



**HAL**  
open science

# Évaluation de l'effet correcteur d'un extrait polyphénolique de pépins de raisin dans un modèle murin de sclérose en plaques, l'encéphalomyélite auto-immune expérimentale

Maha Mabrouk

► **To cite this version:**

Maha Mabrouk. Évaluation de l'effet correcteur d'un extrait polyphénolique de pépins de raisin dans un modèle murin de sclérose en plaques, l'encéphalomyélite auto-immune expérimentale. Sciences pharmaceutiques. Université Clermont Auvergne; Université de Tunis El Manar, 2022. Français. NNT: 2022UCFAC111 . tel-04474642

**HAL Id: tel-04474642**

**<https://theses.hal.science/tel-04474642>**

Submitted on 23 Feb 2024

**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.

**UNIVERSITÉ DE TUNIS EL MANAR  
FACULTÉ DES SCIENCES DE TUNIS**

École doctorale des Sciences et Technologies du Vivant, Sciences de la Terre

**UNIVERSITÉ CLERMONT AUVERGNE**

École doctorale des Sciences de la Vie, Santé, Agronomie, Environnement

**THÈSE DE DOCTORAT EN COTUTELLE**

Présentée en vue d'obtention du grade de

**Docteur en Sciences Biologiques (Tunisie)**

**Docteur d'Université en Sciences du Médicament (France)**

Par

**Maha MABROUK**

*Évaluation de l'effet correcteur d'un extrait polyphénolique de pépins de raisin dans un modèle murin de sclérose en plaques, l'encéphalomyélite auto-immune expérimentale*

*Soutenue le 14/12/2022 à l'Université Clermont Auvergne devant le jury :*

**Rapporteur :** Pr Mossadok BEN-ATTIA  
**Rapporteur :** Dr Virginie BERAY-BERTHAT  
**Directeur de thèse :** Pr Laurence DAULHAC-TERRAIL  
**Directeur de thèse :** Pr Meherzia MOKNI  
**Co-directeur de thèse :** Dr Méлина BEGOU  
**Co-directeur de thèse :** Dr Mohamed EL AYED

Laboratoire de Pharmacologie Fondamentale et Clinique de la Douleur  
Neuro-Dol UMR 1107 INSERM/UCA  
Facultés de Médecine et de Pharmacie, Clermont-Ferrand, France

Laboratoire des Substances Bioactives (LSBA)  
Centre de Biotechnologie de Borj Cédria (CBBC), Tunisie



*Les travaux de Thèse présentés ont été réalisés dans les laboratoires suivants :*

*Laboratoire de Pharmacologie Fondamentale et Clinique de la Douleur*

*Neuro-Dol UMR 1107 INSERM/Université Clermont Auvergne*

*Facultés de Médecine et de Pharmacie, Clermont-Ferrand, France*

*Sous la direction de :*

*Pr Laurence DAULHAC-TERRAIL*

*Dr Mélina BEGOU*

*Laboratoire des Substances Bioactives (LSBA)*

*Centre de Biotechnologie de Borj Cédria (CBBC), Tunisie*

*Faculté des Sciences de Tunis*

*Sous la direction de :*

*Pr Meherzia MOKNI*

*Dr Mohamed El AYED*

*Plateforme Protéomique PISSARO, Institut de Recherche et d'Innovation Biomédicale,*

*Normandie Université, Mont Saint Aignan, France.*

*Ce travail a été rendu possible financièrement par le soutien du :*

*Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique(Tunisie)*

*Université de Tunis El Manar (UTM) et Faculté des Sciences de Tunis (FST)*

*Programme du Partenariat Hubert Curien « Utique » 'PHC-UTIQUE 2020' :*

*Campus France et Ministère de l'Europe et des Affaires Etrangères français*

*CAP 20-25, programme WOW, Université Clermont Auvergne*



## *Dédicaces*

*Tout d'abord, louange à « Allah » qui m'a tracé le chemin de ma vie et qui sans sa miséricorde, ce travail n'aura pas abouti.*

### *Mes chers parents*

*La lumière de mes yeux, l'ombre de mes pas et le bonheur de ma vie, ma mère, Ilhem qui m'a apporté ses appuis durant toutes mes années d'étude, pour ses sacrifices et soutien qui m'a donné confiance, courage et sécurité.*

*Mon cher père, Mohamed Ali qui m'a appris le sens de la persévérance tout au long de mes études, pour son amour, ses sacrifices, ses conseils et ses encouragements.*

*Je dédie cette thèse à :*

### *Mon cher mari Moncef*

*Pour ton amour, ta patience et ta compréhension. Grâce à tes encouragements et tes conseils ce travail a vu le jour. Je te remercie infiniment pour tout et j'espère avoir été digne de ta confiance.*

### *Ma petite ange, mon cœur, ma vie, ma fille Sarah*

*Tu es ma source de bonheur et mon joie de vivre, tu es le plus beau cadeau du ciel, tu me donne le sens de ma vie et le courage pour avancer, je t'aime de tout mon cœur ma princesse.*

### *Mes chères Sœurs*

*Ma sœur Safa pour leur affection, compréhension et patience et mon ange et ma petite sœur Asil. Je t'aime fort et les mots ne suffisent guère pour exprimer l'attachement, l'amour et l'affection que je porte pour vous.*

### *Mes chers grands-parents*

*Pour ses conseils et encouragements.*

### *Ma belle-famille*

*Spécialement mon cher beau père Abdelwaheb et ma chère belle mère Nasra  
En témoignage de votre aide, et de votre compréhension de ma situation, je vous dédie ce travail.*

### *Mes chers directeurs de thèse*

*Pour vos aides, vos confiances, vos conseils et vos encouragements durant les moments difficiles. Grâce à vous qui a fait de moi le chercheur que je suis.*

*A tous mes amis et à tous ceux qui nous ont témoigné leurs affectations et leur soutien durant ces longues années.*

*A tous mes professeurs durant le long de mes études*

*Et finalement, pour tous ceux et celles qui ont fait des sacrifices au nom de la science*



## *Remerciements*

Avant toute chose, je remercie *Dieu*, le tout puissant, pour m'avoir donné la force et la patience d'accomplir ce modeste travail.

Je tiens à remercier Monsieur le Professeur **Mossadok BEN-ATTIA** pour l'honneur qu'il m'a fait en acceptant de présider ce jury de thèse. Vous demeurez toujours pour nous un exemple à suivre pour vos qualités scientifiques et humaines. Veuillez trouver ici l'expression de mon estime et ma considération.

J'adresse aussi mes vifs remerciements à Monsieur le Professeur **Mossadok BEN-ATTIA** et à Madame le Docteur **Virginie BERAY-BERTHAT** pour avoir accepté être rapporter de cette thèse. Je vous remercie pour le temps consacré pour juger ce travail et pour l'honneur de l'évaluer.

Je tiens à adresser mes remerciements à Madame le Professeur **Laurence DAULHAC-TERRAIL**, professeur à l'Université Clermont Auvergne. Vous m'avez fait un grand bonheur en acceptant de diriger et de juger ce travail et de me faire bénéficier de votre savoir et de vos compétences. J'ai pour vous le respect qu'impose votre mérite et vos qualités aussi bien humaines que professionnelles.

Je me fais un devoir d'exprimer mes sentiments de gratitude les plus sincères à Madame le Docteur **Mélina BEGOU**, ma co-directrice de thèse au laboratoire NEURO-DOL, au sein de l'équipe Pharmacologie Fondamentale et Clinique de la Douleur, pour la confiance qu'elle m'a accordée tout au long de ces années. J'ai beaucoup apprécié la liberté qu'elle m'a laissée dans l'orientation de ce travail. Je lui suis également reconnaissant de son aide scientifique, de ses conseils, de sa rigueur scientifique. Je la remercie également pour le temps qu'elle a bien voulu me consacrer et les longues heures de travail pour ce manuscrit.

Je tiens à adresser mes remerciements à Madame le Professeur **Meherzia MOKNI**, ma directrice de thèse en Tunisie. Vous m'avez fait un grand bonheur en acceptant de diriger cette thèse et de me faire bénéficier de votre savoir et de vos compétences. J'ai pour vous le respect qu'impose votre mérite et vos qualités aussi bien humaines que professionnelles. Je vous remercie aussi pour votre amitié envers moi, pour vos conseils et votre aide durant les moments difficiles.

Je remercie également mon co-encadreur Monsieur le Docteur **Mohamed EL AYED** maître assistant au Laboratoire des Substances Bioactives de m'avoir accueilli, guidé et soutenu tout le long de ces années.

Je tiens à remercier vivement Monsieur le Professeur **Denis ARDID** de m'avoir accueillie au laboratoire NEURO-DOL.

Mes sincères remerciements sont destinés aussi à Madame le Professeur **Oifa TABBENE**, directrice du Laboratoire des substances bioactives (LSBA), pour l'accueil dans son laboratoire.

Ma gratitude, mon profond respect et mes remerciements envers Monsieur le Professeur **Ezzedine AOUANI** pour sa modestie et pour ces qualités scientifiques et humaines.

Je tiens aussi de remercier vivement Monsieur le Professeur **Thierry JOUENNE** et Monsieur le Professeur **Pascal COSETTE** de m'avoir accueillie à la plateforme protéomique PISSARO, pour avancer la partie protéomique de cette thèse. Vraiment merci pour votre aide, vos conseils et surtout pour cette collaboration.

Je remercie très chaleureusement tous les membres du laboratoire des substances bioactives au centre de biotechnologie de Borj- Cédria pour leurs conseils ainsi, que leurs encouragements et en particulier le de son soutien et de ces précieux conseils.

Je tiens à exprimer mes remerciements à **Safwen KADRI** pour ces directives et conseils judicieux, ainsi pour l'inspiration, l'aide et le temps qu'il a bien voulu me consacrer au début surtout lors du choix de mon sujet de thèse.

Je remercie très chaleureusement tous les membres du laboratoire NEURO-DOL, mes collègues et mes amis de l'open space étudiants pour les moments que nous avons passé ensemble, pour leurs conseils ainsi, que leurs encouragements. Je tiens tout particulièrement à vous remercier pour le soutien que vous m'avez apporté dans les bons comme dans les mauvais moments.

Je tiens à exprimer mes remerciements à **Amélie DEMOSTHENES** ma collègue au sein de NEURO-DOL. Sans elle et sans encadrement, je n'arrive pas à réussir mes premiers pats dans le monde théorique. Merci pour tes directives et conseils judicieux, ainsi pour l'inspiration, l'aide et le temps qu'il a bien voulu me consacrer et je te souhaite le meilleur pour ta vie professionnelle.

Je tiens à exprimer mes vifs remerciements à tous mes professeurs qui ont contribué à ma formation.

Je n'oublie pas mon cher père **Mohamed Ali**, ma chère mère **Ihem**, et mes deux sœurs **Safa** et **Assil** pour leur contribution, leur soutien et leur patience.

A mes parents, qu'ils voient en ce travail le témoignage de ma reconnaissance pour leur soutien inconditionnel et de ma volonté de ne jamais les décevoir.

A mon mari **Moncef** qui, à mes côtés durant les moments difficiles, affronte sans broncher, examen après examen, les doutes, les répétitions, les coups de stress et les coups de déprime, pour son infinie patience.

Mon petit cadeau du ciel qui est venue pour allumer mes nuits et me donner le courage pour avancer, ma fille **Sarah**.

MERCI !



## *Liste des publications et contributions scientifiques*

### Articles publiés

Mabrouk M, El Ayed M, Démosthènes A, Aissouni Y, Aouani E, Daulhac-Terrail L, Mokni M, Bégou M. Antioxidant effect of grape seed extract corrects experimental autoimmune encephalomyelitis behavioral dysfunctions, demyelination and glial activation. Front Immunol (2022) Sec Nutritional Immunology. doi: 10.3389/fimmu.2022.960355.

El Ayed M, Mabrouk M, Kadri S, Slama W, Jallouli S, Limam F. Gastro-protective Effect of Grape Seed Extract (*Vitis Vinifera*) against Ethanol Induced Ulcer and Oxidative Stress in Rat. Asian Journal of Ethnopharmacology and Medicinal Foods (2019) 5(2): 1-10.

El Ayed M, Kadri S, Mabrouk M, Aouani E, Elkahoui S. Protective effect of grape seed and skin extract against high-fat diet-induced dyshomeostasis of energetic metabolism in rat lung. Lipids Health Dis (2018)17(1). doi:10.1186/s12944-018-0754-0.

Kadri S, El Ayed M, Mabrouk M, Limam F, Elkahoui S, Aouani E, Mokni M. Characterization, anti-oxidative effect of grape seed powder and in silico affinity profiling of polyphenolic and extra-phenolic compounds for calpain inhibition. J Pharm Biomed Anal (2018) 164: 365-372.

### Liste des communications orales

Mabrouk M, Aouani E, El Ayed M, Mokni M, Aissouni Y, Terrail L, Bégou M. Curative effect of *Vitis Vinifera* Grape Seed extract in an Experimental Autoimmune Encephalomyelitis mouse model of multiple sclerosis. Journées de l'Ecole Doctorale 2021, Clermont-Ferrand, France, 27 Mai 2021.

### Liste des communications affichées

Mabrouk M, Kadri S, Elkahoui S, Aouani E, El Ayed M. Caractérisation biochimique de l'extrait de pépins de raisin. IV<sup>ème</sup> Congrès International de Biotechnologie et Valorisation des Bio-Ressources, Tabarka-Tunisie, 20-23 Mars 2018.

Mabrouk M, Démosthènes A, El Ayed M, Elkahoui S, Aouani E, Mokni M, Bégou M. Effet de l'extrait de pépin de raisin (GSE) dans un modèle murin optimisé de sclérose en plaques progressive primaire : Encéphalomyélite autoimmune expérimentale. IIV<sup>ème</sup> Congrès International de Biotechnologie et Valorisation des Bio- Ressources, Tabarka-Tunisie, 20-23 Mars 2019.

Mabrouk M, Aouani E, El Ayed M, Aissouni Y, Mokni M, Terrail L, M, Bégou M. Antioxydant and analgesic effects of *Vitis Vinifera* Grape Seed Extract in an Experimental Autoimmune Encephalomyelitis Mouse model of Multiple Sclerosis. IASP International Symposium 2021 (e-congres).

Mabrouk M, Aouani E, El Ayed M, Mokni M, Aissouni Y, Terrail L, Bégou M. Effect of *Vitis Vinifera* Grape Seed Extract on motor and sensitive behaviours in an experimental autoimmune encephalomyelitis mouse model. Société Française de Pharmacologie et de Thérapeutique, 15-16 Juin 2021(e-congres).

Mabrouk M, Aouani E, El Ayed M, Mokni M, Aissouni Y, Terrail L, Bégou M. Effect of *Vitis Vinifera* Grape Seed Extract on brain and spinal cord demyelination and oxidative stress parameters in an experimental autoimmune encephalomyelitis mouse model. XV<sup>ème</sup> European Meeting on Glial Cells in Health and Diseases, 1-9 July 2021(e-congres).

Mabrouk M, Démosthènes A, El Ayed M, Aissouni Y, Aouani E, Mokni M, Daulhac-Terrail L, Bégou M. The antioxidant effect of grape seed extract (GSE) corrects experimental autoimmune encephalomyelitis sensitive dysfunctions and neuropathological processes. World congress of the International Association for the Study of Pain (IASP), Toronto, Canada, September 19-23 2022.

