's disease and ulcerative colitis. *Differentiation*. **77**: 84-94.
- Golan D, Somer E, Dishon S, Cuzin-Disegni L, Miller A. 2008. Impact of exposure to war stress on exacerbations of multiple sclerosis. *Ann Neurol*. **64**: 143-148.
- Gold SM, Sasidhar MV, Lagishetty V, Spence RD, Umeda E, Ziehn MO, Krieger T, Schulz KH, Heesen C, Hewison M, Voskuhl RR. 2012. Dynamic development of glucocorticoid resistance during autoimmune neuroinflammation. *J Clin Endocrinol Metab*. **97**: E1402-1410.
- Goverman J, Woods A, Larson L, Weiner LP, Hood L, Zaller DM. 1993. Transgenic mice that express a myelin basic protein-specific T cell receptor develop spontaneous autoimmunity. *Cell*. **72**: 551-560.
- Greenough WT, Volkmar FR. 1973. Pattern of dendritic branching in occipital cortex of rats reared in complex environments. *Exp Neurol*. **40**: 491-504.
- Greenup AJ, Bressler B, Rosenfeld G. 2016. Medical Imaging in Small Bowel Crohn's Disease-Computer Tomography Enterography, Magnetic Resonance Enterography, and Ultrasound: "Which One Is the Best for What?". *Inflamm Bowel Dis*. **22**: 1246-1261.
- Gregory GD, Robbie-Ryan M, Secor VH, Sabatino JJ Jr, Brown MA. 2005. Mast cells are required for optimal autoreactive T cell responses in a murine model of multiple sclerosis. *Eur J Immunol*. **35**: 3478-3486.

H

- Hadis U, Wahl B, Schulz O, Hardtke-Wolenski M, Schippers A, Wagner N, Müller W, Sparwasser T, Förster R, Pabst O. 2011. Intestinal tolerance requires gut homing and expansion of FoxP3+ regulatory T cells in the lamina propria. *Immunity*. **34**: 237-246.
- Haemisch A, Guerra G, Furkert J. 1999. Adaptation of corticosterone-but not beta-endorphin-secretion to repeated blood sampling in rats. *Lab Anim*. **33**: 185-91.
- Hall SM. 1972. The effect of injections of lysophosphatidyl choline into white matter of the adult mouse spinal cord. *J Cell Sci*. **10**: 535-546.
- Hamann A, Andrew DP, Jablonski-Westrich D, Holzmann B, Butcher EC. 1994. Role of alpha 4-integrins in lymphocyte homing to mucosal tissues in vivo. *J Immunol*. **152**: 3282-3293.
- Handel AE, Williamson AJ, Disanto G, Handunnetthi L, Giovannoni G, Ramagopalan SV. 2010. An updated meta-analysis of risk of multiple sclerosis following infectious mononucleosis. *PLoS One*. **5**: e12496.
- Hapfelmeier S, Lawson MA, Slack E, Kirundi JK, Stoel M, Heikenwalder M, Cahenzli J, Velykoredko Y, Balmer ML, Endt K, Geuking MB, Curtiss R 3rd, McCoy KD, Macpherson AJ. 2010. Reversible microbial colonization of germ-free mice reveals the dynamics of IgA immune responses. *Science*. **328**: 1705-1709.
- Haran-Ghera N, Kotler M, Meshorer A. 1967. Studies on leukemia development in the SJL/J strain of mice. *J Natl Cancer Inst*. **39**: 653-61.
- Harkiolaki M, Holmes SL, Svendsen P, Gregersen JW, Jensen LT, McMahon R, Friese MA, van Boxel G, Etzensperger R, Tzartos JS, Kranc K, Sainsbury S, Harlos K, Mellins ED, Palace J, Esiri MM, van der Merwe PA, Jones EY, Fugger L. 2009. T cell-mediated autoimmune disease due to low-affinity crossreactivity to common microbial peptides. *Immunity*. **30**: 348-357.

- Hauser SL, Bhan AK, Gilles F, Kemp M, Kerr C, Weiner HL. 1986. Immunohistochemical analysis of the cellular infiltrate in multiple sclerosis lesions. *Ann Neurol.* **19**: 578-587.
- Ha-Vinh P, Nauleau S, Clementz M, Régnard P, Sauze L, Clavaud H. 2016. Geographic variations of multiple sclerosis prevalence in France: The latitude gradient is not uniform depending on the socioeconomic status of the studied population. *Mult Scler J Exp Transl Clin.* **2**: 2055217316631762.
- Hedström AK, Bäärnhielm M, Olsson T, Alfredsson L. 2009. Tobacco smoking, but not Swedish snuff use, increases the risk of multiple sclerosis. *Neurology.* **73**: 696-701.
- Hedström AK, Bäärnhielm M, Olsson T, Alfredsson L. 2011. Exposure to environmental tobacco smoke is associated with increased risk for multiple sclerosis. *Mult Scler.* **17**: 788-793.
- Hedström AK, Lima Bomfim I, Barcellos L, Gianfrancesco M, Schaefer C, Kockum I, Olsson T, Alfredsson L. 2014. Interaction between adolescent obesity and HLA risk genes in the etiology of multiple sclerosis. *Neurology.* **82**: 865-872.
- Heesen C, Gold SM, Huitinga I, Reul JM. 2007. Stress and hypothalamic-pituitary-adrenal axis function in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis - a review. *Psychoneuroendocrinology.* **32**: 604-618.
- Heim C, Ehlert U, Hellhammer DH. 2000. The potential role of hypocortisolism in the pathophysiology of stress-related bodily disorders. *Psychoneuroendocrinology.* **25**: 1-35.
- Hemmer B, Kerschensteiner M, Korn T. 2015. Role of the innate and adaptive immune responses in the course of multiple sclerosis. *Lancet Neurol.* **14**: 406-419.
- Henderson AP, Barnett MH, Parratt JD, Prineas JW. 2009. Multiple sclerosis: distribution of inflammatory cells in newly forming lesions. *Ann Neurol.* **66**: 739-753.

Hershberg RM, Cho DH, Youakim A, Bradley MB, Lee JS, Framson PE, Nepom GT. 1998. Highly polarized HLA class II antigen processing and presentation by human intestinal epithelial cells. *J Clin Invest.* **102**: 792-803.

Höftberger R, Aboul-Enein F, Brueck W, Lucchinetti C, Rodriguez M, Schmidbauer M, Jellinger K, Lassmann H. 2004. *Brain Pathol.* **14**: 43-50.

I

Ickes BR, Pham TM, Sanders LA, Albeck DS, Mohammed AH, Granholm AC. 2000. Long-term environmental enrichment leads to regional increases in neurotrophin levels in rat brain. *Exp Neurol.* **164**: 45-52.

Ilchmann-Diounou H, Menard S. 2020. Psychological Stress, Intestinal Barrier Dysfunctions, and Autoimmune Disorders: An Overview. *Front Immunol.* **11**: 1823.

International Multiple Sclerosis Genetics Consortium (IMSGC), Wellcome Trust Case Control Consortium 2 (WTCCC2), International IBD Genetics Consortium (IIBDGC). 2013. Analysis of immune-related loci identifies 48 new susceptibility variants for multiple sclerosis. *Nat Genet.* **45**: 1353-1360.

International Multiple Sclerosis Genetics Consortium (IMSGC). 2019. Multiple sclerosis genomic map implicates peripheral immune cells and microglia in susceptibility. *Science.* **365**: eaav7188.

Ivanov II, Frutos Rde L, Manel N, Yoshinaga K, Rifkin DB, Sartor RB, Finlay BB, Littman DR. 2008. Specific microbiota direct the differentiation of IL-17-producing T-helper cells in the mucosa of the small intestine. *Cell Host Microbe.* **4**: 337-349.