## *Table des matières*

<b>Introduction générale.....</b>	<b>1</b>
<b>Partie 1 : Synthèse bibliographique.....</b>	<b>4</b>
<b>I. La sclérose en plaques.....</b>	<b>5</b>
1. Définition.....	5
2. Historique.....	5
3. Epidémiologie.....	7
3.1. Prévalence en France.....	8
3.2. Prévalence en Tunisie.....	9
4. Facteurs de risque.....	9
4.1. Facteurs environnementaux.....	9
4.1.1. Infection virale.....	9
4.1.2. Localisation géographique.....	10
A. Gradient de prévalence en fonction de la latitude.....	10
B. Rôle clé de l'adolescence et populations migrantes.....	11
4.1.3. Mode de vie.....	11
A. Régime alimentaire.....	11
B. Tabagisme.....	12
4.2. Facteurs génétiques.....	13
4.2.1. Complexe majeur d'histocompatibilité.....	13
4.2.2. Autres gènes.....	13
5. Physiopathologie de la sclérose en plaques.....	14
5.1. Généralités sur l'organisation du système nerveux central.....	14
5.2. Anatomopathologie de la sclérose en plaques : types de lésions observés.....	19
5.3. Progression de la sclérose en plaques.....	21
5.4. Hypothèses étiologiques.....	22
5.5. Pathogenèse de la sclérose en plaques : Mécanismes cellulaires et moléculaires.....	24
5.5.1. Implication de la réponse immune et inflammatoire.....	24
A. Immunité adaptative.....	24
B. Immunité innée.....	25
5.5.2. Démyélinisation et remyélinisation.....	26
A. Démyélinisation.....	26
B. Remyélinisation.....	27
5.5.3. Neurodégénérescence.....	28
A. Neurodégénérescence primaire.....	28
B. Neurodégénérescence secondaire à la réponse immunitaire et à l'inflammation.....	29
a. Atteinte axonale dépendante de la démyélinisation.....	29
b. Atteinte axonale indépendante de la démyélinisation.....	30
5.5.4. Stress oxydant.....	31

A.	Généralités sur le stress oxydant.....	31
B.	Les radicaux libres.....	32
C.	La défense antioxydante.....	34
a.	Antioxydants enzymatiques (primaires).....	34
•	La superoxyde dismutase.....	34
•	La glutathion peroxydase.....	35
•	La catalase.....	35
b.	Antioxydants non enzymatiques (secondaires).....	35
D.	Stress oxydant en tant que lien entre inflammation et neurodégénérescence dans le cas de sclérose de plaques.....	35
6.	Présentations cliniques .....	38
6.1.	Formes cliniques.....	38
6.1.1.	Forme récurrente-rémittente (SEP-RR).....	38
6.1.2.	Formes progressives.....	39
A.	Formes secondaires progressives (SEP-SP).....	39
B.	Formes progressive primaire (SEP-PP).....	39
6.2.	Symptômes.....	40
6.2.1.	Phase initiale.....	41
6.2.2.	Phase d'état.....	42
6.2.3.	Les troubles sensitifs et le cas particulier de la douleur.....	44
A.	Les douleurs par excès de nociception.....	45
B.	Les douleurs neuropathiques.....	45
C.	Les douleurs mixtes.....	46
6.3.	Le diagnostic.....	46
7.	Prise en charge thérapeutique de la sclérose en plaques : progrès et limites.....	49
7.1.	Traitements actuels.....	49
7.1.1.	Traitements de la crise.....	49
7.1.2.	Traitements de fond.....	50
A.	Traitements de première ligne : les immunomodulateurs.....	50
B.	Traitements de seconde ligne : les immunosuppresseurs.....	53
7.1.3.	Les traitements symptomatiques.....	55
7.2.	Pistes thérapeutiques actuellement explorées.....	56
7.2.1.	Essais thérapeutiques en cours.....	57
A.	La simvastatine.....	57
B.	L'ibudilast.....	57
C.	La phénytoïne.....	57
7.2.2.	Le stress oxydant et les polyphénols.....	58
A.	Les flavonoïdes.....	61
B.	Le resvératrol.....	62
<b>II.</b>	<b>L'extrait de pépins de raisin ou « Grape Seed Extract » (GSE).....</b>	<b>65</b>
1.	Situation socio-économique du raisin et du vignoble.....	65
2.	Historique.....	66

3.	Composition biochimique des pépins de raisin.....	67
4.	Effets biologiques de l'extrait de pépins de raisin : données précliniques.....	68
4.1.	Effet antioxydant.....	69
4.2.	Effet anti- inflammatoire.....	69
4.3.	Effet organoprotecteur.....	70
5.	Données cliniques sur les effets biologiques de l'extrait de pépins de raisin.....	74
5.1.	Effets thérapeutiques.....	74
5.2.	Sécurité d'utilisation.....	76
6.	Intérêts potentiels de l'extrait de pépins de raisin dans la sclérose en plaques.....	76
<b>III.</b>	<b>Modèles animaux de la sclérose en plaques.....</b>	<b>78</b>
1.	Généralités.....	78
1.1.	Les modèles de démyélinisation induite par des virus.....	80
1.2.	Les modèles de démyélinisation induite par des toxines.....	80
1.3.	L'encéphalomyélite auto-immune expérimentale.....	81
2.	L'encéphalomyélite auto-immune expérimentale.....	82
2.1.	Historique et généralités.....	82
2.2.	L'encéphalomyélite auto-immune expérimentale murine.....	83
2.2.1.	Par immunisation passive.....	83
2.2.2.	Par immunisation active.....	84
3.	Les modèles souris d'encéphalomyélite auto-immune expérimentale utilisés pour l'évaluation des troubles sensitifs.....	86
3.1.	Présentation générale.....	86
3.2.	Modèles d'encéphalomyélite auto-immune à poussée unique (EAE-CP) .....	89
4.	Limites des modèles EAE.....	92
	<b>Partie 2 : Matériels et Méthodes.....</b>	<b>94</b>
<b>I.</b>	<b>Caractérisation de l'extrait de pépins de raisin.....</b>	<b>95</b>
1.	Matériel végétal : Poudre de pépins de raisin.....	95
2.	Extraction des composés phénoliques.....	95
3.	Calcul du rendement massique.....	95
4.	Fractionnement de l'extrait de pépins de raisin.....	95
5.	Dosage des polyphénols totaux, flavonoïdes totaux et tanins condensés.....	97
6.	Détermination de l'activité antioxydante in vitro de l'extrait de pépins de raisin.....	98
7.	Identification des composés de l'extrait de pépins de raisin par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse.....	99
<b>II.</b>	<b>Induction de l'encéphalomyélite auto-immune expérimentale et traitement curatif précoce à l'extrait de pépins de raisin.....</b>	<b>100</b>
1.	Animaux.....	100
2.	Induction et évaluation de l'encéphalomyélite auto-immune expérimentale.....	100
3.	Traitement curatif précoce.....	101
<b>III.</b>	<b>Etude comportementale.....</b>	<b>102</b>
1.	Evaluation des troubles sensitifs.....	102

2.	Evaluation des troubles moteurs.....	103
3.	Evaluation des troubles cognitifs.....	104
<b>IV.</b>	<b>Etude biochimique.....</b>	<b>105</b>
1.	Prélèvement des tissus, extraction et dosage des protéines totales.....	105
2.	Dosage des indicateurs du stress oxydant et des activités antioxydantes.....	106
2.1.	Indicateurs du stress oxydant.....	106
2.1.1.	Lipoperoxydation des lipides par dosage du malondialdéhyde.....	106
2.1.2.	Carbonylation des protéines.....	106
2.2.	Activités des principales enzymes antioxydantes.....	107
2.2.1.	Activité de la superoxyde dismutase.....	107
2.2.2.	Activité de la catalase.....	107
2.2.3.	Activité de la glutathion peroxydase.....	108
<b>V.</b>	<b>Etudes protéiques.....</b>	<b>108</b>
1.	Western blot.....	108
2.	Etude protéomique.....	109
2.1.	Extraction des protéines.....	110
2.2.	Détermination de la concentration en protéines.....	111
2.3.	Migration des protéines et digestion enzymatique en gel.....	111
2.4.	Label Free.....	112
2.5.	Identification des protéines.....	114
2.6.	Quantification sans étiquette relative à l'aide du logiciel Progenesis LC-MS.....	115
<b>VI.</b>	<b>Analyse des données.....</b>	<b>116</b>
<b>Partie 3 : Résultats.....</b>		<b>118</b>
<b>I.</b>	<b>Caractérisation de l'extrait de pépins de raisin.....</b>	<b>119</b>
1.	Rendements d'extraction.....	119
2.	Fractionnement de l'extrait de pépins de raisin.....	119
3.	Teneur en polyphénols totaux, flavonoïdes totaux et tanins condensés.....	120
4.	Activité antioxydante in vitro de l'extrait de pépins de raisin.....	120
5.	Identification des composés de l'extrait de pépins de raisin par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse.....	121
<b>II.</b>	<b>Evaluation de l'effet du traitement curatif à l'extrait de pépins de raisin sur le modèle d'encéphalomyélite auto- immune expérimentale.....</b>	<b>123</b>
1.	Analyse comportemental.....	123
1.1.	Effet du traitement curatif à l'extrait de pépins de raisin sur le poids corporel et le développement des signes cliniques chez les souris EAE.....	123
1.2.	Effet du traitement curatif à l'extrait de pépins de raisin sur l'hypersensibilité mécanique, la sensibilité à la chaleur et l'allodynie au froid chez les souris EAE.....	124
1.3.	Effet du traitement curatif à l'extrait de pépins de raisin sur l'activité locomotrice spontanée et la coordination motrice.....	126

1.4. Effet du traitement curatif à l'extrait de pépins de raisin sur la mémoire du travail et les comportements liés à l'anxiété.....	127
2. Evaluation biochimique sur le stress oxydant.....	128
2.1. Effet du traitement curatif à l'extrait de pépins de raisin sur la peroxydation lipidique au niveau du cerveau et de la moelle épinière chez les souris EAE.....	128
2.2. Effet du traitement curatif à l'extrait de pépins de raisin sur la carbonylation des protéines au niveau du cerveau et de la moelle épinière chez les souris EAE.....	130
3. Effet du traitement curatif à l'extrait de pépins de raisin sur les activités des enzymes antioxydantes et leurs expressions protéiques au niveau du cerveau et de la moelle épinière chez les souris EAE.....	131
3.1. Effet sur l'activité de la superoxyde dismutase et l'expression protéique de ses isoformes.....	131
3.2. Effet sur l'activité de la catalase et sur son expression protéique.....	135
3.3. Effet sur l'activité de la glutathion peroxydase et sur son expression protéique.....	137
4. Evaluation protéique sur les marqueurs physiopathologiques de l'encéphalomyélite auto-immune expérimentale.....	139
4.1. Effet sur l'expression des protéines de myéline.....	139
4.2. Effet sur l'activation astrocytaire et microgliale.....	141
4.3. Effet sur l'expression des sirtuines.....	143
5. Etude protéomique.....	145
5.1. Identification des protéines.....	145
5.2. Analyse quantitative globale et ciblée.....	147
5.3. Analyse d'enrichissement de l'ontologie des gènes.....	163
5.3.1. Analyse par processus biologiques.....	163
A. Au niveau du cerveau.....	163
B. Au niveau de la moelle épinière.....	166
5.3.2. Analyse par fonction moléculaire.....	168
A. Au niveau du cerveau.....	168
B. Au niveau de la moelle épinière.....	171
5.3.3. Analyse par composant cellulaire.....	173
A. Au niveau du cerveau.....	173
B. Au niveau de la moelle épinière.....	175
5.3.4. Analyses par voie métabolique.....	176
A. Au niveau du cerveau.....	176
B. Au niveau de la moelle épinière.....	178
<b>Partie 4 : Discussion.....</b>	<b>179</b>
<b>I. Le traitement curatif à l'extrait de pépins de raisin corrige les troubles comportementaux, la démyélinisation et l'activation gliale chez les souris atteintes</b>	

<b>d'encéphalomyélite auto-immune expérimentale du fait de ces propriétés antioxydantes.....</b>	<b>180</b>
1. Correction des troubles comportementaux.....	180
2. Un effet sur les symptômes cliniques médiés par ses propriétés antioxydantes.....	182
3. Correction de l'expression des protéines de la myéline, de la prolifération des cellules astrocytaires et microgliales et l'expression des sirtuines 1 et 2.....	184
4. Un traitement bien toléré ce qui est très encourageant pour une future utilisation clinique.....	186
<b>II. Quels sont les composés de l'extrait de pépins de raisin pouvant expliquer son effet thérapeutique.....</b>	<b>187</b>
1. Impact de la méthode d'extraction.....	187
2. Compositions de l'extrait de pépins de raisin.....	188
2.1. Phase polyphénolique.....	188
2.2. Phase lipidique.....	190
2.3. Phase aqueuse.....	191
3. Mesure biochimique des propriétés antioxydantes de l'extrait de pépins de raisin.....	193
<b>III. Premiers éléments d'analyse sur l'étude protéomique.....</b>	<b>193</b>
1. Confirmation des processus biologiques impliqués dans le développement de l'encéphalomyélite auto-immune expérimentale.....	193
2. Processus biologiques impliqués dans l'effet thérapeutique de l'extrait de pépins de raisin.....	195
3. Confirmation des résultats obtenus pour les processus biologiques par les analyses par composant cellulaire, fonction moléculaire et voies métaboliques.....	195
<b>Conclusion.....</b>	<b>197</b>
<b>Références bibliographiques.....</b>	<b>200</b>

## *Liste des tableaux*

Tableau 1 : Critères diagnostiques de la sclérose en plaques selon la version révisée en 2017 des critères de McDonald .....	47
Tableau 2 : Liste des traitements immunomodulateurs.....	51
Tableau 3 : Liste des traitements immunosupresseurs .....	54
Tableau 4 : Tableau récapitulatif des études cliniques et précliniques ayant évaluées l'effet des antioxydants non polyphénoliques.....	59
Tableau 5 : Tableau récapitulatif des études cliniques ayant évaluées les effets des plantes sur les symptômes de la sclérose en plaques .....	63
Tableau 6 : Tableau récapitulatif des études précliniques et cliniques évaluant les effets neuroprotecteurs, anti-inflammatoires et anti-oxydants des plantes et extraits de plantes dans le cas de la sclérose en plaques.....	64
Tableau 7 : Composition phénolique selon les différentes parties du raisin.....	68
Tableau 8 : Résumé des études portant sur l'effet neuroprotecteur de l'extrait de pépins de raisin (GSE) et de l'extrait de peau et de pépins de raisin (GSSE).....	73
Tableau 9 : Etudes cliniques illustrant l'effet de l'extrait de pépins de raisin (GSE).....	110
Tableau 10 : Etudes illustrant l'effet bénéfique de l'extrait de pépins de raisin (GSE) dans des modèles murins de sclérose en plaques.....	112
Tableau 11 : Comparaison de la moyenne des sous-échelles physiques mesurées dans les deux groupes .....	77
Tableau 12 : Comparaison de la moyenne des sous-échelles mentales mesurées dans les deux groupes.....	77
Tableau 13 : Protéines et lipides jouant le rôle d'auto-antigènes putatifs dans le modèle d'encéphalomyélite auto-immune expérimentale ou dans la sclérose en plaques .....	83
Tableau 14 : Les principaux modèles murins d'encéphalomyélite auto-immune expérimentale obtenus par immunisation active .....	85
Tableau 15 : Etudes précliniques ayant évalué les troubles sensitifs dans les modèles murins d'EAE chronique à poussée unique (EAE-CP) .....	91
Tableau 16 : Thérapies testées en clinique sans effet notable sur les symptômes de la sclérose en plaques.....	93
Tableau 17 : Moyenne de rendement massique d'extraction de l'extrait de pépins de raisin	119
Tableau 18 : Fraction phénolique, lipidique et aqueuse de l'extrait de pépins de raisin .....	158
Tableau 19 : Teneur en polyphénols totaux, flavonoïdes totaux et tannins condensés de l'extrait de pépins de raisin .....	159
Tableau 20 : Activité antioxydante de l'extrait de pépins de raisin selon quatre méthodes ..	159
Tableau 21 : Composés phénoliques identifiés par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse au niveau de l'extrait de pépins de raisin.....	160
Tableau 22 : Composés lipidiques identifiés par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse au niveau de l'extrait de pépins de raisin.....	161
Tableau 23 : Composés hydrosolubles identifiés par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse au niveau de l'extrait de pépins de raisin .....	161