J

- Jadidi-Niaragh F, Mirshafiey A. 2011. Regulatory T-cell as orchestra leader in immunosuppression process of multiple sclerosis. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* **33**: 545-567.
- Jäger A, Dardalhon V, Sobel RA, Bettelli E, Kuchroo VK. 2009. Th1, Th17, and Th9 effector cells induce experimental autoimmune encephalomyelitis with different pathological phenotypes. *J Immunol.* **183**: 7169-7177.
- Jangi S, Gandhi R, Cox LM, Li N, von Glehn F, Yan R, Patel B, Mazzola MA, Liu S, Glanz BL, Cook S, Tankou S, Stuart F, Melo K, Nejad P, Smith K, Topçuoğlu BD, Holden J, Kivisäkk P, Chitnis T, De Jager PL, Quintana FJ, Gerber GK, Bry L, Weiner HL. 2016. Alterations of the human gut microbiome in multiple sclerosis. *Nat Commun.* **7**: 12015.
- Jelcic I, Al Nimer F, Wang J, Lentsch V, Planas R, Jelcic I, Madjovski A, Ruhrmann S, Faigle W, Frauenknecht K, Pinilla C, Santos R, Hammer C, Ortiz Y, Opitz L, Grönlund H, Rogler G, Boyman O, Reynolds R, Lutterotti A, Khademi M, Olsson T, Piehl F, Sospedra M, Martin R. 2018. Memory B Cells Activate Brain-Homing, Autoreactive CD4+ T Cells in Multiple Sclerosis. *Cell.* **175**: 85-100.e23.
- Jersild C, Svejgaard A, Fog T. 1972. HL-A antigens and multiple sclerosis. *Lancet.* **1**: 1240-1241.
- Johansson ME, Gustafsson JK, Holmén-Larsson J, Jabbar KS, Xia L, Xu H, Ghishan FK, Carvalho FA, Gewirtz AT, Sjövall H, Hansson GC. 2014. Bacteria penetrate the normally impenetrable inner colon mucus layer in both murine colitis models and patients with ulcerative colitis. *Gut.* **63**: 281-291.
- Johns TG, Kerlero de Rosbo N, Menon KK, Abo S, Gonzales MF, Bernard CC. 1995. Myelin oligodendrocyte glycoprotein induces a demyelinating encephalomyelitis resembling multiple sclerosis. *J Immunol.* **154**: 5536-5541.

K

- Kabat EA, Wolf A, Bezer AE. 1946. Rapid Production of Acute Disseminated Encephalomyelitis in Rhesus Monkeys by Injection of Brain Tissue With Adjuvants. *Science*. **104**: 362-363.
- Kang MS, Kieff E. 2015. Epstein-Barr virus latent genes. *Exp Mol Med*. **47**: e131.
- Karagkouni A, Alevizos M, Theoharides TC. 2013. Effect of stress on brain inflammation and multiple sclerosis. *Autoimmun Rev*. **12**: 947-953.
- Karni A, Abraham M, Monsonogo A, Cai G, Freeman GJ, Hafler D, Khoury SJ, Weiner HL. 2006. Innate immunity in multiple sclerosis: myeloid dendritic cells in secondary progressive multiple sclerosis are activated and drive a proinflammatory immune response. *J Immunol*. **177**: 4196-4202.
- Kempermann G, Brandon EP, Gage FH. 1998. Environmental stimulation of 129/SvJ mice causes increased cell proliferation and neurogenesis in the adult dentate gyrus. *Curr Biol*. **8**: 939-942.
- Kett K, Baklien K, Bakken A, Kral JG, Fausa O, Brandtzaeg P. 1995. Intestinal B-cell isotype response in relation to local bacterial load: evidence for immunoglobulin A subclass adaptation. *Gastroenterology*. **109**: 819-825.
- Kies MW, Murphy JB, Alvord EC. 1960. Fractionation of guinea pig brain proteins with encephalitogenic activity. *Federation Proceedings*. **19**: 207.
- Kleinewietfeld M, Hafler DA. 2014. Regulatory T cells in autoimmune neuroinflammation. *Immunol Rev*. **259**: 231-244.
- Knippenberg S, Peelen E, Smolders J, Thewissen M, Menheere P, Cohen Tervaert JW, Hupperts R, Damoiseaux J. 2011. Reduction in IL-10 producing B cells (Breg) in multiple sclerosis is accompanied by a reduced naïve/memory Breg ratio during a relapse but not in remission. *J Neuroimmunol*. **239**: 80-86.

- Koch M, Kingwell E, Rieckmann P, Tremlett H. 2009. The natural history of primary progressive multiple sclerosis. *Neurology*. **73**: 1996-2022.
- Kohm AP, Carpentier PA, Anger HA, Miller SD. 2002. Cutting edge: CD4+CD25+ regulatory T cells suppress antigen-specific autoreactive immune responses and central nervous system inflammation during active experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol*. **169**: 4712-4716.
- Kolahkaj B, Zargar F, Majdinasab N. 2018. The Effect of Mindfulness-Based Stress Reduction (MBSR) Therapy on Quality of Life in Women with Multiple Sclerosis, Ahvaz, Iran. *J Caring Sci*. **8**: 213-217.
- Korn T, Reddy J, Gao W, Bettelli E, Awasthi A, Petersen TR, Bäckström BT, Sobel RA, Wucherpfennig KW, Strom TB, Oukka M, Kuchroo VK. 2007. Myelin-specific regulatory T cells accumulate in the CNS but fail to control autoimmune inflammation. *Nat Med*. **13**: 423-31.
- Kroenke MA, Carlson TJ, Andjelkovic AV, Segal BM. 2008. IL-12- and IL-23-modulated T cells induce distinct types of EAE based on histology, CNS chemokine profile, and response to cytokine inhibition. *J Exp Med*. **205**: 1535-1541.
- Kuhbandner K, Hammer A, Haase S, Terbrack E, Hoffmann A, Schippers A, Wagner N, Hussain RZ, Miller-Little WA, Koh AY, Stoolman JS, Segal BM, Linker RA, Stüve O. 2019. MAdCAM-1-Mediated Intestinal Lymphocyte Homing Is Critical for the Development of Active Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *Front Immunol*. **10**: 903.
- Kuhlmann T, Lingfeld G, Bitsch A, Schuchardt J, Brück W. 2002. Acute axonal damage in multiple sclerosis is most extensive in early disease stages and decreases over time. *Brain*. **125**: 2202-2212.
- Kuroda Y, Mori T, Hori T. 1994. Restraint stress suppresses experimental allergic encephalomyelitis in Lewis rats. *Brain Res Bull*. **34**: 15-17.
- Kurtzke JF. 1983. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology*. **33**: 1444-52.

L

- Langer-Gould A, Brara SM, Beaver BE, Koebnick C. 2013. Childhood obesity and risk of pediatric multiple sclerosis and clinically isolated syndrome. *Neurology*. **80**: 548-552.
- Langrish CL, Chen Y, Blumenschein WM, Mattson J, Basham B, Sedgwick JD, McClanahan T, Kastelein RA, Cua DJ. 2005. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J Exp Med*. **201**: 233-240.
- Larsson F, Winblad B, Mohammed AH. 2002. Psychological stress and environmental adaptation in enriched vs. impoverished housed rats. *Pharmacol Biochem Behav*. **73**: 193-207.
- Lee YK, Menezes JS, Umesaki Y, Mazmanian SK. 2011. Proinflammatory T-cell responses to gut microbiota promote experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **Suppl 1**: 4615-4622.
- Leekoff M, Culpepper W, Jin S, Lee-Wilk T, Wallin M. 2022. Impact of comorbid post traumatic stress disorder on multiple sclerosis in military veterans: A population-based cohort study. *Mult Scler*. **28**: 1257-1266.
- Lefrançois L, Parker CM, Olson S, Muller W, Wagner N, Schön MP, Puddington L. 1999. The role of beta7 integrins in CD8 T cell trafficking during an antiviral immune response. *J Exp Med*. **189**: 1631-1638.
- Levine S, Saltzman A. 1987. Nonspecific stress prevents relapses of experimental allergic encephalomyelitis in rats. *Brain Behav Immun*. **1**: 336-341.
- Levine S, Strebel R, Wenk EJ, Harman PJ. 1962. Suppression of experimental allergic encephalomyelitis by stress. *Proc Soc Exp Biol Med*. **109**: 294-298.