Tableau 24 : Nombre de protéines identifiées et pourcentage de reproductibilité au niveau du cerveau et de la moelle épinière.....	185
Tableau 25 : Nombre de protéines dont l'abondance a été affectée au niveau du cerveau et de la moelle épinière.....	186
Tableau 26 : Nombre de protéines dérégulées au niveau du cerveau et de la moelle épinière en comparant les groupes deux à deux.....	187
Tableau 27: Protéines dont les niveaux d'expressions sont modifiés au niveau du cerveau des souris EAE + véhicule en comparaison aux souris CTL + véhicule.....	189
Tableau 28 : Protéines dont les niveaux d'expressions sont modifiés au niveau du cerveau des souris EAE + véhicule en comparaison aux souris EAE + GSE.....	195
Tableau 29 : Protéines dont les niveaux d'expression sont modifiés au niveau de la moelle épinière des souris EAE + véhicule en comparaison des souris CTL + véhicule.....	197
Tableau 30 : Protéines dont les niveaux d'expressions sont modifiés au niveau de la moelle épinière des souris EAE + véhicule en comparaison aux souris EAE + GSE.....	198
Tableau 31: Quantité en µg des composés identifiés dans la phase phénolique de l'extrait de pépins de raisin dans 200 µl d'extrait.....	188
Tableau 32 : Quantité en µg des composés lipidiques et hydrosolubles identifiés dans l'extrait de pépins de raisin dans 200 µl d'extrait.....	192

## Liste des figures

Figure 1 : Dessins des lésions de la moelle épinière .....	6
Figure 2 : Prévalence de la sclérose en plaques dans le monde .....	7
Figure 3 : Carte des prévalences régionales de la sclérose en plaques en France métropolitaine en 2012 pour 100 000 habitants .....	8
Figure 4 : Composants anatomiques majeurs du système nerveux central .....	15
Figure 5 : Représentation schématique de la structure d'un neurone .....	15
Figure 6 : Structure de la gaine de myéline.....	17
Figure 7 : Illustration des différents types de cellules gliales .....	18
Figure 8 : Les types de lésions observées dans le système nerveux central de patients atteints de la sclérose en plaques .....	20
Figure 9 : Etapes de progression de la sclérose en plaques.....	22
Figure 10 : Représentation schématique des différentes hypothèses étiologiques du développement de la sclérose en plaques.....	23
Figure 11 : Mécanismes immunitaire et inflammatoire de la sclérose en plaques.....	59
Figure 12 : Représentation schématique du niveau de myélinisation et des cellules associées dans les différents types de plaques retrouvées dans la sclérose en plaques .....	28
Figure 13 : Représentation schématique des processus métaboliques et homéostatiques clés dans un axone myélinisé sain par rapport à un axone chroniquement démyélinisé dans la sclérose en plaques.....	30
Figure 14 : Les mécanismes clés des processus à l'origine de la dégénérescence axonale ...	31
Figure 15 : Schéma des principaux radicaux libres et leurs effets sur les macromolécules et la défense antioxydante enzymatique .....	32
Figure 16 : Génération des espèces réactives de l'oxygène .....	33
Figure 17 : Mécanismes de la lésion oxydative dans la sclérose en plaques .....	37
Figure 18 : Représentation schématique des différentes formes de sclérose en plaques .....	73
Figure 19 : Représentation des symptômes de la sclérose en plaques en fonction du site de lésion observé.....	41
Figure 20 : Echelle de cotation du handicap chez les patients atteints de sclérose en plaques	44
Figure 21 : Imagerie par résonance magnétique axiale (a) des lésions hyperintenses pondérées en T2 (b) des lésions en anneau en T1 prenant le gadolinium.....	48
Figure 22 : Représentation schématique des stratégies thérapeutiques actuelles dans la sclérose en plaques.....	49
Figure 23 : Activation de la voie Nrf2 par le diméthyle fumarate .....	85
Figure 24 : Sites d'action potentiels des composés bioactifs antioxydants .....	58
Figure 25 : Les voies physiopathologiques de la sclérose en plaques pouvant être améliorées par les polyphénols .....	60
Figure 26 : Coupe longitudinale d'un pèpin de raisin mûrifié.....	67
Figure 27 : Diagramme schématique illustrant l'effet anti-inflammatoire de l'extrait de pèpins de raisin.....	70
Figure 28 : Mécanismes pathologiques induits par le stress oxydant au niveau du cerveau et effets potentiels de l'extrait de pèpins de raisin (GSE) et de l'extrait de peau et de pèpins de raisin (GSSE) .....	71

Figure 29 : Chronologie des étapes clés dans l’histoire des modèles animaux de sclérose en plaques .....	79
Figure 30 : Représentation schématique du modèle de démyélinisation induite par le le virus de l'encéphalomyélite murine de Theiler .....	80
Figure 31 : Représentation schématique des modèles de démyélinisation induite par des toxines.....	81
Figure 32 : Représentation schématique du décours temporel des symptômes dans les différents modèles d’encéphalomyélite auto-immune expérimentale murins utilisés pour l’étude des troubles sensitifs .....	88
Figure 33 : Représentation chronologique des décours temporels physiopathologique et clinique de la sclérose en plaques et de l'encéphalomyélite auto-immune expérimentale .....	92
Figure 34 : Protocole de préparation des différentes fractions.....	96
Figure 35 : Protocole expérimental .....	102
Figure 36 : Les différentes étapes expérimentales de l’étude protéomique .....	147
Figure 37 : Principe de la spectrométrie de masse en tandem .....	150
Figure 38 : Approche spectral counting pour la quantification des peptides .....	151
Figure 39 : Evolution du poids corporel.....	162
Figure 40 : Evolution du score clinique chez les souris EAE et leurs contrôles après le traitement curatif à l’extrait de pépins de raisin.....	162
Figure 41 : Evolution de l’allodynie mécanique par le test de von Frey chez les souris EAE et leurs contrôles après le traitement curatif à l’extrait de pépins de raisin.....	163
Figure 42 : Evaluation de la sensibilité à la chaleur par le test de la plaque chaude chez les souris EAE et leurs contrôles après le traitement curatif à l’extrait de pépins de raisin.	164
Figure 43 : Evaluation de l’alldynie au froid par le test de l’acétone sur la patte chez les souris EAE et leurs contrôles après un traitement curatif à l’extrait de pépins de raisin	164
Figure 44 : Evaluation de l’activité locomotrice spontanée par le test de l’open field (a) et par le test du labyrinthe en Y (b) chez les souris EAE et leurs contrôles après un traitement curatif à l’extrait de pépins de raisin.....	165
Figure 45 : Evaluation de la coordination motrice par le test de rotarod chez les souris EAE et leurs contrôles après un traitement curatif au à l’extrait de pépins de raisin.....	165
Figure 46 : Evaluation de la mémoire du travail par le test du labyrinthe en Y chez les souris EAE et leurs contrôles après un traitement curatif à l’extrait de pépins de raisin.....	166
Figure 47 : Evaluation des comportements liés à l’anxiété lors du test du labyrinthe en Y (a), du test de l’open field (b) et du test du labyrinthe en croix surélevé chez les souris EAE et leurs contrôles après un traitement curatif à l’extrait de pépins de raisin.....	167
Figure 48 : Evaluation de la peroxydation des lipides au niveau du cerveau et de la moelle épinière à J20 et J30 post-induction chez les souris EAE et leurs contrôles après un traitement curatif à l’extrait de pépins de raisin.....	168
Figure 49 : Evaluation de la carbonylation des protéines au niveau du cerveau et de la moelle épinière à J20 et J30 post-induction chez les souris EAE et leurs contrôles après un traitement curatif à l’extrait de pépins de raisin.....	169

Figure 50 : Evaluation de l'activité superoxyde dismutase au niveau du cerveau et de la moelle épinière à J20 et J30 post-induction chez les souris EAE et leurs contrôles après un traitement curatif à l'extrait de pépins de raisin.....	171
Figure 51 : Evaluation de l'expression de SOD1 au niveau du cerveau et de la moelle épinière à J20 et J30 post-induction chez les souris EAE et leurs contrôles après un traitement curatif à l'extrait de pépins de raisin.....	172
Figure 52 : Evaluation de l'expression de SOD2 au niveau du cerveau et de la moelle épinière à J20 et J30 post-induction chez les souris EAE et leurs contrôles après un traitement curatif à l'extrait de pépins de raisin.....	173
Figure 53 : Evaluation de l'activité catalase au niveau du cerveau et de la moelle épinière à J20 et J30 post-induction chez les souris EAE et leurs contrôles après un traitement curatif à l'extrait de pépins de raisin .....	174
Figure 54 : Evaluation de l'expression de la catalase au niveau du cerveau et de la moelle épinière à J20 et J30 post-induction chez les souris EAE et leurs contrôles après un traitement curatif chronique à l'extrait de pépins de raisin .....	175
Figure 55 : Evaluation de l'activité glutathion peroxydase au niveau du cerveau et de la moelle épinière à J20 et J30 post-induction chez les souris EAE et leurs contrôles après un traitement curatif à l'extrait de pépins de raisin.....	176
Figure 56 : Evaluation de l'expression de la GPX1 au niveau du cerveau et de la moelle épinière à J20 et J30 post-induction chez les souris EAE et leurs contrôles après un traitement curatif à l'extrait de pépins de raisin.....	177
Figure 57 : Evaluation de l'expression de la protéine basique de la myéline au niveau du cerveau et de la moelle épinière à J20 et J30 post-induction chez les souris EAE et leurs contrôles après un traitement curatif à l'extrait de pépins de raisin.....	179
Figure 58 : Evaluation de l'expression de la 2',3'-nucléotide cyclique 3'-phosphodiesterase au niveau du cerveau et de la moelle épinière à J20 et J30 post-induction chez les souris EAE et leurs contrôles après un traitement curatif à l'extrait de pépins de raisin .....	180
Figure 59 : Evaluation de l'expression de la protéine acide fibrillaire gliale au niveau du cerveau et de la moelle épinière à J20 et J30 post-induction chez les souris EAE et leurs contrôles après un traitement curatif à l'extrait de pépins de raisin.....	181
Figure 60: Evaluation de l'expression de la molécule adaptatrice de liaison au calcium ionisé 1 au niveau du cerveau et de la moelle épinière aux J20 et J30 post-induction chez les souris EAE et leurs contrôles après un traitement curatif à l'extrait de pépins de raisin	182
Figure 61 : Evaluation de l'expression de la sirtuine 1 au niveau du cerveau et de la moelle épinière aux J20 et J30 post-induction chez les souris EAE et leurs contrôles après un traitement curatif à l'extrait de pépins de raisin.....	183
Figure 62 : Evaluation de l'expression de la sirtuine 2 au niveau du cerveau et de la moelle épinière aux J20 et J30 post-induction chez les souris EAE et leurs contrôles après un traitement curatif à l'extrait de pépins de raisin.....	184
Figure 63 : Diagramme de Venn de l'intersection des protéines identifiées dans le cerveau (A) et la moelle épinière (B) des souris EAE + véhicule .....	185
Figure 64 : Processus biologiques dérégulés au niveau du cerveau des souris EAE + véhicule en comparaison aux souris CTL + véhicule.....	203

Figure 65 : Processus biologiques pour lesquels l'expression des protéines est modifiée au niveau du cerveau des souris EAE + GSE en comparaison des souris EAE + véhicule	165
Figure 65 bis : Focus sur les processus biologiques pour lesquels l'expression des protéines est la plus modifiée au niveau du cerveau des souris EAE + GSE en comparaison des souris EAE + véhicule	166
Figure 66 : Processus biologiques dérégulés au niveau de la moelle épinière des souris EAE + véhicule en comparaison aux souris CTL + véhicule	167
Figure 67 : Processus biologiques pour lesquels l'expression des protéines est modifiée au niveau de la moelle épinière des souris EAE + GSE en comparaison aux souris EAE + véhicule	207
Figure 68 : Fonctions moléculaires dérégulées au niveau du cerveau des souris EAE + véhicule en comparaison aux souris CTL + véhicule	169
Figure 69 : Fonctions moléculaires pour lesquelles l'expression des protéines est modifiée au niveau du cerveau des souris EAE + GSE en comparaison aux souris EAE + véhicule	170
Figure 69 bis : Focus sur les fonctions moléculaires pour lesquelles l'expression des protéines est modifiée différemment au niveau du cerveau des souris EAE + GSE en comparaison aux souris EAE + véhicule	171
Figure 70 : Fonctions moléculaires dérégulées au niveau de la moelle épinière des souris EAE + véhicule en comparaison aux souris CTL + véhicule	172
Figure 71 : Fonctions moléculaires pour lesquelles l'expression des protéines est modifiée différemment au niveau de la moelle épinière des souris EAE + GSE en comparaison aux souris EAE + véhicule	173
Figure 72 : Composants cellulaires dans lesquels les protéines sont dérégulées au niveau du cerveau des souris EAE + véhicule en comparaison aux souris CTL + véhicule	174
Figure 73 : Composants cellulaires dans lesquels les protéines sont différemment exprimées au niveau du cerveau des souris EAE + GSE en comparaison aux souris EAE + véhicule	175
Figure 74 : Composants cellulaires dans lesquels les protéines sont dérégulées au niveau de la moelle épinière des souris EAE + véhicule en comparaison aux souris CTL + véhicule	175
Figure 75 : Composants cellulaires dans lesquels les protéines sont exprimées différemment au niveau de la moelle épinière des souris EAE + GSE en comparaison aux souris EAE + véhicule	176
Figure 76 : Voies métaboliques et/ou de signalisation cellulaire au sein desquelles les protéines sont dérégulées au niveau du cerveau des souris EAE + véhicule en comparaison aux souris CTL + véhicule	177
Figure 77 : Voies métaboliques et/ou de signalisation cellulaire au sein desquelles les protéines sont différemment exprimées au niveau du cerveau des souris EAE + GSE en comparaison aux souris EAE + véhicule	177
Figure 78 : Voies métaboliques et/ou de signalisation cellulaire au sein desquelles les protéines sont dérégulées au niveau de la moelle épinière des souris EAE + véhicule en comparaison aux souris CTL + véhicule	178

Figure 79 : Voies métaboliques et/ou de signalisation cellulaire au sein desquelles les protéines sont différemment représentées au niveau de la moelle épinière des souris EAE + GSE en comparaison aux souris EAE + véhicule ..... 178

## Liste des abréviations

### A

**Ac** : Anticorps

**ACN** : Acétonitrile

**ADCC** : *Antibody-dependent cellular cytotoxicity*/Cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps

**ADCP** : *Antibody-dependent cellular phagocytosis*/Phagocytose cellulaire dépendante des anticorps

**ADN** : Acide désoxyribonucléique

**ADP** : Adénosine diphosphate

**Ag** : Antigène

**AhR** : *Aryl Hydrocarbon Receptor*

**AMM** : Autorisation de la mise sur le marché

**ATP** : Adénosine triphosphate

### B

**BDNF** : *Brain Derived Neurotrophic Factor*/Facteur de croissance neurotrophique dérivé du cerveau

**BHE** : Barrière hémato-encéphalique

**BHT** : Hydroxytoluène butylé

**BSTFA** : N, O-bis (triméthylsilyl)-trifluoroacétamide

### C

**CAT** : Catalase

**CCL5** : Chimiochine (motif C–C) ligand 5

**CD** : Cluster de différenciation

**CDC** : *Complement-dependent cytotoxicity* / Cytotoxicité dépendante du complément

**CFA** : Adjuvant complet de Freund

**CHAPS** : 3-((3-Cholamidopropyl) diméthylammonio)-1-propanesulfonate

**CID** : Dissociation induite par collision

**CIS** : *Clinically isolated syndrome*/Syndrome cliniquement isolé

**CMH** : Complexe majeur d'histocompatibilité

**CNPase** : 2',3'-Cyclic-nucleotide 3'-phosphodiesterase/2',3'-nucléotide cyclique 3'-phosphodiesterase

**CPA** : Cellules présentatrices d'antigènes

**CTP** : Cytosine-5'-triphosphate

## ***D***

**DC** : *Dendritic cell*/ Cellules dendritiques

**DHODH** : Dihydroorotate déhydrogénase

**DL<sub>50</sub>** : Dose létale médiane

**DNPH** : 2,4-dinitrophénylhydrazine

**DTT** : Dichloro-diphényl-trichloro-éthane

**DTTP** : Deoxythymine-5'-triphosphate

## ***E***

**EAE** : Encéphalomyélite auto-immune expérimentale

**EAE-A** : EAE aigüe

**EAE-C** : EAE chronique

**EAE-CP** : EAE chronique avec une poussée unique

**EAE-RR** : EAE récurrent-rémittent

**EBV** : *Epstein-Barr Virus* /Virus Epstein-Barr

**EDSS** : *Expanded Disability Status Scale* / Echelle de statut d'invalidité étendue

**EDTA** : Ethylènediaminetétraacétique

**EGCG** : Epigallocatechine-3-gallate

**EGFR** : *Epidermal Growth Factor Receptor* / Récepteur du facteur de croissance épidermique

**EPM** : *Elevated plus maze*/ Labyrinthe en croix surélevé

**ER** : *Estrogen Receptor* / Récepteur aux estrogènes

**EtBr** : Bromure d'éthidium

## ***F***

**FLAIR** : *Fluid attenuated inversion recovery*/ récupération par inversion atténuée par les fluides

**FRAP** : Capacité de réduction ferrique

## ***G***

**GABA** : Acide gamma-aminobutyrique

**GAPDH** : Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase

**GC-MS** : Chromatographie en phase gazeuse couplé à la spectrométrie de masse

**GFAP** : Protéine acide fibrillaire gliale

**GPx** : Glutathion peroxydase

**GSE** : *Grape seed extract* /Extrait de pépins de raisin

**GSH** : Glutathion réduit

**GSSE** : *Grape seed and skin extract*/Extrait de peau et de pépins de raisin

**GWAS** : *Genome wide association studies* / analyse de génomes à haut débit

## **H**

**HCA2** : Acide hydroxycarboxylique de type 2

**HHV**: *Human herpes virus*/ Virus herpes humain

**HLA** : *Human Leucocyte Antigen*/ Antigène des leucocytes humains

**HSV**: *Herpes Simplex Virus*/ Virus herpes simplex

## **I**

**Iba 1** : *Ionized calcium-binding adapter molecule 1* / Molécule adaptatrice de liaison au calcium ionisé 1

**ICAM-1** : Intercellular adhesion molecule 1 / Molécule d'adhésion intercellulaire de type 1

**IFA** : Adjuvant incomplet de Freund

**IFN** : Interféron gamma

**IL** : Interleukine

**IRM** : Imagerie par résonance magnétique

## **K**

**Keap1**:*Kelch-like ECH-associated protein 1*/ Protéine Keap 1

**Kir 4** :Inward Rectifier K<sup>+</sup> channels / Canaux potassiques rectifiant dans le sens entrant

## **L**

**LB** : Lymphocyte B

**LCR** : Liquide céphalorachidien

**LFA-1** :*Lymphocyte function-associated antigen-1*/ Intégrine  $\alpha$ L $\beta$ 2

**LFB** : *Luxol fast blue*/ bleu de luxol

**LT** : Lymphocyte T

**LT Th** : *Lymphocyte Helper*/ Lymphocyte T auxiliaire

### ***M***

**MAG** : *Myelin associated glycoprotein* / Glycoprotéine associée à la myéline

**MBP** : *Myelin basic protein*/ Protéine basique de la myéline

**MCT** : Monocarboxylate transporteur

**MDA** : Malondialdéhyde

**ME** : Moelle épinière

**MMP** : Métalloprotéinase

**MOG** : *Myelin oligodendrocyte glycoprotein* / Glycoprotéine de myéline d'oligodendrocyte

**MPO** : Myéloperoxydase

### ***N***

**iNOS** : Inductible Nitric Oxyde Synthase / Oxyde nitrique synthase inductible

**NAGM** : *Normal appearing grey matter*/ Substance grise d'apparence normale

**Nav1.6** : 6 voltage-gated sodium (Nav) channel isoform / Canal sodique voltage-dépendant

**NAWM** : *Normal appearing white matter*/ Substance blanche d'apparence normale

**NF-κB** : *Nuclear factor kappa B* / Facteur de transcription NF-κB

**NGF** : *Nerve growth factor*/Facteur de croissance des nerfs

**NK** : *Natural killer*/ Tueur naturel

**NO** : Monoxyde d'azote

**NORB** : Névrite optique rétrobulbaire

**NOXs** : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) oxydases

### ***O***

**OLG** : Oligodendrocytes

**OMP** : Orotidine-5'-phosphate

**OPC** : Oligodendrocyte precursor cell / Précurseur oligodendrocytaire

**ORAC** : Capacité d'absorption des radicaux oxygène

### ***P***

**pI** : Point isoélectrique

**PLP** : Protéolipoprotéine

**PPi** : Pyrophosphate

**ppm** : Partie par million

**PRPP** : Phosphoribosyl pyrophosphate

**PTX** : Toxine pertussique

**PWT** : Seuil de retrait de la patte

## **R**

**RE** : Réticulum endoplasmique

**RIS** : *Radiology isolated syndrome* /Syndrome radiologiquement isolé

**RL** : Radicaux libres

**RNS** : Reactive nitrogen species /Espèces réactives de l'azote

**ROS** : *Reactive oxygen species*/ Espèces réactives de l'oxygène

**RT** : Temps de rétention

## **S**

**SB** : Substance blanche

**SEP** : Sclérose en plaques

**SEP PP** : Progressive primaire

**SEP PR** : Progressive à rechutes

**SEP PS** : Progressive secondaire

**SEP RR** : Rémittente-récurrente

**SG** : Substance grise

**SIRT2** : Sirtuine2

**SN** : Système nerveux

**SNC** : Système nerveux central

**SNP** : Système nerveux périphérique

**SOD** : Superoxyde dismutase

## **T**

**TBA** : Acide thiobarbiturique

**TBARS** : *Thiobarbituric Acid Reactive Substances*/ substances réactives de l'acide thiobarbiturique

**TCA** : Acide trichloroacétique

**TCR** : *T cell receptor* / Récepteurs des cellules T

**TEAC** : *Thiobarbituric Acid Reactive Substances*/Capacité antioxydante équivalente au trolox

**TGF- $\beta$**  : *Transforming growth factor beta* / Facteur de croissance transformant bêta

**TMEV** : Virus de l'encéphalomyélite murine de Theiler

**TMP** : 1,1,3,3-tétraméthoxypropane

**TNF- $\alpha$**  : *Tumor necrosis factor alpha* / Facteur de nécrose tumorale alpha

**U**

**UTP**: uradine-5'-triphosphate

**V**

**VCAM-1** : Vascular cell adhesion molecule 1 /Protéine d'adhésion de cellules vasculaires de type 1

**VLA-4** : *Very Late Antigen-4*

**W**

**WST-1** : Sel de tétrazolium

**X**

**XO** : Xanthine oxydase

## *Introduction générale*

La sclérose en plaques (SEP) constitue l'un des troubles neuro-immunologiques chroniques affectant le système nerveux central (SNC). Il s'agit d'une maladie inflammatoire chronique auto-immune démyélinisante du cerveau et de la moelle épinière (**Filippi et al., 2018; Simkins et al., 2021**). Elle fût décrite pour la première fois en 1868 par Jean-Martin Charcot (**Papeix, 2011**). Aujourd'hui, elle affecte entre 2 et 3 millions de personnes dans le monde dont 2,8 millions de personnes en 2020. Ses manifestations cliniques commencent généralement au cours de la troisième et de la quatrième décennie de la vie et elle représente la première cause d'atteinte neurologique et d'handicap chez les jeunes adultes. Elle affecte préférentiellement les femmes, avec un sexe ratio F/H proche de 3:1 (**Atlas de SEP, 2020**).

La SEP est classée comme une maladie multifactorielle, à étiologie complexe et encore mal connue. Elle se caractérise par une inflammation auto-immune qui entraîne un endommagement de la gaine de myéline et des axones, donc essentiellement de la substance blanche. Elle progresse habituellement en deux phases : une phase antérieure caractérisée par une attaque inflammatoire auto-immune contre les composants de la gaine de myéline, suivie d'une phase chronique de neurodégénérescence de la gaine de myéline et des axones sous-jacents. Entre ces deux grandes phases, plusieurs processus pathologiques ont été décrits y compris l'inflammation, la démyélinisation, l'apoptose des oligodendrocytes, la destruction des axones, la neurodégénérescence, l'arrêt de la différenciation des cellules progénitrices des oligodendrocytes et l'échec de la remyélinisation, ainsi que le dysfonctionnement des astrocytes (**Pegoretti et al., 2020**). De nombreuses preuves suggèrent l'implication du stress oxydant dans l'étiologie, la progression et les symptômes cliniques de la SEP. Il joue un rôle crucial dans la démyélinisation, les dommages axonaux et la neurodégénérescence. L'une des caractéristiques communes du stress oxydant est l'altération de l'équilibre des pro-oxydants/antioxydants, avec des concentrations accrues d'espèces réactives de l'oxygène (ROS). Une attention a été accordée à l'augmentation de la peroxydation lipidique, de la teneur en protéines carbonylées, des dommages à l'ADN, des antioxydants enzymatiques et non enzymatiques (**Adamczyk and Adamczyk-Sowa, 2016 ; Pegoretti et al., 2020 ; Zhang et al., 2020**).

Cette maladie existe sous différentes formes cliniques. La formes récurrente-rémittente (RR) qui concerne environ 85% des patients et qui se caractérise par l'alternance de phases de démyélinisation et de rémission. Après une quinzaine d'année en moyenne, la forme RR peut

évoluer vers une forme secondairement progressive (SP) chez 80% des patients se caractérisant par des poussées qui deviennent de plus en plus rares ou qui disparaissent totalement pour céder la place à une progression continue avec des signes neurologiques irréversibles. Chez 10 à 15% des patients, cette maladie commence par une forme progressive primaire (PP) avec une progression permanente d'handicap et des signes neurologiques réguliers (**Lublin et al., 2020**).

En fonction de la localisation des lésions démyélinisantes, plusieurs affections neurologiques ont été observées chez les patients atteints de la SEP, dont notamment des troubles sensitifs, moteurs et cognitifs (**Filippi et al., 2018**). Parmi les troubles sensitifs les plus fréquents, la douleur neuropathique chronique persistante est observée chez environ 60% des patients, y compris lors des premiers stades de la maladie réduisant considérablement leur qualité de vie et leur activité sociale au quotidien (**Heitmann et al., 2020 ; Yilmazer et al., 2020**). La SEP est une maladie incurable et malgré une amélioration significative de la prise en charge thérapeutique des patients au cours des 20 dernières années, certains symptômes résistent encore au traitement ; des études ont suggéré que la douleur liée à la SEP n'est pas suffisamment soulagée (**Thompson et al., 2010**). Les traitements actuels permettent de réduire les poussées et améliorent la qualité de vie des patients, mais ils sont sans effet sur la progression de la maladie. Ils ne sont que partiellement efficaces puisqu'ils visent principalement la phase inflammatoire de la maladie alors que la phase neurodégénérative est probablement le principal défi pour les nouvelles approches thérapeutiques (**Bittner et al., 2014**), d'où le besoin urgent d'innovation thérapeutique dans ce domaine.

L'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE) est un modèle animal bien établi pour l'étude de la pathogenèse de la SEP qui partage de nombreuses caractéristiques cliniques et neuropathologiques avec celles observées chez les patients et est largement utilisé pour développer de nouvelles thérapies. Il a été décrit pour la première fois il y a plus de 75 ans et représente toujours un modèle largement utilisé (**Constantinescu et al., 2011 ; Palumbo and Pellegrini, 2017**).

Au cours de ces dernières années, de nombreuses preuves suggèrent que les molécules actives des plantes, en particulier les polyphénols végétaux, pourraient avoir des avantages thérapeutiques dans la régulation du stress oxydant et la neuroprotection, notamment dans la SEP (**Mojaverrostami et al., 2018 ; Miller et al., 2019**).

L'extrait de pépins de raisin (Grape Seed Extract « GSE ») a été largement décrit pour ses effets thérapeutiques et pharmacologiques. Il s'agit d'un mélange complexe de polyphénols composés, dont les flavonoïdes et les proanthocyanidines, qui sont la classe la plus abondante

depolyphénols classés comme monomères de catéchine et d'épicatéchine avec des oligomères complexes (Ma and Zhang, 2017 ; Unusan, 2020). Grâce à sa richesse en molécules il possède des propriétés anti-inflammatoires, antioxydantes et neuroprotectrices (Rodríguez-Pérez *et al.*, 2019 ; Gupta *et al.*, 2020). De plus, de nombreuses études précliniques ont montré leurs effets bénéfiques sur différents organes tels que le foie, le cœur, les poumons et le cerveau (Mokni *et al.*, 2012 ; Charradi *et al.*, 2013 ; Kadri *et al.*, 2014 ; Smine *et al.*, 2017 ; El Ayed *et al.*, 2018). Dans ce contexte et au cours de cette thèse, nous envisageons d'étudier l'effet correcteur du GSE sur les processus physiopathologiques de la SEP sur le modèle EAE chez les souris.

Dans un premier temps, nous avons évalué l'effet du traitement précoce par le GSE sur l'évolution clinique de l'EAE, et ce à travers une évaluation des troubles sensitifs, moteurs et cognitifs.

Dans un deuxième temps, nous avons déterminé ses effets au niveau du cerveau et de la moelle épinière en évaluant les dommages oxydatifs, l'altération de la myéline et la prolifération astrogliale et microgliale, par des études biochimiques et moléculaires.

Enfin, dans une troisième partie nous sommes intéressés à l'étude des mécanismes d'action du GSE à l'origine de ses effets grâce à une approche de protéomique.

Pour atteindre ces objectifs, nous avons essayé de répondre à l'ensemble des questions suivantes :

- Quelle est la composition du GSE utilisé comme traitement ?
- Quelles sont les caractéristiques du modèle EAE choisi d'un point de vue comportemental, ainsi que sur le plan biochimique et protéique ?
- Quelle est la capacité du GSE à corriger l'ensemble des dégâts observés ?
- Quels pourraient être les mécanismes d'actions impliqués ?



## *Partie 1 : Synthèse bibliographique*



## I. La sclérose en plaques

### 1. Définition

La sclérose en plaques (SEP) est une maladie inflammatoire chronique, démyélinisante du système nerveux central (SNC) touchant à la fois le cerveau, la moelle épinière (ME) et le nerf optique. Les atteintes pathologiques principales sont l'apparition de plaques focales de démyélinisation et une neurodégénérescence de la substance grise et de la substance blanche (**Lassmann et al., 2007**). Le nom de la maladie donné par Alfred Vulpian en 1866 illustre cette physiopathologie (**Charcot, 1868**) : le mot « Sclérose » définit une dégénérescence des tissus encéphaliques et médullaires conduisant à la destruction de la gaine de myéline qui est remplacée dans le cas de la SEP par un tissu cicatriciel et le terme « Plaque » définit une atteinte disséminée qui peut atteindre la gaine de myéline sur plusieurs sites.

Deux événements cliniques caractérisent la SEP : la poussée et la progression. Le terme poussée correspond à l'apparition de nouveaux signes neurologiques ou à l'aggravation des signes préexistants sur une durée de plus de vingt-quatre heures. Une poussée est individualisée si elle a lieu à plus d'un mois de la dernière poussée. La progression correspond au stade d'aggravation des signes cliniques durant une période de six mois et plus (**Harris and Sadiq, 2009**).