- Li J, Johansen C, Brønnum-Hansen H, Stenager E, Koch-Henriksen N, Olsen J. 2004. The risk of multiple sclerosis in bereaved parents: A nationwide cohort study in Denmark. *Neurology*. **62**: 726-729.
- Li L, Tang BL. 2005. Environmental enrichment and neurodegenerative diseases. *Biochem Biophys Res Commun*. **334**: 293-297.
- Li R, Rezk A, Miyazaki Y, Hilgenberg E, Touil H, Shen P, Moore CS, Michel L, Althekair F, Rajasekharan S, Gommerman JL, Prat A, Fillatreau S, Bar-Or A ; Canadian B cells in MS Team. 2015. Proinflammatory GM-CSF-producing B cells in multiple sclerosis and B cell depletion therapy. *Sci Transl Med*. **7**: 310ra166.
- Lin M, Du L, Brandtzaeg P, Pan-Hammarström Q. 2014. IgA subclass switch recombination in human mucosal and systemic immune compartments. *Mucosal Immunol*. **7**: 511-520.
- Linington C, Berger T, Perry L, Weerth S, Hinze-Selch D, Zhang Y, Lu HC, Lassmann H, Wekerle H. 1993. T cells specific for the myelin oligodendrocyte glycoprotein mediate an unusual autoimmune inflammatory response in the central nervous system. *Eur J Immunol*. **23**: 1364-1372.
- Link H, Huang YM. 2006. Oligoclonal bands in multiple sclerosis cerebrospinal fluid: an update on methodology and clinical usefulness. *J Neuroimmunol*. **180**: 17-28.
- Lipton MM, Freund J. 1952. Encephalomyelitis in the rat following intracutaneous injection of central nervous system tissue with adjuvant. *Proc Soc Exp Biol Med*. **81**: 260-261.
- Lisak RP, Benjamins JA, Nedelkoska L, Barger JL, Ragheb S, Fan B, Ouamara N, Johnson TA, Rajasekharan S, Bar-Or A. 2012. Secretory products of multiple sclerosis B cells are cytotoxic to oligodendroglia in vitro. *J Neuroimmunol*. **246**: 85-95.
- Lisak RP, Nedelkoska L, Benjamins JA, Schalk D, Bealmear B, Touil H, Li R, Muirhead G, Bar-Or A. 2017. B cells from patients with multiple sclerosis induce cell death via apoptosis in neurons in vitro. *J Neuroimmunol*. **309**: 88-99.

- Lovato L, Willis SN, Rodig SJ, Caron T, Almendinger SE, Howell OW, Reynolds R, O'Connor KC, Hafler DA. 2011. Related B cell clones populate the meninges and parenchyma of patients with multiple sclerosis. *Brain*. **134**: 534-541.
- Lovera J, Reza T. 2013. Stress in multiple sclerosis: review of new developments and future directions. *Curr Neurol Neurosci Rep*. **13**: 398.
- Lowther DE, Hafler DA. 2012. Regulatory T cells in the central nervous system. *Immunol Rev*. **248**: 156-169.
- Lu L, Kim HJ, Werneck MB, Cantor H. 2008. Regulation of CD8+ regulatory T cells: Interruption of the NKG2A-Qa-1 interaction allows robust suppressive activity and resolution of autoimmune disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **105**: 19420-19425.
- Lublin FD, Knobler RL, Kalman B, Goldhaber M, Marini J, Perrault M, D'Imperio C, Joseph J, Alkan SS, Korngold R. 1993. Monoclonal anti-gamma interferon antibodies enhance experimental allergic encephalomyelitis. *Autoimmunity*. **16**: 267-274.
- Lublin FD, Reingold SC, Cohen JA, Cutter GR, Sørensen PS, Thompson AJ, Wolinsky JS, Balcer LJ, Banwell B, Barkhof F, Bebo B Jr, Calabresi PA, Clanet M, Comi G, Fox RJ, Freedman MS, Goodman AD, Inglese M, Kappos L, Kieseier BC, Lincoln JA, Lubetzki C, Miller AE, Montalban X, O'Connor PW, Petkau J, Pozzilli C, Rudick RA, Sormani MP, Stüve O, Waubant E, Polman CH. 2014. Defining the clinical course of multiple sclerosis: the 2013 revisions. *Neurology*. **83**: 278-286.
- Lublin FD, Reingold SC. 1996. Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey. National Multiple Sclerosis Society (USA) Advisory Committee on Clinical Trials of New Agents in Multiple Sclerosis. *Neurology*. **46**: 907-911.
- Lucchinetti CF, Popescu BF, Bunyan RF, Moll NM, Roemer SF, Lassmann H, Brück W, Parisi JE, Scheithauer BW, Giannini C, Weigand SD, Mandrekar J, Ransohoff RM. 2011. Inflammatory cortical demyelination in early multiple sclerosis. *N Engl J Med*. **365**: 2188-2197.

Luckheeram RV, Zhou R, Verma AD, Xia B. 2012. CD4⁺T cells: differentiation and functions. *Clin Dev Immunol.* **2012**: 925135.

Ludwin SK. 1978. Central nervous system demyelination and remyelination in the mouse: an ultrastructural study of cuprizone toxicity. *Lab Invest.* **39**: 597-612.

M

Magalon K, Cantarella C, Monti G, Cayre M, Durbec P. 2007. Enriched environment promotes adult neural progenitor cell mobilization in mouse demyelination models. *Eur J Neurosci.* **25**: 761-771.

Martin B, Hirota K, Cua DJ, Stockinger B, Veldhoen M. 2009. Interleukin-17-producing gammadelta T cells selectively expand in response to pathogen products and environmental signals. *Immunity.* **31**: 321-330.

Matarese G, Carrieri PB, La Cava A, Perna F, Sanna V, De Rosa V, Aufiero D, Fontana S, Zappacosta S. 2005. Leptin increase in multiple sclerosis associates with reduced number of CD4(+)CD25+ regulatory T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **102**: 5150-5155.

McAteer MA, Sibson NR, von Zur Muhlen C, Schneider JE, Lowe AS, Warrick N, Channon KM, Anthony DC, Choudhury RP. 2007. In vivo magnetic resonance imaging of acute brain inflammation using microparticles of iron oxide. *Nat Med.* **13**: 1253-1258.

McColl SR, Staykova MA, Wozniak A, Fordham S, Bruce J, Willenborg DO. 1998. Treatment with anti-granulocyte antibodies inhibits the effector phase of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol.* **161**: 6421-6426.

McConnell KW, Coopersmith CM. 2005. Epithelial cells. *Crit Care Med.* **33**: S520-522.