Les symptômes de la SEP apparaissent quand les influx nerveux sont ralentis ou interrompus au niveau des plaques de démyélinisation. Le nombre et la fréquence d'apparition des plaques sont variables d'une personne à une autre au cours de l'évolution de la maladie. Par ailleurs, selon la localisation de ces plaques, la SEP se présente sous forme d'un déficit sensitif, moteur, visuel ou cognitif accompagné de troubles de l'équilibre et de douleurs; ces déficits pouvant être associés chez certains patients (**Lassmann et al., 2012**).

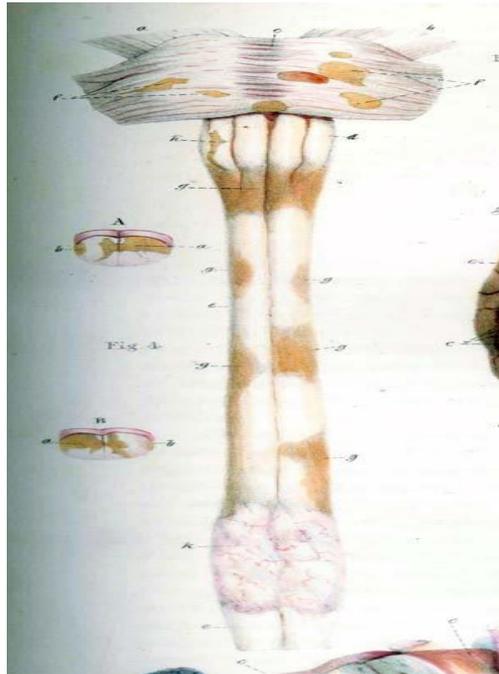
Il existe différents types de SEP : la SEP récurrente-rémittente (SEP-RR), la SEP progressive secondaire (SEP-SP), la SEP progressive primaire (SEP-PP) et la SEP progressive à rechute (SEP-PR) (**Lassmann et al., 2012**).

### 2. Historique

*Pour revue : Defer et al., 2019*

La première description précise de la maladie et de son évolution a été donnée par le neurologue français Jean-Martin en 1868 à l'Hôpital de la Salpêtrière. Au début, elle est mentionnée par les termes « sclérose en île », dans l'ouvrage du chirurgien français Jean Cruveilhier « Anatomie pathologique du corps humain », puis dans l'atlas « Pathological anatomy » de l'écossais Robert Carswell en 1838 (**Carswell, 1838**). Dans ce

dernier ouvrage des dessins des lésions de la moelle épinière sont représentés (**Figure 1**).



**Figure 1: Dessins des lésions de la moelle épinière**  
Extrait de l'ouvrage de Robert Carswell « Pathological anatomy »  
(Papeix, 2011)

Les principales altérations histologiques de la maladie (inflammation et démyélinisation axonale) n'ont été établies que dans les années 1860. En 1863, Eduard Rindfleisch a noté la présence d'infiltrats inflammatoires périvasculaires au sein des plaques qui peuvent être à l'origine de la démyélinisation. C'est Alfred Vulpian, en 1866, qui a utilisé pour la première fois le terme "sclérose en plaques". En 1868, le neurologue et professeur d'anatomopathologie français, Jean Martin Charcot, a donné une description précise des lésions observées au cours de la SEP. En effet, il a observé de petites lésions, « scléroses », disséminées sous formes de « plaques » sur des coupes histologiques du cerveau et de moelle épinière et a précisé ensuite que ce sont ces plaques qui sont responsables de l'apparition des symptômes de la maladie (**Charcot, 1868**). En 1906, Otto Marburg a présenté le premier compte rendu clinique et pathologique détaillé de la SEP aiguë fulminante. En 1928, Joseph Balo a décrit des lésions particulières chez les patients hongrois atteints de SEP progressive. En 1930, apparaissent les premières études épidémiologiques par Russel Brain qui a collecté des informations sur la fréquence et l'âge d'apparition de la SEP (**Papeix, 2011**).

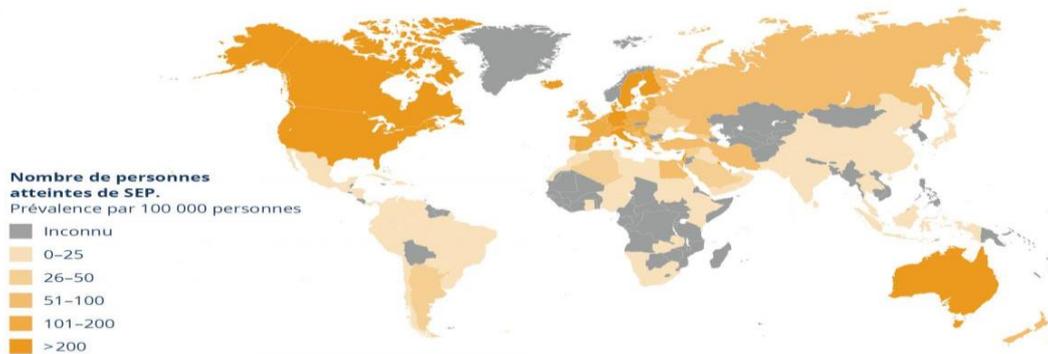
### 3. Epidémiologie

*Pour revue : Leray et al., 2016 ; Moreau et al., 2017 ; Thompson et al., 2018b ; Walton et al., 2020*

La SEP est l'un des troubles neuro-immunologiques chroniques les plus fréquents chez le jeune adulte, avec un âge moyen de survenue de 30 ans, alors que la disponibilité des ressources et des services pour les personnes atteintes de SEP est rare dans de nombreuses régions du monde.

Selon l'Atlas de la SEP, cette maladie affecte 2,8 millions de personnes dans le monde en 2020 (**Atlas de SEP, 2020**). Le nombre de personnes atteintes de SEP est en hausse dans toutes les régions du monde depuis 2013 sans savoir s'il s'agit d'une recrudescence de la maladie ou d'un artefact méthodologique lié au développement des moyens de diagnostic (**Ouallet et Brochet, 2004 ; Thompson et al., 2018b**).

La prévalence de la SEP dans le monde est hétérogène et varie de 25 à 300 cas pour 100 000 habitants avec une forte prévalence dans certaines régions. La SEP est très fréquente en Amérique du Nord, au nord de l'Ecosse (250 cas pour 100 000 habitants) ainsi qu'en Europe du Nord (Scandinavie, Allemagne) (**Kingwell et al., 2013**). A l'inverse, une faible prévalence est trouvée en Asie, en Amérique du sud et en Afrique sub-saharienne ainsi que dans les pays arabes (**Walton et al., 2020**)(Figure 2).



**Figure 2 : Prévalence de la sclérose en plaques dans le monde**

**Extrait de Walton et al., 2020**

Les femmes sont les plus touchées par cette maladie avec un sexe ratio estimé de l'Homme pour 3 femmes pour la forme la plus fréquente, la SEP-RR, alors que les statistiques pour la SEP-PP sont différentes avec autant d'hommes atteints que de femmes (**Atlas de SEP, 2020**). Cette prédominance féminine pourrait être liée aux cycles hormonaux. Les faibles taux d'estrogènes chez la femme jeune favoriseraient la sécrétion de cytokines Th1 pro-inflammatoires, alors que lors de la grossesse (taux élevés d'estrogènes) la voie Th2 anti-

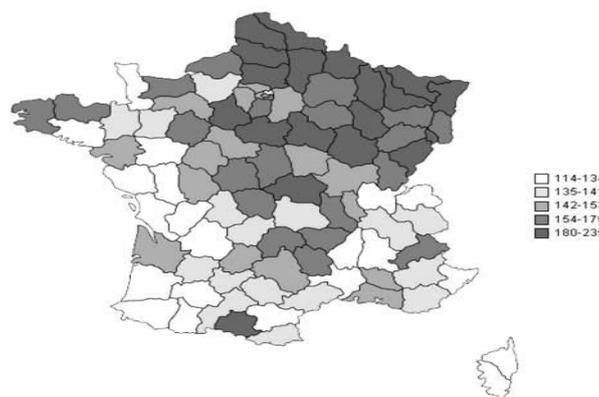
inflammatoire serait favorisée, ce qui expliquerait la plus faible incidence des poussées retrouvées. Par ailleurs, chez l'Homme (taux élevés de testostérone), la voie Th2 anti-inflammatoire serait également favorisée (**Tintoréand Arrambide, 2009**).

La SEP est la première cause de handicap du jeune adulte ; elle débute généralement entre 20 et 50 ans dont 70% des cas entre 20 et 40 ans, 10% après 40 ans, 10% avant 20 ans. Il existe des formes pédiatriques de SEP dont la prévalence mondiale n'est pas connue. Cependant, les données obtenues dans plusieurs études estiment que cette prévalence est de 3,6 pour 100 000 habitants. Un déséquilibre du sexe ratio est également retrouvé et apparaît vers l'âge de 10 ans (**Boiko et al., 2002 ; Chitnis et al., 2011**).

### 3.1. Prévalence en France

La France est considérée comme un pays de moyenne à forte prévalence pour la SEP avec plus de 110 000 personnes atteintes et une incidence de 5 000 nouveaux cas diagnostiqués par an (**Atlas de SEP, 2020**). En 1994, la prévalence de la SEP a été estimée entre 37 et 47 pour 100 000 habitants (**Fender et al., 1997**). En 2003, une première étude réalisée à partir des données d'affection de longue durée (ALD) de la Mutualité Sociale Agricole (MSA) avait estimé la prévalence de la SEP à 65,5 pour 100 000 habitants avec une prédominance féminine (96,3 pour 100 000 habitants chez les femmes contre 41,9 habitants pour 100 000 habitants chez les hommes) (**Vukusic et al., 2007**). Une autre étude réalisée en 2012 par Fromont et al. a estimé que l'incidence de cette maladie est de 8,8 pour 100 000 habitants avec une prédominance féminine de 71% (**Fromont et al., 2012**).

En France, une hétérogénéité de la prévalence est observée à l'intérieur même du pays avec des prévalences plus élevées au Nord-Est qu'au Sud-Ouest (**Pivot et al., 2016 ; Foulon et al., 2017**) (**Figure 3**).



**Figure 3: Carte des prévalences régionales de la sclérose en plaques en France métropolitaine en 2012 pour 100 000 habitants**  
Extrait de Foulon et al., 2017

### 3.2. Prévalence en Tunisie

Peu de travaux ont été faits sur la SEP en Afrique du Nord et en particulier en Tunisie. La première étude a été menée entre 1974 et 1978 au Centre de Neurologie de Tunisie, avec 200 patients hospitalisés sur toute la Tunisie avec une prévalence estimée à 3,34 pour 100 000 habitants (**Ammar et al., 2006**). Sur cette base, la Tunisie est considérée comme une zone de faible prévalence pour la SEP.

## 4. Facteurs de risque

Bien que cette maladie soit décrite depuis le 19<sup>ème</sup> siècle, les causes exactes restent inconnues à ce jour. Cependant, elle est considérée comme une maladie multifactorielle complexe résultant de l'association de plusieurs facteurs environnementaux et génétiques.

### 4.1. Facteurs environnementaux

#### 4.1.1. Infection virale

A ce jour, aucun virus spécifique n'a été identifié comme une cause certaine de la SEP, mais certains virus seraient plus probablement impliqués que d'autres. Parmi ces virus, ont été suspectés : le virus Epstein-Barr (EBV), le cytomégalovirus, le virus herpès simplex de type 1 et 2 (HSV1, HSV2), l'herpèsvirus humain de type 6 (HHV6), le paramyxovirus et le virus ourlien (**Giraudon and Bernard, 2009 ; Milo and Kahana, 2010 ; Simon et al., 2015**). Ces virus provoqueraient une altération du système immunitaire, favorisant ainsi la destruction de la myéline. Plusieurs hypothèses sont établies pour expliquer l'association des infections virales à la SEP. Il pourrait s'agir d'une activation des lymphocytes T (LT) auto-réactifs, soit de manière non spécifique par les molécules inflammatoires induites par l'infection, soit par mimétisme moléculaire (**Koch et al., 2013**). La notion de mimétisme moléculaire repose sur l'idée de la présence et du partage d'épitopes communs entre certains antigènes (Ag) d'agents infectieux et les Ag du soi (présence d'une similitude de séquences d'acides aminés entre le peptide exprimé par le virus et une protéine du soi). Dans ce cas, et suite à une infection, l'organisme déclencherait une réponse immunitaire contre cet antigène viral et contre son propre Ag (auto-Ag), entraînant la destruction de l'agent infectieux et de la structure portant l'auto-Ag par les lymphocytes auto-réactifs. Dans le cas de la SEP, l'auto-Ag le plus souvent suspecté est la protéine basique de la myéline (MBP) (**Moreau, 2012**).

Parmi les virus incriminés dans le développement de la SEP, le plus fréquemment retrouvé est l'EBV. Ce virus infecte environ 90% de la population et la primo-infection a lieu le plus souvent pendant l'enfance où elle est alors asymptomatique. Elle peut

aussi avoir lieu plus tard, pendant l'adolescence ou à l'âge adulte, en se manifestant alors par une mononucléose infectieuse. Les personnes ayant eu une manifestation clinique de l'EBV présentent un risque 2,3 fois plus élevé par rapport aux personnes infectées durant leur enfance de développer une SEP, selon les résultats d'une méta-analyse (**Thacker et al., 2006**). Ainsi, le risque de développer un SEP pourrait être augmenté dans les 5 ans après avoir eu une infection par l'EBV et jusqu'à 30 ans après ce risque reste élevé (**Nielsen et al., 2007**). Il a également été montré que le taux d'anticorps (Ac) dirigés contre l'EBV est plus élevé dans le sang des personnes qui développeront une SEP dans les années suivantes (**Ascherio et al., 2007**). Selon des travaux de recherche qui ont été récemment publiés dans la prestigieuse revue *Science*, le risque de contracter la SEP est multiplié par 32 après avoir été infecté par l'EBV, mais reste inchangé après l'infection par d'autres virus (**Bjornevik et al., 2022**). Ceci a été conclu suite à un suivi durant vingt ans de plus de 10 millions de jeunes adultes engagés dans l'armée américaine, dont 955 ont été diagnostiqués pour la SEP durant leur service.

#### 4.1.2. Localisation géographique

*Pour revue : Ouallet and Brochet., 2004 ; Marrie, 2004 ; Dobson and Giovannoni, 2019*

##### A. Gradient de prévalence en fonction de la latitude

Comme déjà dit, la répartition de la SEP à travers le monde n'est pas homogène, avec l'existence d'un gradient Nord - Sud (de haute à faible prévalence) dans l'hémisphère Nord qui est inversé dans l'hémisphère Sud. Plusieurs arguments sont avancés afin d'expliquer ce gradient géographique, notamment l'implication d'un agent viral qui serait plus exprimé dans certaines régions du monde (cf 4.1.1 Infection virale), l'existence d'isolats ancestraux des premiers patients porteurs de la SEP issus des régions du nord dont la Scandinavie (cf 4.2. Facteurs génétiques) et enfin l'influence de l'ensoleillement. Concernant ce dernier argument, une plus faible prévalence de la maladie a été observée dans les pays les plus ensoleillés, proches de l'équateur. L'existence d'une corrélation inverse entre le risque de développer une SEP et l'exposition solaire a été montré par plusieurs études (**Vander Mei et al., 2007 ; Jelinek et al., 2015 ; Kočovská et al., 2017**). L'ensoleillement et notamment l'exposition aux UV modulerait l'immunité par l'intermédiaire d'une synthèse accrue de vitamine D, tandis que le manque d'ensoleillement provoquerait une carence en vitamine D qui favoriserait le développement de maladies auto-immunes (**Sloka et al., 2011 ; Lucas et al., 2015**). Plusieurs études ont montré des effets bénéfiques de la vitamine D dans la prévention et même le traitement de la SEP (**Ascherio et al., 2010 ; Milo and Kahana, 2010**). Ceci pourrait s'expliquer par le fait que la forme active de la vitamine D stimule l'immunité innée et joue un

rôle dans la défense de l'hôte contre l'infection. Plus précisément, la vitamine D inhibe la production de cytokines pro-inflammatoires (IL-6, IL-12, IL-17, l'interféron gamma (IFN- $\gamma$ ) et le facteur de nécrose tumorale (Tumor Necrosis Factor, TNF- $\alpha$ ) (Milo and Kahana, 2010), favorise la production de cytokines anti-inflammatoires (IL-4, IL-10, TFG $\beta$ -1) et facilite le développement de LT régulateurs. Elle joue également un rôle important dans la modulation des cellules T helper (Th), en inhibant les cellules Th17 pro-inflammatoires, en modifiant l'équilibre Th1/Th2 et en empêchant les cellules Th1 et Th17 activées de franchir la barrière hémato-encéphalique (BHE) (Cantorna, 2006 ; Lysandropoulos *et al.*, 2011 ; Grishkan *et al.*, 2013).