McDonald WI, Compston A, Edan G, Goodkin D, Hartung HP, Lublin FD, McFarland HF, Paty DW, Polman CH, Reingold SC, Sandberg-Wollheim M, Sibley W, Thompson A, van den Noort S,

- Weinshenker BY, Wolinsky JS. 2001. Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Ann Neurol.* **50**: 121-7.
- McRae BL, Kennedy MK, Tan LJ, Dal Canto MC, Picha KS, Miller SD. 1992. Induction of active and adoptive relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) using an encephalitogenic epitope of proteolipid protein. *J Neuroimmunol.* **38**: 229-240.
- McRae BL, Vanderlugt CL, Dal Canto MC, Miller SD. 1995. Functional evidence for epitope spreading in the relapsing pathology of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med.* **182**: 75-85.
- Medic N, Vita F, Abbate R, Soranzo MR, Pacor S, Fabbretti E, Borelli V, Zabucchi G. 2008. Mast cell activation by myelin through scavenger receptor. *J Neuroimmunol.* **200**: 27-40.
- Meknatkhah S, Sharif Dashti P, Mousavi MS, Zeynali A, Ahmadian S, Karima S, Saboury AA, Riazi GH. 2019. Psychological stress effects on myelin degradation in the cuprizone-induced model of demyelination. *Neuropathology.* **39**: 14-21.
- Mendel I, Kerlero de Rosbo N, Ben-Nun A. 1995. A myelin oligodendrocyte glycoprotein peptide induces typical chronic experimental autoimmune encephalomyelitis in H-2b mice: fine specificity and T cell receptor V beta expression of encephalitogenic T cells. *Eur J Immunol.* **25**: 1951-1959.
- Miles A, Bhatnagar G, Halligan S, Gupta A, Tolan D, Zealley I, Taylor SA; METRIC investigators. 2019. Magnetic resonance enterography, small bowel ultrasound and colonoscopy to diagnose and stage Crohn's disease: patient acceptability and perceived burden. *Eur Radiol.* **29**: 1083-1093.
- Miller GE, Cohen S, Ritchey AK. 2002. Chronic psychological stress and the regulation of pro-inflammatory cytokines: a glucocorticoid-resistance model. *Health Psychol.* **21**: 531-541.
- Miron VE, Boyd A, Zhao JW, Yuen TJ, Ruckh JM, Shadrach JL, van Wijngaarden P, Wagers AJ, Williams A, Franklin RJM, Ffrench-Constant C. 2013. M2 microglia and macrophages drive oligodendrocyte differentiation during CNS remyelination. *Nat Neurosci.* **16**: 1211-1218.

- Mitsonis CI, Zervas IM, Mitropoulos PA, Dimopoulos NP, Soldatos CR, Potagas CM, Sfagos CA. 2008. The impact of stressful life events on risk of relapse in women with multiple sclerosis: a prospective study. *Eur Psychiatry*. **23**: 497-504.
- Mittal R, Coopersmith CM. 2014. Redefining the gut as the motor of critical illness. *Trends Mol Med*. **20**: 214-223.
- Miyake S, Kim S, Suda W, Oshima K, Nakamura M, Matsuoka T, Chihara N, Tomita A, Sato W, Kim SW, Morita H, Hattori M, Yamamura T. 2015. Dysbiosis in the Gut Microbiota of Patients with Multiple Sclerosis, with a Striking Depletion of Species Belonging to Clostridia XIVa and IV Clusters. *PLoS One*. **10**: e0137429.
- Mohr DC, Hart SL, Julian L, Cox D, Pelletier D. 2004. Association between stressful life events and exacerbation in multiple sclerosis: a meta-analysis. *BMJ*. **328**: 731.
- Mohr DC, Lovera J, Brown T, Cohen B, Neylan T, Henry R, Siddique J, Jin L, Daikh D, Pelletier D. 2012. A randomized trial of stress management for the prevention of new brain lesions in MS. *Neurology*. **79**: 412-419.
- Mohr DC, Pelletier D. 2006. A temporal framework for understanding the effects of stressful life events on inflammation in patients with multiple sclerosis. *Brain Behav Immun*. **20**: 27-36.
- Mohr DC. 2010. The stress and mood management program for individuals with multiple sclerosis: Workbook. *Oxford University Press*.
- Mönnikes H, Schmidt BG, Taché Y. 1993. Psychological stress-induced accelerated colonic transit in rats involves hypothalamic corticotropin-releasing factor. *Gastroenterology*. **104**: 716-23.
- Montagne A, Gauberti M, Macrez R, Jullienne A, Briens A, Raynaud JS, Louin G, Buisson A, Haelewyn B, Docagne F, Defer G, Vivien D, Maubert E. 2012. Ultra-sensitive molecular MRI of cerebrovascular cell activation enables early detection of chronic central nervous system disorders. *Neuroimage*. **63**: 760-770.

- Moreno MA, Or-Geva N, Aftab BT, Khanna R, Croze E, Steinman L, Han MH. 2018. Molecular signature of Epstein-Barr virus infection in MS brain lesions. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm.* **5**: e466.
- Motl RW, Sandroff BM, Kwakkel G, Dalgas U, Feinstein A, Heesen C, Feys P, Thompson AJ. 2017. Exercise in patients with multiple sclerosis. *Lancet Neurol.* **16**: 848-856.
- Mowat AM, Agace WW. 2014. Regional specialization within the intestinal immune system. *Nat Rev Immunol.* **14**: 667-685.
- Mowat AM. 2003. Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nat Rev Immunol.* **3**: 331-341.
- Munger KL, Levin LI, Hollis BW, Howard NS, Ascherio A. 2006. Serum 25-hydroxyvitamin D levels and risk of multiple sclerosis. *JAMA.* **296**: 2832-2838.
- Murai M, Turovskaya O, Kim G, Madan R, Karp CL, Cheroutre H, Kronenberg M. 2009. Interleukin 10 acts on regulatory T cells to maintain expression of the transcription factor Foxp3 and suppressive function in mice with colitis. *Nat Immunol.* **10**: 1178-1184.

N

- Naka F, Narita N, Okado N, Narita M. 2005. Modification of AMPA receptor properties following environmental enrichment. *Brain Dev.* **27**: 275-278.
- Neumann H, Medana IM, Bauer J, Lassmann H. 2002. Cytotoxic T lymphocytes in autoimmune and degenerative CNS diseases. *Trends Neurosci.* **25**: 313-319.
- Nikić I, Merkler D, Sorbara C, Brinkoetter M, Kreutzfeldt M, Bareyre FM, Brück W, Bishop D, Misgeld T, Kerschensteiner M. 2011. A reversible form of axon damage in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Nat Med.* **17**: 495-499.

- Nisipeanu P, Korczyn AD. 1993. Psychological stress as risk factor for exacerbations in multiple sclerosis. *Neurology*. **43**: 1311-1312.
- Nithianantharajah J, Hannan AJ. 2006. Enriched environments, experience-dependent plasticity and disorders of the nervous system. *Nat Rev Neurosci*. **7**: 697-709.
- Nouri M, Bredberg A, Weström B, Lavasani S. 2014. Intestinal barrier dysfunction develops at the onset of experimental autoimmune encephalomyelitis and can be induced by adoptive transfer of autoreactive T cells. *PLoS One*. **9**: e106335.
- Novaes LS, Dos Santos NB, Batalhote RFP, Malta MB, Camarini R, Scavone C, Munhoz CD. 2017. Environmental enrichment protects against stress-induced anxiety: Role of glucocorticoid receptor, ERK, and CREB signaling in the basolateral amygdala. *Neuropharmacology*. **113**: 457-466.

O

- Ochoa-Repáraz J, Mielcarz DW, Ditrio LE, Burroughs AR, Foureau DM, Haque-Begum S, Kasper LH. 2009. Role of gut commensal microflora in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol*. **183**: 6041-6050.
- Oines E, Murison R, Mrdalj J, Grønli J, Milde AM. 2012. Neonatal maternal separation in male rats increases intestinal permeability and affects behavior after chronic social stress. *Physiol Behav*. **105**: 1058-1066.
- Okada Y, Ochi H, Fujii C, Hashi Y, Hamatani M, Ashida S, Kawamura K, Kusaka H, Matsumoto S, Nakagawa M, Mizuno T, Takahashi R, Kondo T. 2018. Signaling via toll-like receptor 4 and CD40 in B cells plays a regulatory role in the pathogenesis of multiple sclerosis through interleukin-10 production. *J Autoimmun*. **88**: 103-113.
- Oleinika K, Mauri C, Salama AD. 2019. Effector and regulatory B cells in immune-mediated kidney disease. *Nat Rev Nephrol*. **15**: 11-26.

- Olitsky PK, Tal C. 1952. Acute disseminated encephalomyelitis produced in mice by brain proteolipide (Folch-Lees). *Proc Soc Exp Biol Med.* **79**: 50-53.
- Olitsky PK, Yager RH. 1949. Experimental disseminated encephalomyelitis in white mice. *J Exp Med.* **90**: 213-224.
- Olivares-Villagómez D, Van Kaer L. 2018. Intestinal Intraepithelial Lymphocytes: Sentinels of the Mucosal Barrier. *Trends Immunol.* **39**: 264-275.
- Olson JK, Croxford JL, Miller SD. 2001. Virus-induced autoimmunity: potential role of viruses in initiation, perpetuation, and progression of T-cell-mediated autoimmune disease. *Viral Immunol.* **14**: 227-250.
- Opdenakker G, Fibbe WE, Van Damme J. 1998. The molecular basis of leukocytosis. *Immunol Today.* **19**: 182-189.

P

- Panitch HS, Hirsch RL, Haley AS, Johnson KP. 1987. Exacerbations of multiple sclerosis in patients treated with gamma interferon. *Lancet.* **1**: 893-895.
- Paré A, Mailhot B, Lévesque SA, Lacroix S. 2017. Involvement of the IL-1 system in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis: Breaking the vicious cycle between IL-1 β and GM-CSF. *Brain Behav Immun.* **62**: 1-8.
- Parker KJ, Maestriperi D. 2011. Identifying key features of early stressful experiences that produce stress vulnerability and resilience in primates. *Neurosci Biobehav Rev.* **35**: 1466-1483.
- Parodi B, Kerlero de Rosbo N. 2021. The Gut-Brain Axis in Multiple Sclerosis. Is Its Dysfunction a Pathological Trigger or a Consequence of the Disease? *Front Immunol.* **12**: 718220.

- Patsopoulos NA, Barcellos LF, Hintzen RQ, Schaefer C, van Duijn CM, Noble JA, Raj T; IMSGC; ANZgene, Gourraud PA, Stranger BE, Oksenberg J, Olsson T, Taylor BV, Sawcer S, Hafler DA, Carrington M, De Jager PL, de Bakker PI. 2013. Fine-mapping the genetic association of the major histocompatibility complex in multiple sclerosis: HLA and non-HLA effects. *PLoS Genet.* **9**: e1003926.
- Peloquin JM, Nguyen DD. 2013. The microbiota and inflammatory bowel disease: insights from animal models. *Anaerobe.* **24**: 102-106.
- Pérez-Nievas BG, García-Bueno B, Madrigal JL, Leza JC. 2010. Chronic immobilisation stress ameliorates clinical score and neuroinflammation in a MOG-induced EAE in Dark Agouti rats: mechanisms implicated. *J Neuroinflammation.* **7**: 60.
- Persson EK, Scott CL, Mowat AM, Agace WW. 2013. Dendritic cell subsets in the intestinal lamina propria: ontogeny and function. *Eur J Immunol.* **43**: 3098-3107.
- Piscopo DM, Weible AP, Rothbart MK, Posner MI, Niell CM. 2018. Changes in white matter in mice resulting from low-frequency brain stimulation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **115**: E6339-E6346.
- Plaut AG, Wistar R Jr, Capra JD. 1974. Differential susceptibility of human IgA immunoglobulins to streptococcal IgA protease. *J Clin Invest.* **54**: 1295-1300.
- Poliak S, Mor F, Conlon P, Wong T, Ling N, Rivier J, Vale W, Steinman L. 1997. Stress and autoimmunity: the neuropeptides corticotropin-releasing factor and urocortin suppress encephalomyelitis via effects on both the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and the immune system. *J Immunol.* **158**: 5751-5756.
- Pollard M, Sharon N. 1970. Responses of the Peyer's Patches in Germ-Free Mice to Antigenic Stimulation. *Infect Immun.* **2**: 96-100.
- Polman CH, Reingold SC, Banwell B, Clanet M, Cohen JA, Filippi M, Fujihara K, Havrdova E, Hutchinson M, Kappos L, Lublin FD, Montalban X, O'Connor P, Sandberg-Wollheim M, Thompson

AJ, Waubant E, Weinshenker B, Wolinsky JS. 2011. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria. *Ann Neurol.* **69**: 292-302.

Pröbstel AK, Zhou X, Baumann R, Wischniewski S, Kutza M, Rojas OL, Sellrie K, Bischof A, Kim K, Ramesh A, Dandekar R, Greenfield AL, Schubert RD, Bisanz JE, Vistnes S, Khaleghi K, Landefeld J, Kirkish G, Liesche-Starnecker F, Ramaglia V, Singh S, Tran EB, Barba P, Zorn K, Oechtering J, Forsberg K, Shioh LR, Henry RG, Graves J, Cree BAC, Hauser SL, Kuhle J, Gelfand JM, Andersen PM, Schlegel J, Turnbaugh PJ, Seeberger PH, Gommerman JL, Wilson MR, Schirmer L, Baranzini SE. 2020. Gut microbiota-specific IgA+ B cells traffic to the CNS in active multiple sclerosis. *Sci Immunol.* **5**: eabc7191.

Procaccini C, De Rosa V, Pucino V, Formisano L, Matarese G. 2015. Animal models of Multiple Sclerosis. *Eur J Pharmacol.* **759**: 182-191.

R

Reddy J, Bettelli E, Nicholson L, Waldner H, Jang MH, Wucherpfennig KW, Kuchroo VK. 2003. Detection of autoreactive myelin proteolipid protein 139-151-specific T cells by using MHC II (IAs) tetramers. *J Immunol.* **170**: 870-7.

Reddy J, Illes Z, Zhang X, Encinas J, Pyrdol J, Nicholson L, Sobel RA, Wucherpfennig KW, Kuchroo VK. 2004. Myelin proteolipid protein-specific CD4+CD25+ regulatory cells mediate genetic resistance to experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **101**: 15434-15439.

Rescigno M, Urbano M, Valzasina B, Francolini M, Rotta G, Bonasio R, Granucci F, Kraehenbuhl JP, Ricciardi-Castagnoli P. 2001. Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nat Immunol.* **2**: 361-367.

- Rhodes KA, Andrew EM, Newton DJ, Tramonti D, Carding SR. 2008. A subset of IL-10-producing gammadelta T cells protect the liver from Listeria-elicited, CD8(+) T cell-mediated injury. *Eur J Immunol.* **38**: 2274-2283.
- Riise T, Mohr DC, Munger KL, Rich-Edwards JW, Kawachi I, Ascherio A. 2011. Stress and the risk of multiple sclerosis. *Neurology.* **76**: 1866-1871.
- Rivers TM, Schwentker FF. 1935. Encephalomyelitis accompanied by myelin destruction experimentally produced in monkeys. *J Exp Med.* **61**: 689-702.
- Rosser EC, Mauri C. 2015. Regulatory B cells: origin, phenotype, and function. *Immunity.* **42**: 607-612.
- Rozniecki JJ, Hauser SL, Stein M, Lincoln R, Theoharides TC. 1995. Elevated mast cell tryptase in cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients. *Ann Neurol.* **37**: 63-66.