### **B. Rôle clé de l'adolescence et populations migrantes**

Les données obtenues lors des études de migration des populations entre des zones de prévalence de SEP différentes ont permis de confirmer le rôle des facteurs environnementaux dans le développement de la SEP. Par comparaison de l'incidence et de la prévalence de la SEP dans les pays d'origine des migrants de différentes ethnies à celles des populations du pays d'accueil, il a été mis en évidence que des facteurs environnementaux acquis et intervenant lors de l'enfance ou de l'adolescence détermineraient le risque de développer une SEP. Ces études ont montré que les personnes qui migrent avant l'adolescence présentent un risque de développer une SEP comparable à celui de leur lieu d'immigration alors que celles qui migrent après l'adolescence conservent le risque de développer une SEP de leur région d'origine, comme si l'exposition environnementale au moment de l'adolescence déclenchait un événement capital plusieurs années avant le début clinique de la maladie. Cette hypothèse a été renforcée par les données de l'étude de l'incidence de la maladie chez les descendants de migrants africains et asiatiques en Europe. Ces travaux montrent une évolution au cours des générations du risque de développer une SEP tendant à se rapprocher de celle du pays de résidence (Moreau *et al.*, 2017).

#### **4.1.3. Mode de vie**

*Pour revue : Riccio and Rossano, 2015 ; Fanara et al., 2021*

##### **A. Régime alimentaire**

Des études ont montré que les pays ayant une forte prévalence de la SEP ont un mode de vie sédentarisé avec des habitudes alimentaires particulières selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS). Ainsi, une alimentation riche en graisses saturées animales, alcool, caféine, viandes fumées pourrait être considérée comme un facteur de risque de la survenue de la SEP

(Habek *et al.*, 2010). Le surpoids et l'obésité ont également été rapportés comme associés à la SEP (Munger *et al.*, 2009 ; Hedström *et al.*, 2012). Une augmentation de 2,25 du risque de développer une SEP a été observée chez les patients avec un IMC supérieur à 30 kg/m<sup>2</sup> à l'âge de 18 ans. Ce surrisque n'est pas retrouvé chez les enfants en surpoids à l'âge de 5 et 10 ans (Mokry *et al.*, 2016). Cette idée est confortée par l'étude d'Hedström *et al.* qui montre qu'un IMC supérieur à 27 kg/m<sup>2</sup> à 20 ans double le risque de développer une SEP par rapport aux sujets de poids normal (Hedström *et al.*, 2012).

L'implication de l'alimentation et du mode de vie a été mise en évidence par des études menées au Japon ayant montré une augmentation très importante de la prévalence de la maladie au cours de ces 15 dernières années (8,1 pour 100 000 habitants en 2001 *versus* 18,6 pour 100 000 habitants en 2016) ; ceci pouvant être expliqué par des changements des habitudes alimentaires se rapprochant de celles des Occidentaux (Houzen *et al.*, 2018). Plusieurs études ont suggéré que les régimes alimentaires occidentaux pourraient modifier la flore microbienne intestinale ou le microbiote, conduisant notamment à une situation de dysbiose pro-inflammatoire pouvant favoriser la perméabilisation de la BHE et le développement de la neuro-inflammation (Jörg *et al.*, 2016 ; Riccio and Rossano, 2018).

## B. Tabagisme

Un autre facteur incriminé dans le déclenchement de la SEP est le tabagisme. Plusieurs études rapportent une augmentation du risque de développer une SEP dans la population des fumeurs par rapport celle des non-fumeurs (Pekmezovic *et al.*, 2006 ; Handel *et al.*, 2011). Cette augmentation du risque est cependant modérée selon la méta-analyse de Hawkes publiée en 2007 qui reprend les résultats de six études. Celle-ci montre que le risque de développer une SEP est de 1,2 à 1,5 fois plus important chez les fumeurs par rapport aux non-fumeurs (Hawkes, 2007).

Les mécanismes d'action exacts du tabac pour développer une SEP restent mal connus. Cependant, on admet que la nicotine joue le rôle d'un immunosuppresseur (Stämpfli and Anderson, 2009). Elle semble également capable de modifier la perméabilité de la BHE (Hawkes, 2007), favorisant ainsi le passage des LT activés et des composés toxiques dirigés contre la myéline dans le cerveau. De plus, elle stimule la production du monoxyde d'azote (NO) endogène considéré comme un composé potentiellement neurotoxique pour de très fortes concentrations, qui pourrait être impliqué dans le processus de dégénérescence axonale et d'altération de l'influx nerveux, tous deux retrouvés dans la pathogénèse et le développement de la SEP (Suemaru *et al.*, 1997 ; Encinas *et al.*, 2005).

## 4.2. Facteurs génétiques

*Pour revue : Sawcer, 2009 ; Hollenbach and Oksenberg, 2015 ; Didonna and Oksenberg, 2017*

De nombreuses études épidémiologiques ont montré que la SEP n'est pas héréditaire, mais qu'il existe des facteurs génétiques influençant sa survenue, c'est-à-dire des facteurs favorables à son développement, sous l'influence d'autres facteurs (Zalc, 2014). En effet, dans 10% à 15% des cas, plusieurs membres d'une même famille sont atteints suggérant l'existence d'un risque familial. Le risque de développer une SEP est augmenté en fonction du degré de parenté avec un individu malade : élevé pour les jumeaux monozygotes (25%), moyennement élevé pour les parents au 1<sup>er</sup> degré (elle est de 4% entre frères et sœurs et de 2,75% entre parents et enfants) et faible pour les parents du 2<sup>ème</sup> ou du 3<sup>ème</sup> degré (Dyment *et al.*, 2004 ; Sawcer, 2008). Différents gènes ou locus chromosomiques ont été identifiés comme participant au risque génétique de développer une SEP.

### 4.2.1. Complexe majeur d'histocompatibilité

Le rôle du Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH) dans la susceptibilité génétique à la SEP est connu depuis une cinquantaine des années (Ramagopalan *et al.*, 2009). Ce complexe de gènes localisés sur le bras court du chromosome 6 codent des glycoprotéines qui assurent la fonction de présentation de l'antigène et l'histocompatibilité permettant ainsi au système immunitaire de différencier le soi du non-soi (Malluci *et al.*, 2015). La région HLA-DRB1 sur le bras court du chromosome 6 (6p21) est considérée comme le plus puissant facteur de susceptibilité génétique à la SEP avec notamment une association entre le développement de la maladie et l'allèle HLA-DRB1\*1501 (Yaouanq *et al.*, 1997 ; Magy, 2009 ; Lindberg *et al.*, 2010). Le risque de développer la SEP est de 3 à 4 fois plus important chez les individus porteurs de cet allèle (Patsopoulos, 2018).

### 4.2.2. Autres gènes

Grâce au développement des méthodes d'analyse du génome à haut débit, telles que les études d'association pangénomique (Genome Wide Association studies : GWAS), plusieurs gènes ont été décrits comme associés à la SEP (Malluci *et al.*, 2015 ; Hollenbach and Oksenberg, 2015 ; Parnell and Booth, 2017 ; Thompson *et al.*, 2018b). En effet, le gène codant la chaîne  $\alpha$  du récepteur à l'IL-7 (IL7RA ou CD127) et le gène codant la chaîne  $\alpha$  du récepteur à l'IL-2 (IL2RA ou CD25) ont été identifiés comme facteur de risque génétique dans la SEP (Parnell and Booth, 2017). L'interleukine 7 (IL-7) est une cytokine primordiale pour la survie, la prolifération et la différenciation des lymphocytes B (LB) et des LT.

D'autres facteurs de susceptibilité génétique exprimés par les cellules immunitaires auto-réactives et par leurs cellules régulatrices semblent également contribuer au développement de la SEP (**Parnell and Booth, 2017**). Parmi eux, il y a les gènes codants le cluster de différenciation CD58, certains gènes codant des protéines kinases de la famille des Jun kinases, le gène codant le facteur transducteur de signal et activateur de la transcription 3 (STAT3) ou encore celui codant le récepteur au TNF- $\alpha$  (**Thompson et al., 2018b**).

En conclusion de ce chapitre concernant les facteurs de risque de développer une SEP, chaque facteur pris individuellement ne confère qu'un faible risque de développer la maladie. En revanche, l'interaction entre des facteurs environnementaux et génétiques favorise la survenue de la maladie.

## 5. Physiopathologie de la sclérose en plaques

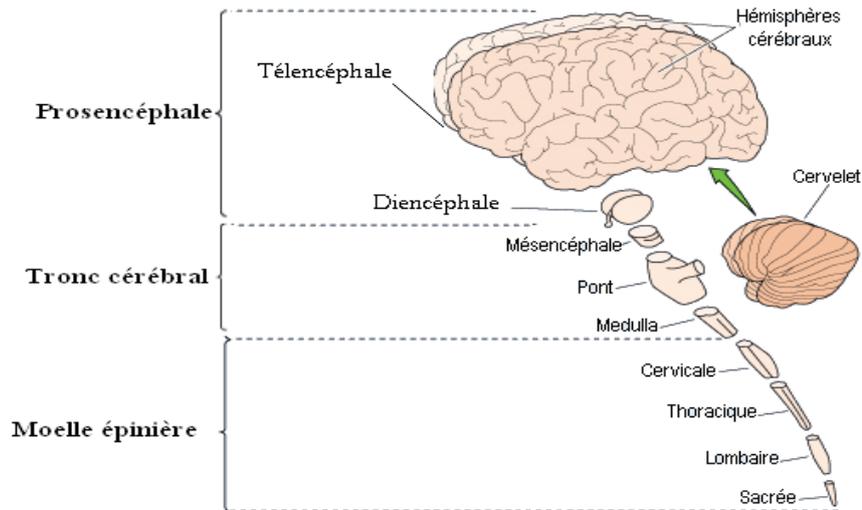
### 5.1. Généralités sur l'organisation du système nerveux central

*Pour revue : Ransom et al., 2009 ; Stadelmann et al., 2019 ; Pour livre : Nieuwenhuys et al., 2008 ; Kandel et al., 2013*

Le système nerveux (SN) est un ensemble de structures qui commandent des fonctions vitales et contrôlent l'ensemble du corps. Il constitue l'un des moyens de communication les plus importants de l'organisme permettant de conduire, transmettre et traiter les messages nerveux. Il est composé de deux parties : i) le système nerveux central (SNC), dont le rôle est d'intégrer, d'analyser et d'interpréter les signaux provenant de la périphérie et d'organiser la réponse à transmettre, et ii) le système nerveux périphérique (SNP) dont le rôle est la conduction des signaux périphériques jusqu'au SNC et de relayer les ordres émis par le SNC (**Ransom et al., 2009**).

Le SNP comprend l'ensemble des nerfs et leurs renflements (ganglions). Ces nerfs sont rattachés au SNC par une extrémité alors que l'autre extrémité est une ramification de fines branches innervant l'ensemble du corps.

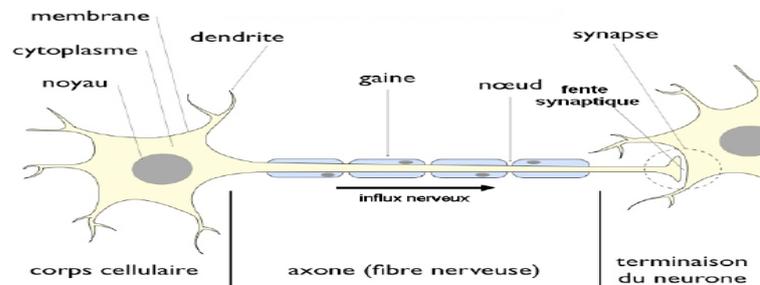
Le SNC est constitué de l'encéphale et de la ME. L'encéphale comprend 3 grands domaines de haut en bas : le prosencéphale constitué du télencéphale et du diencephale (cerveau), le cervelet et le tronc cérébral. L'encéphale est situé dans la boîte crânienne alors que la ME est située dans la colonne vertébrale (**Figure 4**). Le SNC est formé de tissus nerveux : la substance blanche (SB) et la substance grise (SG) et d'un système vasculaire finement ramifié, le tout entouré de membranes protectrices, les méninges.



**Figure 4 : Composants anatomiques majeurs du système nerveux central**  
 Adapté de Ransom, 2009

- **Les neurones**

Le SNC est composé de cellules hautement spécialisées appelées neurones constituant l'unité structurale et fonctionnelle responsable de l'émission et de la propagation d'informations nerveuses. Un neurone est constitué de quatre grandes régions : le corps cellulaire, les dendrites, les axones et les terminaisons présynaptiques (**Figure 5**).



**Figure 5 : Représentation schématique de la structure d'un neurone**  
 Extrait de Démosthènes, 2018

Le neurone est une cellule « excitable » mais également une cellule « sécrétrice » très particulière dont le produit de sécrétion est le neurotransmetteur. En effet, elle transmet et propage des signaux électriques en fonction des informations qu'elle reçoit et cette propriété est due à la présence dans la membrane plasmique des canaux ioniques permettant le passage sélectif d'ions. Ainsi, la sécrétion de neurotransmetteur, qui se fait au niveau des synapses, est très focalisée et dirigée uniquement vers les cellules avec lesquelles le neurone est connecté. Chaque neurone est unique par leur forme particulière, leur position dans le SNC et les

connexions qu'il établit avec d'autres neurones ou avec des cellules réceptrices, sensorielles, ou effectrices, musculaires ou glandulaire.

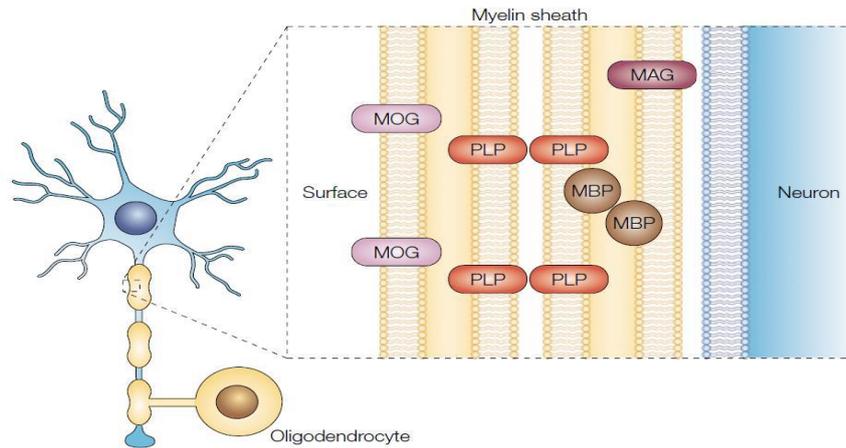
Les axones sont des prolongements cytoplasmiques des neurones dont le rôle est la conduction de l'influx nerveux. Il existe deux types distincts d'axones : les myélinisés et les non myélinisés. Les axones myélinisés sont recouverts d'une gaine de myéline. La myéline est formée par l'extension des membranes plasmiques des oligodendrocytes (OLG) dans le SNC qui sont capables de myéliniser plusieurs axones en même temps et par des cellules de Schwann dans le SNP qui ne peuvent myéliniser qu'un seul axone.