S

- Sandberg L, Biström M, Salzer J, Vågberg M, Svenningsson A, Sundström P. 2016. Vitamin D and axonal injury in multiple sclerosis. *Mult Scler.* **22**: 1027-1031.
- Sandborn WJ, Feagan BG, Rutgeerts P, Hanauer S, Colombel JF, Sands BE, Lukas M, Fedorak RN, Lee S, Bressler B, Fox I, Rosario M, Sankoh S, Xu J, Stephens K, Milch C, Parikh A; GEMINI 2 Study Group. 2013. Vedolizumab as induction and maintenance therapy for Crohn's disease. *N Engl J Med.* **369**: 711-721.
- Sanderson IR, Ouellette AJ, Carter EA, Walker WA, Harnatz PR. 1993. Differential regulation of B7 mRNA in enterocytes and lymphoid cells. *Immunology.* **79**: 434-438.
- Schlitzer A, McGovern N, Teo P, Zelante T, Atarashi K, Low D, Ho AW, See P, Shin A, Wasan PS, Hoeffel G, Malleret B, Heiseke A, Chew S, Jardine L, Purvis HA, Hilkens CM, Tam J, Poidinger M, Stanley ER, Krug AB, Renia L, Sivasankar B, Ng LG, Collin M, Ricciardi-Castagnoli P, Honda K,

- Haniffa M, Ginhoux F. 2013. IRF4 transcription factor-dependent CD11b+ dendritic cells in human and mouse control mucosal IL-17 cytokine responses. *Immunity*. **38**: 970-983.
- Secor VH, Secor WE, Gutekunst CA, Brown MA. 2000. Mast cells are essential for early onset and severe disease in a murine model of multiple sclerosis. *J Exp Med*. **191**: 813-822.
- Seery MD, Leo RJ, Lupien SP, Kondrak CL, Almonte JL. 2013. An upside to adversity?: moderate cumulative lifetime adversity is associated with resilient responses in the face of controlled stressors. *Psychol Sci*. **24**: 1181-1189.
- Seifert HA, Benedek G, Nguyen H, Gerstner G, Zhang Y, Kent G, Vandenbark AA, Bernhagen J, Offner H. 2018. Antibiotics protect against EAE by increasing regulatory and anti-inflammatory cells. *Metab Brain Dis*. **33**: 1599-1607.
- Senders A, Hanes D, Bourdette D, Carson K, Marshall LM, Shinto L. 2019. Impact of mindfulness-based stress reduction for people with multiple sclerosis at 8 weeks and 12 months: A randomized clinical trial. *Mult Scler*. **25**: 1178-1188.
- Serafini B, Rosicarelli B, Veroni C, Mazzola GA, Aloisi F. 2019. Epstein-Barr Virus-Specific CD8 T Cells Selectively Infiltrate the Brain in Multiple Sclerosis and Interact Locally with Virus-Infected Cells: Clue for a Virus-Driven Immunopathological Mechanism. *J Virol*. **93**: e00980-19.
- Shapiro EM, Skrtic S, Sharer K, Hill JM, Dunbar CE, Koretsky AP. 2004. MRI detection of single particles for cellular imaging. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **101**: 10901-10906.
- Sheridan BS, Lefrançois L. 2010. Intraepithelial lymphocytes: to serve and protect. *Curr Gastroenterol Rep*. **12**: 513-521.
- Shields SA, Gilson JM, Blakemore WF, Franklin RJ. 1999. Remyelination occurs as extensively but more slowly in old rats compared to young rats following gliotoxin-induced CNS demyelination. *Glia*. **28**: 77-83.

- Silva BA, Leal MC, Farias MI, Erhardt B, Galeano P, Pitossi FJ, Ferrari CC. 2020. Environmental enrichment improves cognitive symptoms and pathological features in a focal model of cortical damage of multiple sclerosis. *Brain Res.* **1727**: 146520.
- Simpson R, Mair FS, Mercer SW. 2017. Mindfulness-based stress reduction for people with multiple sclerosis - a feasibility randomised controlled trial. *BMC Neurol.* **17**: 94.
- Simpson S Jr, Blizzard L, Otahal P, Van der Mei I, Taylor B. 2011. Latitude is significantly associated with the prevalence of multiple sclerosis: a meta-analysis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* **82**: 1132-1141.
- Smith PM, Howitt MR, Panikov N, Michaud M, Gallini CA, Bohlooly-Y M, Glickman JN, Garrett WS. 2013. The microbial metabolites, short-chain fatty acids, regulate colonic Treg cell homeostasis. *Science.* **341**: 569-73.
- Souza HS, Elia CC, Spencer J, MacDonald TT. 1999. Expression of lymphocyte-endothelial receptor-ligand pairs, alpha4beta7/MAdCAM-1 and OX40/OX40 ligand in the colon and jejunum of patients with inflammatory bowel disease. *Gut.* **45**: 856-863.
- Sparaco M, Miele G, Lavorgna L, Abbadessa G, Bonavita S. 2022. Association between relapses, stress, and depression in people with multiple sclerosis during the COVID-19 pandemic. *Neurol Sci.* **43**: 2935-2942.
- Steinbach K, Piedavent M, Bauer S, Neumann JT, Friese MA. 2013. Neutrophils amplify autoimmune central nervous system infiltrates by maturing local APCs. *J Immunol.* **191**: 4531-4539.
- Streeter PR, Berg EL, Rouse BT, Bargatze RF, Butcher EC. 1988. A tissue-specific endothelial cell molecule involved in lymphocyte homing. *Nature.* **331**: 41-46.
- Stromnes IM, Cerretti LM, Liggitt D, Harris RA, Goverman JM. 2008. Differential regulation of central nervous system autoimmunity by T(H)1 and T(H)17 cells. *Nat Med.* **14**: 337-342.

Sugama S, Takenouchi T, Fujita M, Kitani H, Hashimoto M. 2011. Cold stress induced morphological microglial activation and increased IL-1 β expression in astroglial cells in rat brain. *J Neuroimmunol.* **233**: 29-36.

Sundqvist E, Sundström P, Lindén M, Hedström AK, Aloisi F, Hillert J, Kockum I, Alfredsson L, Olsson T. 2012. Epstein-Barr virus and multiple sclerosis: interaction with HLA. *Genes Immun.* **13**: 14-20.

Sutton CE, Lalor SJ, Sweeney CM, Brereton CF, Lavelle EC, Mills KH. 2009. Interleukin-1 and IL-23 induce innate IL-17 production from gammadelta T cells, amplifying Th17 responses and autoimmunity. *Immunity.* **31**: 331-341.

Suzuki T. 2013. Regulation of intestinal epithelial permeability by tight junctions. *Cell Mol Life Sci.* **70**: 631-659.

Swidsinski A, Loening-Baucke V, Theissig F, Engelhardt H, Bengmark S, Koch S, Lochs H, Dörffel Y. 2007. Comparative study of the intestinal mucus barrier in normal and inflamed colon. *Gut.* **56**: 343-350.

T

Tang YP, Wang H, Feng R, Kyin M, Tsien JZ. 2001. Differential effects of enrichment on learning and memory function in NR2B transgenic mice. *Neuropharmacology.* **41**: 779-790.

Tang YY, Lu Q, Fan M, Yang Y, Posner MI. 2012. Mechanisms of white matter changes induced by meditation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **109**: 10570-10574.