- *Structure, composition et fonction de la myéline centrale*

La myéline est formée de deux feuillets membranaires de l'OLG qui s'enroulent en spirale autour d'un segment d'axone. A chaque extrémité de l'inter-nœud, il y a les nœuds de Ranvier qui sont des régions riches en canaux ioniques, principalement des canaux sodiques.

La myéline possède des propriétés biochimiques particulières et spécifiques. Elle est très riche en lipides (70%), notamment en cholestérol, et aussi en glycolipides sulfatés, ce qui explique son imperméabilité aux ions. De même, elle est riche en protéines spécifiques qui constituent 65% des composants de la myéline. La composition protéique de la myéline est différente entre le SNC et le SNP avec des protéines spécifiques de la myéline du SNC ou du SNP et des protéines présentes dans les deux systèmes.

Les protéolipoprotéines (PLP et son isoforme DM20) et les protéines basiques de la myéline (MBP) sont les protéines majeures de la myéline du SNC représentant 80 % des protéines constituantes. Présente dans le SNC et dans une moindre mesure dans le SNP, la MBP joue un rôle dans la compaction de la myéline (**Jahn et al., 2009**) tandis que la PLP est spécifique de la myéline du SNC et serait impliquée dans la différenciation oligodendrocytaire, et dans la compaction de la gaine de myéline (**Martini and Schachner, 1997 ; Stadelmann et al., 2019**). Il existe d'autres protéines minoritaires comme la glycoprotéine oligodendrocytaire de myéline (MOG), la glycoprotéine associée à la myéline (MAG) et la 2',3'-nucléotide cyclique 3'-phosphodiesterase (CNPase) (**Nave and Werner, 2014**) (**Figure 6**).



**Figure 6: Structure de la gaine de myéline**

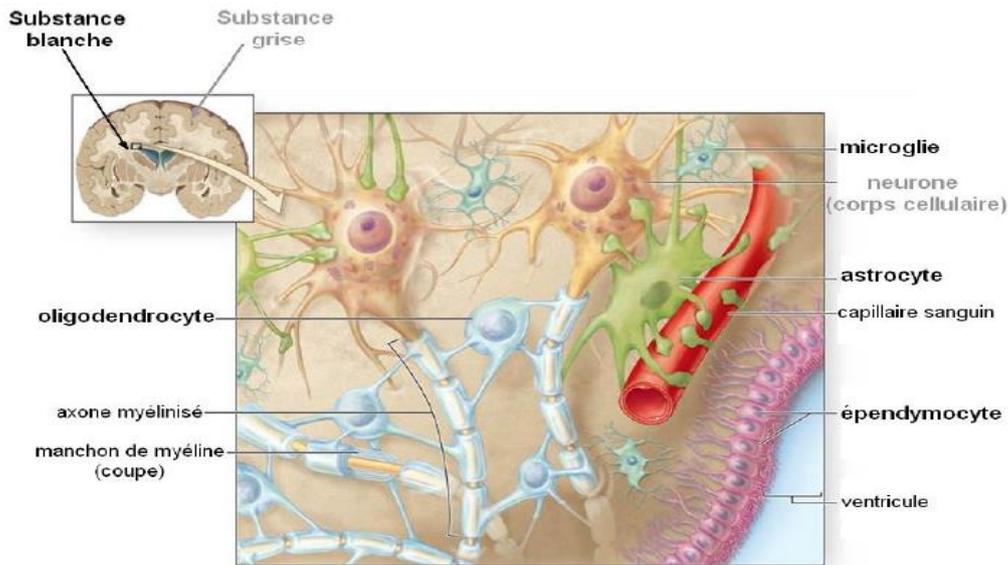
La gaine de myéline est une structure spécialisée comprenant environ 80% de lipides et 20% de protéines spécifiques. La protéolipoprotéine de myéline (PLP) est une protéine membranaire hydrophobe à 4 domaines transmembranaires permettant de maintenir la structure myélinique. En revanche, la protéine basique de la myéline (MBP) est localisée à la surface cytoplasmique de la myéline compacte où elle forme des dimères et participerait ainsi à la stabilisation des lignes denses majeures en interagissant avec des lipides chargés négativement. La glycoprotéine associée à la myéline (MAG) qui représente 1% des protéines de la myéline est associée à la surface de l'axolemme et a une fonction de guidance axonale et de maintien structurel. Enfin, la glycoprotéine oligodendrocytaire de myéline (MOG) est confinée à la surface cytoplasmique interne de la myéline et a encore un rôle inconnu, mais pourrait être importante dans la définition de l'intégrité structurale de la gaine de myéline.

**Adapté de Hemmer *et al.*, 2002**

Grâce à son caractère lipidique conférant des propriétés d'isolant électrique, la myélinisation des axones accélère la conduction de l'influx nerveux qui est saltatoire, en sautant d'un nœud de Ranvier à un autre. Ceci est différent de la propagation de proche en proche qui est plus lente et qui se produit dans les axones non myélinisés (Scherer, 1999).

- **Les cellules gliales**

A l'instar des axones, les cellules gliales sont principalement retrouvées dans la SB et elles sont étroitement liées aux neurones qui eux constituent la SG. Elles ont comme fonction principale le soutien structural et métabolique de ces derniers. Malgré leurs petites tailles en comparaison avec les neurones, elles occupent environ la moitié du volume total du SNC. Outre les oligodendrocytes dont nous avons parlé précédemment, il existe 3 autres types de cellules gliales (Figure 7) :



**Figure 7 : Illustration des différents types de cellules gliales**

Le système nerveux central se divise en deux compartiments structurellement distincts, la substance grise contenant les corps cellulaires de neurones et la substance blanche comprenant les cellules gliales non myélinisantes (les astrocytes, les cellules de la microglie et les épendymocytes) et les cellules gliales myélinisantes, les oligodendrocytes qui permettent l'élaboration de la gaine de myéline autour de l'axone.

**Adapté de Mescher, 2015**

### - *Les astrocytes*

Les astrocytes sont les cellules gliales les plus abondantes. Ce sont de petites cellules en forme d'étoile avec des prolongements cellulaires et un petit volume cytoplasmique. Les prolongements sont en contact avec les capillaires sanguins, les neurones, les méninges ou les parois des ventricules permettant ainsi le contrôle des échanges moléculaires et/ou cellulaires entre le sang, les neurones et le liquide céphalo-rachidien (LCR).

Il existe deux principales catégories d'astrocytes, les astrocytes fibrillaires (ou fibreux) présentent de longs prolongements radiaires riches en gliofilaments et les astrocytes protoplasmiques présentent des prolongements courts et contenant peu de gliofilaments. Les astrocytes possèdent de nombreuses fonctions :

- \* Ils participent à la constitution de la BHE au niveau de leurs pieds astrocytaires ;
- \* Ils possèdent un rôle dans la régulation de la transmission synaptique en capturant les neurotransmetteurs au niveau synaptique tel que le glutamate et l'acide gamma-aminobutyrique GABA ;
- \* Ils possèdent des fonctions trophiques par la synthèse d'un ensemble de molécules solubles ou membranaires qui conditionnent la survie et la plasticité des cellules environnantes comme

le facteur de croissance des nerfs (NGF pour *Nerve Growth Factor*), le facteur neurotrophique dérivé du cerveau (BDNF pour *Brain-Derived Growth Factor*) et le facteur neurotrophique dérivé de la glie (GDNF pour *Glia-Derived Neurotrophic Growth Factor*) (**Nedergaard et al., 2003**). De plus, ils participent à l'élaboration d'une réponse cellulaire adaptée à toute situation d'altération de l'homéostasie tissulaire grâce à l'expression de récepteurs à de nombreux composés neuroactifs comme des neuropeptides, des facteurs de croissance, des cytokines, des neurotoxines. Ainsi, toute lésion tissulaire du SNC induit une activation astrocytaire (**Kim et al., 2019**).

- ***Les cellules microgliales ou microglie***

Les cellules microgliales sont des cellules de l'immunité innée appartenant au groupe des macrophages se localisant spécifiquement au SNC. Elles ont une origine embryonnaire hématopoïétique et dérivent des pro-monocytes sanguins ; très précocement, à la fin de la vie fœtale, elles envahissent le SNC. Elles réagissent très précocement suite à tout élément provoquant une perte ou une perturbation de l'homéostasie centrale par un phénomène dit d'activation microgliale qui se met en place en quelques minutes à quelques heures selon le type de lésion sur un périmètre plus ou moins important selon le degré lésionnel.

Cette activation engendre au niveau de la microglie des modifications de morphologie, d'expression de gènes et de comportement fonctionnel pouvant servir à la fois à la protection et à la réparation du tissu lésé ou à sa dégradation par phagocytose.

- ***Les cellules endothéliales ou les épendymocytes***

Les cellules endothéliales ou épendymocytes constituent la membrane tapissant l'intérieur des cavités contenant le LCR, qui sont le canal épendymaire dans la ME et les ventricules dans le cerveau et participent de ce fait à la BHE.

**5.2. Anatomopathologie de la sclérose en plaques : types de lésions observés**

***Pour revue : Ouallet and Brochet, 2004 ; Kutzelnigg and Lassmann, 2014 ; Mahad et al., 2015***

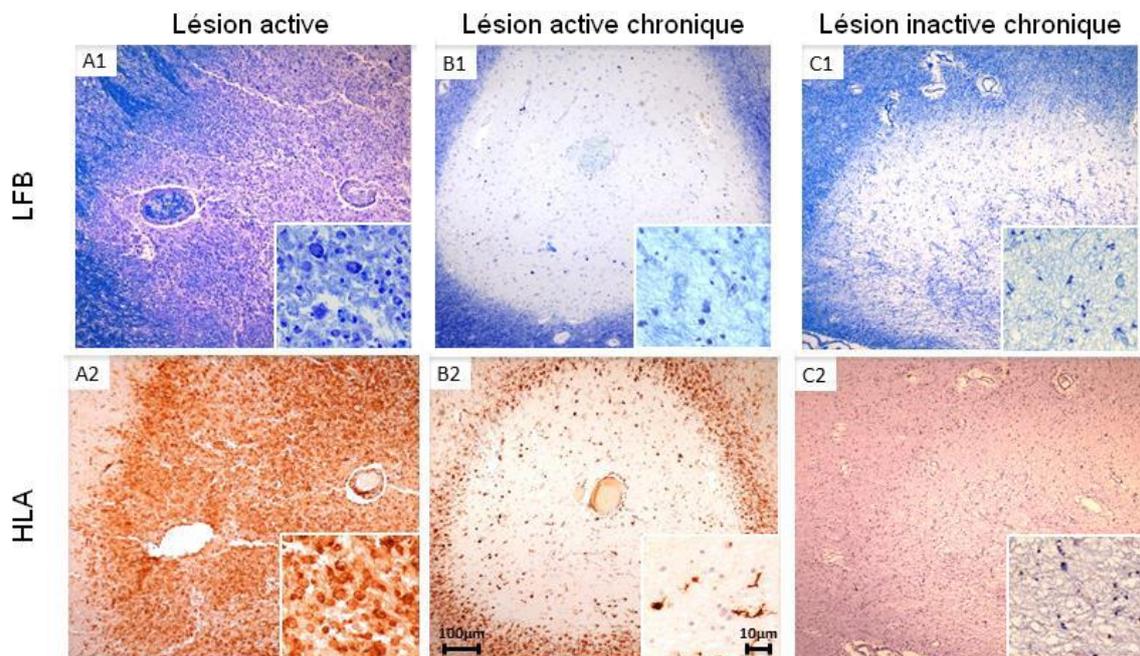
La destruction de la gaine de myéline au cours de la SEP conduit à la formation d'un tissu cicatriciel appelé « lésion ». Ces lésions ont un aspect scléreux, épais et dur et sont de taille et de répartition variables dans le SNC. Plusieurs types de plaques peuvent être distingués (**Figure 8**) :

\* Les **lésions récentes ou «actives»**, où le processus de démyélinisation est en cours. Elles sont caractérisées par des infiltrats de LT CD8 et LT CD4 activés, de macrophages

phagocytant les débris myéliniques, d'une gliose réactionnelle suite à la réaction des astrocytes et d'un œdème témoignant de la rupture de la BHE ;

\* Les **lésions actives chroniques**, sous-type distinct des lésions actives récentes qui se caractérisent par une démyélinisation franche liée à la présence de cellules phagocytaires, un centre déserté par les macrophages qui forment une couronne périphérique et exercent leur activité en bord de plaque ;

\* Les **lésions chroniques ou «inactives»**, anciennes où le processus de démyélinisation est terminé, caractérisé par la perte d'oligodendrocytes, une gliose cicatricielle et une perte axonale. Ces lésions persistent durant des années.



**Figure 8 : Les types de lésions observées dans le système nerveux central de patients atteints de la sclérose en plaques**

Coloration de la myéline au bleu de luxol (LFB : luxol fast blue) et des macrophages avec un anticorps anti HLA-DR.

A1 : Lésion active à inflammation sévère avec macrophages contenant des débris myéliniques, A2 : microglie, B1 et B2 : Lésion active chronique avec une faible inflammation au centre de la lésion (B1, B2) et une abondante présence microgliale en bordure de lésion (B2). Une forte démyélinisation est également notée (décoloration blanche). C2 : Lésion inactive chronique montrant un centre de lésion immunologiquement silencieux mais avec une bordure de lésion bien démarquée montrant une inflammation modérée.

Extrait de Ingram *et al.*, 2014

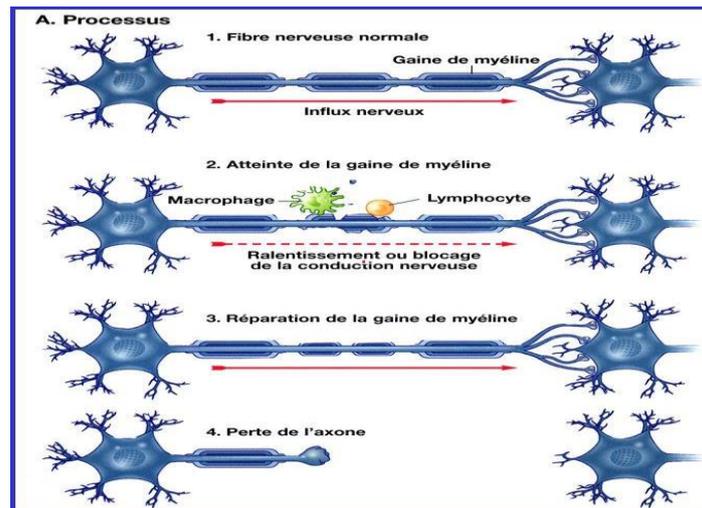
Les lésions sont retrouvées à différents niveaux du cerveau et de la ME, au sein de la SB et de la SG où le phénomène est cependant moins marqué (Friese *et al.*, 2014). Certaines régions sembleraient être plus affectées que d'autres, notamment la SB sous-corticale et périventriculaire, le nerf optique, la SB du cervelet, le pont et la medulla ainsi que la portion cervicale de la ME. Généralement, ces lésions sont situées dans des régions de forte densité veineuse (Kutzelnigg and Lassmann, 2014).