Taylor SA, Mallett S, Bhatnagar G, Baldwin-Cleland R, Bloom S, Gupta A, Hamlin PJ, Hart AL, Higginson A, Jacobs I, McCartney S, Miles A, Murray CD, Plumb AA, Pollok RC, Punwani S, Quinn L, Rodriguez-Justo M, Shabir Z, Slater A, Tolan D, Travis S, Windsor A, Wylie P, Zealley I, Halligan S; METRIC study investigators. 2018. Diagnostic accuracy of magnetic resonance enterography and

- small bowel ultrasound for the extent and activity of newly diagnosed and relapsed Crohn's disease (METRIC): a multicentre trial. *Lancet Gastroenterol Hepatol.* **3**: 548-558.
- Theiler M. 1937. Spontaneous encephalomyelitis of mice, a new virus disease. *J Exp Med.* **65**: 705-719.
- Then Bergh F, Kümpfel T, Trenkwalder C, Rupprecht R, Holsboer F. 1999. Dysregulation of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis is related to the clinical course of MS. *Neurology.* **53**: 772-777.
- Thompson AJ, Banwell BL, Barkhof F, Carroll WM, Coetzee T, Comi G, Correale J, Fazekas F, Filippi M, Freedman MS, Fujihara K, Galetta SL, Hartung HP, Kappos L, Lublin FD, Marrie RA, Miller AE, Miller DH, Montalban X, Mowry EM, Sorensen PS, Tintoré M, Traboulsee AL, Trojano M, Uitdehaag BMJ, Vukusic S, Waubant E, Weinshenker BG, Reingold SC, Cohen JA. 2018. Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. *Lancet Neurol.* **17**: 162-173.
- Titus HE, Chen Y, Podojil JR, Robinson AP, Balabanov R, Popko B, Miller SD. 2020. Pre-clinical and Clinical Implications of "Inside-Out" vs. "Outside-In" Paradigms in Multiple Sclerosis Etiopathogenesis. *Front Cell Neurosci.* **14**: 599717.
- Toms R, Weiner HL, Johnson D. 1990. Identification of IgE-positive cells and mast cells in frozen sections of multiple sclerosis brains. *J Neuroimmunol.* **30**: 169-177.
- Tortorella C, Codella M, Rocca MA, Gasperini C, Capra R, Bastianello S, Filippi M. 1999. Disease activity in multiple sclerosis studied by weekly triple-dose magnetic resonance imaging. *J Neurol.* **246**: 689-692.
- Touma C, Palme R, Sachser N. 2004. Analyzing corticosterone metabolites in fecal samples of mice: a noninvasive technique to monitor stress hormones. *Horm Behav.* **45**: 10-22.
- Traugott U, Reinherz EL, Raine CS. 1983. Multiple sclerosis. Distribution of T cells, T cell subsets and Ia-positive macrophages in lesions of different ages. *J Neuroimmunol.* **4**: 201-221.

- Tsunoda I, Fujinami RS. 1996. Two models for multiple sclerosis: experimental allergic encephalomyelitis and Theiler's murine encephalomyelitis virus. *J Neuropathol Exp Neurol*. **55**: 673-686.
- Tsunoda I, Kuang LQ, Libbey JE, Fujinami RS. 2003. Axonal injury heralds virus-induced demyelination. *Am J Pathol*. **162**: 1259-1269.
- Turner JR. 2009. Intestinal mucosal barrier function in health and disease. *Nat Rev Immunol*. **9**: 799-809.
- Tzartos JS, Friese MA, Craner MJ, Palace J, Newcombe J, Esiri MM, Fugger L. 2008. Interleukin-17 production in central nervous system-infiltrating T cells and glial cells is associated with active disease in multiple sclerosis. *Am J Pathol*. **172**: 146-155.

U

- Umesaki Y, Setoyama H, Matsumoto S, Okada Y. 1993. Expansion of alpha beta T-cell receptor-bearing intestinal intraepithelial lymphocytes after microbial colonization in germ-free mice and its independence from thymus. *Immunology*. **79**: 32-37.

V

- Vallino A, Dos Santos A, Mathé CV, Garcia A, Morille J, Dugast E, Shah SP, Héry-Arnaud G, Guilloux CA, Gleeson PJ, Monteiro RC, Soulillou JP, Harb J, Bigot-Corbel E, Michel L, Wiertlewski S, Nicot AB, Laplaud DA, Berthelot L. 2020. Gut bacteria *Akkermansia* elicit a specific IgG response in CSF of patients with MS. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*. **7**: e688.
- Vanhaecke T, Aubert P, Grohard PA, Durand T, Hulin P, Paul-Gilloteaux P, Fournier A, Docagne F, Ligneul A, Fressange-Mazda C, Naveilhan P, Boudin H, Le Ruyet P, Neunlist M. 2017. L.

fermentum CECT 5716 prevents stress-induced intestinal barrier dysfunction in newborn rats. *Neurogastroenterol Motil.* **29**.

Vanuytsel T, van Wanrooy S, Vanheel H, Vanormelingen C, Verschueren S, Houben E, Salim Rasoel S, Tóth J, Holvoet L, Farré R, Van Oudenhove L, Boeckxstaens G, Verbeke K, Tack J. 2014. Psychological stress and corticotropin-releasing hormone increase intestinal permeability in humans by a mast cell-dependent mechanism. *Gut.* **63**: 1293-1299.

Viglietta V, Baecher-Allan C, Weiner HL, Hafler DA. 2004. Loss of functional suppression by CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. *J Exp Med.* **199**: 971-979.

W

Wacker M, Holick MF. 2013. Sunlight and Vitamin D. *Dermatoendocrinol.* **5**: 51-108.

Walsh CP, Bovbjerg DH, Marsland AL. 2021. Glucocorticoid resistance and β 2-adrenergic receptor signaling pathways promote peripheral pro-inflammatory conditions associated with chronic psychological stress: A systematic review across species. *Neurosci Biobehav Rev.* **128**: 117-135.

Wang W, Ji P, Dow KE. 2003. Corticotropin-releasing hormone induces proliferation and TNF-alpha release in cultured rat microglia via MAP kinase signalling pathways. *J Neurochem.* **84**: 189-195.

Warren S, Greenhill S, Warren KG. 1982. Emotional stress and the development of multiple sclerosis: case-control evidence of a relationship. *J Chronic Dis.* **35**: 821-831.

Weible AP, Piscopo DM, Rothbart MK, Posner MI, Niell CM. 2017. Rhythmic brain stimulation reduces anxiety-related behavior in a mouse model based on meditation training. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **114**: 2532-2537.

Wekerle H. 2017. Brain Autoimmunity and Intestinal Microbiota: 100 Trillion Game Changers. *Trends Immunol.* **38**: 483-497.

Whitacre CC, Dowdell K, Griffin AC. 1998. Neuroendocrine influences on experimental autoimmune encephalomyelitis. *Ann N Y Acad Sci.* **840**: 705-716.

Whitham RH, Bourdette DN, Hashim GA, Herndon RM, Ilg RC, Vandenbark AA, Offner H. 1991. Lymphocytes from SJL/J mice immunized with spinal cord respond selectively to a peptide of proteolipid protein and transfer relapsing demyelinating experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol.* **146**: 101-107.

Willenborg DO, Fordham S, Bernard CC, Cowden WB, Ramshaw IA. 1996. IFN-gamma plays a critical down-regulatory role in the induction and effector phase of myelin oligodendrocyte glycoprotein-induced autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol.* **157**: 3223-3227.

Wyatt J, Vogelsang H, Hübl W, Waldhöer T, Lochs H. 1993. Intestinal permeability and the prediction of relapse in Crohn's disease. *Lancet.* **341**: 1437-9.

X

Xiao R, Bergin SM, Huang W, Mansour AG, Liu X, Judd RT, Widstrom KJ, Queen NJ, Wilkins RK, Siu JJ, Ali S, Caligiuri MA, Cao L. 2019. Enriched environment regulates thymocyte development and alleviates experimental autoimmune encephalomyelitis in mice. *Brain Behav Immun.* **75**: 137-148.

Y

Yamasaki R, Lu H, Butovsky O, Ohno N, Rietsch AM, Cialic R, Wu PM, Doykan CE, Lin J, Cotleur AC, Kidd G, Zorlu MM, Sun N, Hu W, Liu L, Lee JC, Taylor SE, Uehlein L, Dixon D, Gu J, Floruta CM, Zhu M, Charo IF, Weiner HL, Ransohoff RM. 2014. Differential roles of microglia and monocytes in the inflamed central nervous system. *J Exp Med.* **211**: 1533-1549.

Yamout B, Itani S, Hourany R, Sibaii AM, Yaghi S. 2010. The effect of war stress on multiple sclerosis exacerbations and radiological disease activity. *J Neurol Sci.* **288**: 42-44.

Yokote H, Miyake S, Croxford JL, Oki S, Mizusawa H, Yamamura T. 2008. NKT cell-dependent amelioration of a mouse model of multiple sclerosis by altering gut flora. *Am J Pathol.* **173**: 1714-1723.

Yu G, Zheng S, Zhang H. 2018. Inhibition of myeloperoxidase by N-acetyl lysyltyrosylcysteine amide reduces experimental autoimmune encephalomyelitis-induced injury and promotes oligodendrocyte regeneration and neurogenesis in a murine model of progressive multiple sclerosis. *Neuroreport.* **29**: 208-213.

Yura M, Takahashi I, Serada M, Koshio T, Nakagami K, Yuki Y, Kiyono H. 2001. Role of MOG-stimulated Th1 type "light up" (GFP+) CD4+ T cells for the development of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *J Autoimmun.* **17**: 17-25.

Z

Zamvil S, Nelson P, Trotter J, Mitchell D, Knobler R, Fritz R, Steinman L. 1985. T-cell clones specific for myelin basic protein induce chronic relapsing paralysis and demyelination. *Nature.* **317**: 355-358.

Zappulla JP, Arock M, Mars LT, Liblau RS. 2002. Mast cells: new targets for multiple sclerosis therapy? *J Neuroimmunol.* **131**: 5-20.

Zhang S, Zeng X, Yang H, Hu G, He S. 2012. Mast cell tryptase induces microglia activation via protease-activated receptor 2 signaling. *Cell Physiol Biochem.* **29**: 931-940.

Zheng D, Liwinski T, Elinav E. 2020. Interaction between microbiota and immunity in health and disease. *Cell Res.* **30**: 492-506.

- Zheng D, Liwinski T, Elinav E. 2020. Interaction between microbiota and immunity in health and disease. *Cell Res.* **30**: 492-506.
- Ziv Y, Ron N, Butovsky O, Landa G, Sudai E, Greenberg N, Cohen H, Kipnis J, Schwartz M. 2006. Immune cells contribute to the maintenance of neurogenesis and spatial learning abilities in adulthood. *Nat Neurosci.* **9**: 268-275.
- Zouali M. 2008. B lymphocytes - chief players and therapeutic targets in autoimmune diseases. *Front Biosci.* **13**: 4852-4861.
- Zundler S, Becker E, Schulze LL, Neurath MF. 2019. Immune cell trafficking and retention in inflammatory bowel disease: mechanistic insights and therapeutic advances. *Gut.* **68**: 1688-1700.
- Zundler S, Schillinger D, Fischer A, Atreya R, López-Posadas R, Watson A, Neufert C, Atreya I, Neurath MF. 2017. Blockade of $\alpha E\beta 7$ integrin suppresses accumulation of CD8⁺ and Th9 lymphocytes from patients with IBD in the inflamed gut in vivo. *Gut.* **66**: 1936-1948.

Stress et inflammation intestinale dans des modèles murins de sclérose en plaques

RESUME

La sclérose en plaques (SEP) est une maladie auto-immune démyélinisante du système nerveux central. Bien que l'étiologie de cette pathologie reste inconnue, de nombreux facteurs de risques ont été identifiés tels que le stress psychologique et une dysbiose intestinale. En effet, des données cliniques montrent que le stress serait associé à un plus grand risque d'apparition et d'aggravation de la pathologie. Cependant, le risque diffère en fonction du type de stress utilisé dans les modèles murins de SEP, et peu d'études se sont intéressées à évaluer des stratégies de réduction du stress dans ceux-ci. De plus, des travaux récents montrent que l'inflammation intestinale serait impliquée dans la mise en place de la réaction auto-immune. Il apparaît donc pertinent de savoir si cette inflammation intestinale (caractérisée par une augmentation de l'expression de la protéine MAdCAM-1 « Mucosal Addressin Cell Adhesion Molecule-1 ») peut prédire l'apparition et l'évolution de la SEP.

Ainsi, les objectifs mon doctorat ont été : 1) de caractériser les effets d'un stress aigu et d'une stratégie de réduction du stress (l'enrichissement environnemental) dans l'évolution d'un modèle murin de SEP ; 2) d'évaluer l'inflammation intestinale en lien avec les symptômes moteurs de la pathologie, dans les deux principaux modèles murins de SEP.

Ces travaux nous ont permis de mettre en évidence un effet délétère d'un stress aigu répété sur l'incidence des rechutes dans un modèle murin de SEP, que l'enrichissement environnemental était en mesure de contrecarrer. Dans la seconde étude, nous avons montré, grâce à de l'imagerie par résonance magnétique moléculaire dirigée contre la protéine MAdCAM-1, une augmentation de l'inflammation intestinale avec les symptômes moteurs dans les modèles animaux de SEP. De plus, une diminution des populations lymphocytaires B et Th dans l'iléon parallèlement à leur augmentation dans la moelle épinière a été observée au cours de l'évolution de la maladie. Enfin, nous avons montré que la persistance d'une inflammation intestinale entraînait des formes récurrentes-rémittentes de la pathologie tandis qu'une diminution de celle-ci était associée à une augmentation du risque de conversion vers une forme secondairement progressive.

Ainsi, ces résultats ouvrent la voie à davantage d'investigations quant aux effets du stress et de l'inflammation intestinale dans la SEP. Des stratégies visant à contrôler ces deux facteurs pourraient à terme permettre d'optimiser la prise en charge de la pathologie.

Mots clés : Sclérose en plaques ; Encéphalomyélite autoimmune expérimentale ; Stress psychologique ; Enrichissement environnemental ; Axe intestin-cerveau ; Inflammation intestinale ; IRM moléculaire.

Stress and intestinal inflammation in animal models of multiple sclerosis

ABSTRACT

Multiple sclerosis (MS) is an autoimmune disease of the central nervous system. Although the exact etiology of the disease remains unknown, several risk factors have already been identified such as psychological stress and intestinal dysbiosis. Indeed, clinical data support a link between stressful events and the risk of development and/or aggravation of the disease. The stress-induced effects on the disease depends of the stressful event used in animal models of MS and none studies have investigated the consequences of stress reduction strategies on those animal models. Furthermore, recent evidence suggest that an intestinal inflammation could be implicated in the development of the autoimmune reaction. Therefore, studying the impact of intestinal inflammation (characterized by an increased expression of MAdCAM-1 "Mucosal Addressin Cell Adhesion Molecule-1") in the disease course would be pertinent.

Thus, the objectives of my doctorate were to: 1) characterize the impact of acute stress and a stress reduction strategy (environmental enrichment) on the disease course of an animal model of MS; 2) assess the intestinal inflammation according to motor symptoms of the disease, in the two main animal models of MS.

These studies have shown that repeated acute stress increases the relapse incidence in an animal model of MS. Furthermore, environmental enrichment could reverse stress effects. In a second part, we have shown, using molecular magnetic resonance imaging targeting MAdCAM-1, an increase of intestinal inflammation with the motor symptoms in animal models of MS. Furthermore, we observed a decrease in B and Th lymphocytes in the ileum concomitantly with their increase in the spinal cord during the disease. Finally, we showed that a maintenance of intestinal inflammation was associated with relapsing-remitting course of the disease while its decrease was associated with a higher risk of conversion to a secondary-progressive course.

Altogether, these results lead the way for further investigations regarding the effect of stress and intestinal inflammation in MS. Especially, establishing new strategies to modulate the consequences of those two factors could provide better cares of the disease.

Key words : Multiple sclerosis; Experimental autoimmune encephalomyelitis; Psychological stress; Environmental enrichment; Gut-Brain axis; Intestinal inflammation; molecular MRI.