Des zones d'apparence normale dans la SB (NAWM pour *normal appearing white matter*) et dans la SG (NAGM pour *normal appearing grey matter*) sont également retrouvées chez 72% des patients atteints de SEP, en plus des lésions citées précédemment (Ceccarelli *et al.*, 2007 ; Vrenken *et al.*, 2007). Elles sont caractérisées par des amas hypercellulaires lymphocytaires sans lésion myélinique visible et une activité des monocytes. Plusieurs études ont mis en évidence que l'atteinte la plus prépondérante des NAWM et des NAGM serait la dégénérescence des axones à distance des lésions actives (Dehmeski *et al.*, 2003 ; Kutzelnigg *et al.*, 2005 ; Kutzelnigg *et al.*, 2007). Ces zones sont associées à une atrophie cérébrale progressive et qui se trouve également au niveau de la ME et qui est à l'origine de l'aggravation des déficits neurologiques (Cairns *et al.*, 2022).

### 5.3. Progression de la sclérose en plaques

La progression de la SEP se fait en plusieurs étapes (Lassmann *et al.*, 2012; Kamm *et al.*, 2014) (Figure 9) :

- 1) Elle commence par une atteinte de la gaine de myéline causant un ralentissement et une perturbation de l'influx nerveux, correspondant à l'apparition des symptômes ;
- 2) S'ensuit une remyélinisation plus ou moins complète, afin de restaurer le défaut de conduction, s'accompagnant d'une cicatrisation. Dans ce cas, il y a un rétablissement de l'influx nerveux, qui se traduit par une atténuation des symptômes de la SEP ;
- 3) Au cours du temps, la démyélinisation peut s'aggraver et la remyélinisation s'épuise conduisant à une dégénérescence de l'axone lui-même ce qui entraîne un blocage de l'influx nerveux. Ceci se traduit cliniquement par l'aggravation des symptômes et l'installation de handicaps irréversibles (Lassmann *et al.*, 2012).



**Figure 9 : Etapes de progression de la sclérose en plaques**  
Extrait de Lassmann *et al.*, 2012

#### 5.4. Hypothèses étiologiques

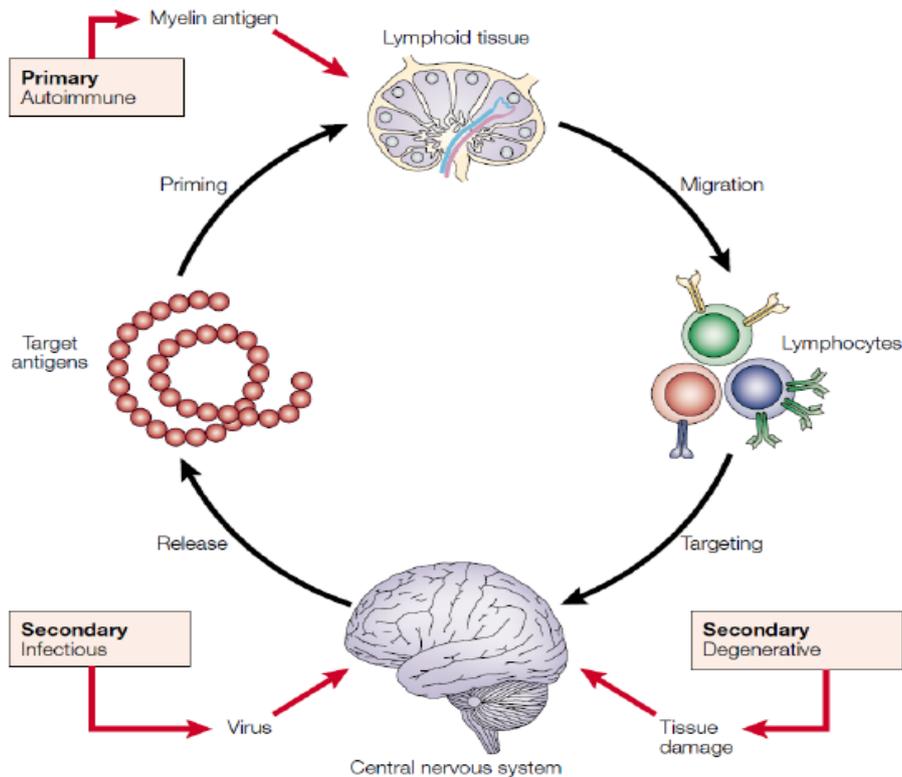
*Pour revue : Hemmer et al., 2002 ; Nicol et al., 2017 ; Tobore, 2019*

Même si l'élément initiateur de la SEP reste inconnu, l'activation du système immunitaire en périphérie est un élément physiopathologique « fondamental » de cette maladie. Plusieurs hypothèses ont été proposées afin d'expliquer le lien entre cette activation immunitaire périphérique et les lésions observées dans le SNC (**Figure 10**) (**Hemmer et al., 2002 ; Nicol et al., 2017**) :

- la SEP serait une maladie auto-immune d'origine intrinsèque,
- la SEP trouverait son origine dans une infection virale anormalement résolue,
- la SEP serait primitivement une atteinte du SNC, induisant par la suite une activation du système immunitaire périphérique et dans un second temps une infiltration de cellules immunes au sein du SNC.

Pour la première hypothèse, plusieurs mécanismes auto-immuns ont été proposés et/ou démontrés chez les patients SEP sans qu'ils puissent formellement être établis leur rôle exact dans le développement des lésions tissulaires. L'une des hypothèses la plus fréquemment avancée est l'activation de lymphocytes T auto-réactifs dirigés contre un ou des antigènes myéliniques (**Noseworthy et al., 2000 ; Frohman et al., 2006**). La seconde hypothèse de réaction croisée repose à la fois sur une origine auto-immune et virale. Selon cette hypothèse les protéines du soi reconnues par le système immunitaire présentent un mimétisme moléculaire avec une protéine d'un agent pathogène ayant provoqué une réponse immunitaire préalable. Enfin dans la dernière hypothèse, une première atteinte dégénérative induirait une activation des cellules immunes innées au sein du SNC, dont les cellules

microgliales, qui se propagerait vers la périphérie du fait de la libération/diffusion des peptides antigéniques provenant du SNC provoquant un dysfonctionnement immunitaire aboutissant à une réponse périphérique immune qui attaquerait à nouveau le SNC (**Figure 10**).



**Figure 10 : Représentation schématique des différentes hypothèses étiologiques du développement de la sclérose en plaques**

Dans l'hypothèse primaire auto-immune, les antigènes neuronaux sont libérés dans le nœud lymphatique, où ils sont présentés à des LT et LB par des cellules présentatrices de l'antigène (telles que les cellules dendritiques). Les LT et LB vont proliférer et s'activer contre cet antigène, quitter le nœud lymphatique, migrer dans le SNC où ils rencontrent l'antigène initial (cela peut être la gaine de myéline du SNC). Les lymphocytes vont recruter des fonctions effectrices et détruire les cellules exprimant l'antigène. Dans l'hypothèse secondaire infectieuse, les antigènes seront issus de l'agent infectieux (non soi) avec une homologie de séquence pour un antigène du soi conduisant à une réactivation immune par réaction croisée dirigée contre l'antigène du soi. Enfin, dans l'hypothèse secondaire dégénérative, une première lésion du SNC va conduire à la production d'antigènes dirigés contre certaines structures de ce tissu. Après une première réponse immune périphérique dans les nœuds lymphatiques, la réactivation se fera de nouveau dans le SNC par nouvelle interaction avec l'antigène initial.

**Extrait de Hemmer *et al.*, 2002**

## 5.5. Pathogenèse de la sclérose en plaques : Mécanismes cellulaires et moléculaires

*Pour revue : Yong and Yong, 2022*

La pathogenèse de la SEP débute par une rupture de la BHE suite à une inflammation provoquée par les lymphocytes. Ceux-ci vont pénétrer dans le SNC, attaquer la gaine myélinique provoquant une démyélinisation, ce qui aura pour conséquence une altération de la conduction de l'influx nerveux. Afin de restaurer la conduction saltatoire normale de l'influx nerveux, une remyélinisation pourra se produire, mais ce phénomène sera limité dans l'espace et dans le temps. Au cours du temps, une activation microgliale et astrocytaire se développera, tout d'abord bénéfique (cicatrisation) avant de s'avérer délétère pour conduire à une dégénérescence axonale.

### 5.5.1. Implication de la réponse immune et inflammatoire

*Pour revue : Kutzelnigg and Lassmann, 2014 ; Hemmer et al., 2015 ; Baecher-Allan et al., 2018 ; Defer et al., 2019*

#### A. Immunité adaptative

En périphérie, les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) notamment les cellules dendritiques sont activées et présentent les antigènes aux cellules LT CD8<sup>+</sup> et CD4<sup>+</sup>, qui sont alors activées. Ces différentes populations de LT vont coordonner différents types de réponses immunitaires, dont la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, IFN- $\gamma$  et TNF- $\alpha$ , induisant une inflammation des cellules endothéliales de la BHE et l'expression de molécules d'adhésion telles que la molécule d'adhésion vasculaire de type-1 (VCAM-1), la molécule d'adhésion intracellulaire de type 1 (ICAM-1) et la sélectine E. De plus, ces LT expriment à leur surface des intégrines qui interagissent avec ces molécules d'adhésion cellulaire dont l'intégrine  $\alpha 4$ , l'antigène 1 associé à la fonction lymphocytaire (LFA-1) et la sélectine P, ce qui va permettre leur migration trans-endothéliale (**Hemmer et al., 2002**). Tous ces événements participent à la rupture de la BHE qui est une étape essentielle de la formation des lésions.

Les LT CD8 sont les premières cellules immunes présentes dans les lésions et représentent 60 à 85% des LT retrouvés dans les lésions actives ou inactives alors que les LT CD4 représentent uniquement 20 à 30%. La répartition de ces LT est restreinte aux régions périvasculaires, alors que dans le parenchyme cortical de rares infiltrats sont retrouvés. Les LT infiltrant le SNC produisent des cytokines pro-inflammatoires, dont l'IL-17 et l'IL-21. Ces deux interleukines déterminent par la suite la réponse inflammatoire avec deux profils Th1 et Th17. Les Th1 sécrètent à leur tour du TNF- $\alpha$  et de l'IFN- $\gamma$  alors que les Th17 sécrètent l'IL-

17, l'IL-21, l'IL-22 et l'IFN- $\gamma$ . Contrairement aux Th1 et Th17, les Th2 sont souvent décrits comme ayant un rôle neutre, et même bénéfique dans la maladie grâce à leur action anti-inflammatoire due à la sécrétion de l'IL-4, IL-5 et IL-13 (Nicol *et al.*, 2017). Les LB et les plasmocytes sont dispersés dans les lésions actives précoces avec un nombre variable qui croît dans les agrégats inflammatoires des méninges lors de la chronicisation des lésions.

### B. Immunité innée

Dans la SEP, deux composantes issues du système immunitaire inné semblent être importantes : les cellules immunitaires innées périphériques dont les macrophages, les cellules Natural Killer (NK) et les mastocytes et celles résidentes dans le SNC.

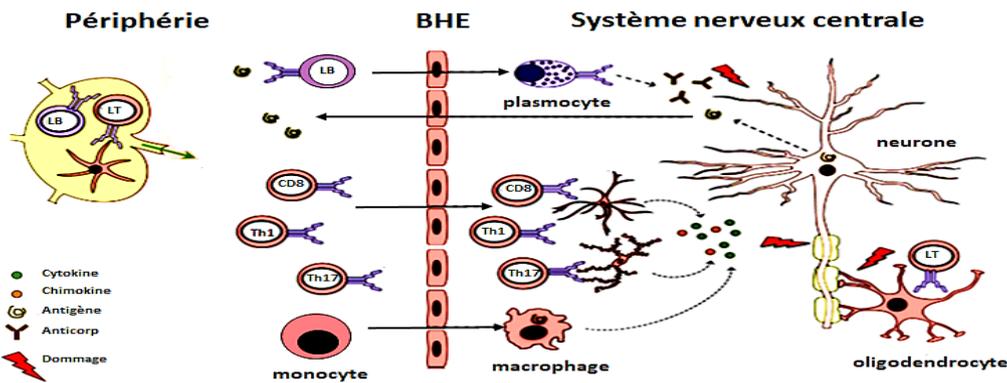
Les macrophages représentent la majorité des cellules de l'immunité innée infiltrant les lésions (Nicol *et al.*, 2017). Ils présentent un profil de monocytes circulants exprimant à leur surface les récepteurs aux chimiokines de type 1 et 5.

Le rôle des cellules NK dans la SEP reste controversé à l'heure actuelle. D'une part, il est connu que ces cellules exercent un effet bénéfique dans les maladies auto-immunes en supprimant l'activation des LT et la production d'IFN- $\gamma$  et en sécrétant les cytokines anti-inflammatoires IL-4, IL-10. Elles sont fortement présentes durant même les périodes d'amélioration de la maladie chez certains patients atteints de la SEP. D'autre part, elles exercent un effet cytolytique et pro-inflammatoire sur diverses cellules immunitaires dont les LB ou les LT. Elles sécrètent les cytokines pro-inflammatoires TNF- $\alpha$  et de l'IFN- $\gamma$  (Nicol *et al.*, 2017).

Les mastocytes ont aussi été décrits dans la maladie. Au niveau des lésions actives chroniques, ces cellules ont été détectées au sein des méninges, des plexus choroïdes, du parenchyme cérébral et même à la bordure de la lésion (Nicol *et al.*, 2017).

En plus des cellules périphériques infiltrantes, viennent s'ajouter les cellules immunitaires résidentes du SNC, les cellules microgliales. Ces cellules sont recrutées lors de l'inflammation initiale suite à la sécrétion d'IFN- $\gamma$  et d'autres cytokines pro-inflammatoires. Ces cellules activées sont retrouvées de façon abondante dans les lésions actives et elles amplifient le phénomène inflammatoire par la sécrétion d'IL-1, d'IL-6, de TNF- $\alpha$  et des chimiokines participant au recrutement de cellules de l'immunité adaptative de la périphérie vers le SNC, notamment des lymphocytes Th17 (Nicol *et al.*, 2017).

La **Figure 11** résume les mécanismes moléculaire et inflammatoire de la SEP.



**Figure 11 : Mécanismes immunitaire et inflammatoire de la sclérose en plaques**

La lésion de la barrière hémato-encéphalique (BHE) et/ou l'hyperactivation des cellules microgliales au niveau du SNC entraînent une infiltration massive des cellules T auto-réactives (cellules T auxiliaires CD8 et CD4), des lymphocytes B (LB) et des cellules présentatrices d'antigènes (CPA) comprenant des monocytes et des macrophages. Dans le cerveau, les LT et les monocytes/macrophages libèrent des cytokines et des chimiokines conduisant à une destruction des cellules oligodendrocytaires et à une démyélinisation. De manière concomitante, les LB produisent des anticorps (Ac) spécifiques, qui forment des complexes d'attaque membranaire qui endommagent la gaine de myéline. Ces processus conduisent à une suractivation de la microglie et des astrocytes, qui potentialisent davantage la réponse inflammatoire et le processus neurodégénératif.

Extrait de Chiurchiù *et al.*, 2018

### 5.5.2. Démyélinisation et remyélinisation

*Pour revue : Kutzelnigg and Lassmann, 2014 ; Lubetzki and Stankoff, 2014 ; Defer et al., 2019 ; Simkins et al., 2021*

#### A. Démyélinisation

La démyélinisation se représente par une dégradation de la gaine de myéline qui entoure les axones. Elle intervient au niveau des lésions quelques jours à quelques semaines après l'initiation de la réponse immune (Compston and Coles, 2008 ; Kutzelnigg and Lassmann, 2014).

Après avoir infiltré la BHE, les lymphocytes activés vont générer des lésions tissulaires. Les LT CD8<sup>+</sup> reconnaissent directement les Ag présentés par des cellules oligodendrocytaires entraînant des dommages directs tandis que les LB en présence de leurs Ag se différencient en plasmocytes et produisent une grande quantité d'Ac qui vont léser la myéline soit par opsonisation, soit par activation de la voie du complément. Les LT par libération de différents facteurs décrits ci-dessus vont activer les cellules microgliales et les macrophages résidents ausein du SNC. Ces cellules résidentes vont sécréter à leur tour des enzymes protéolytiques de

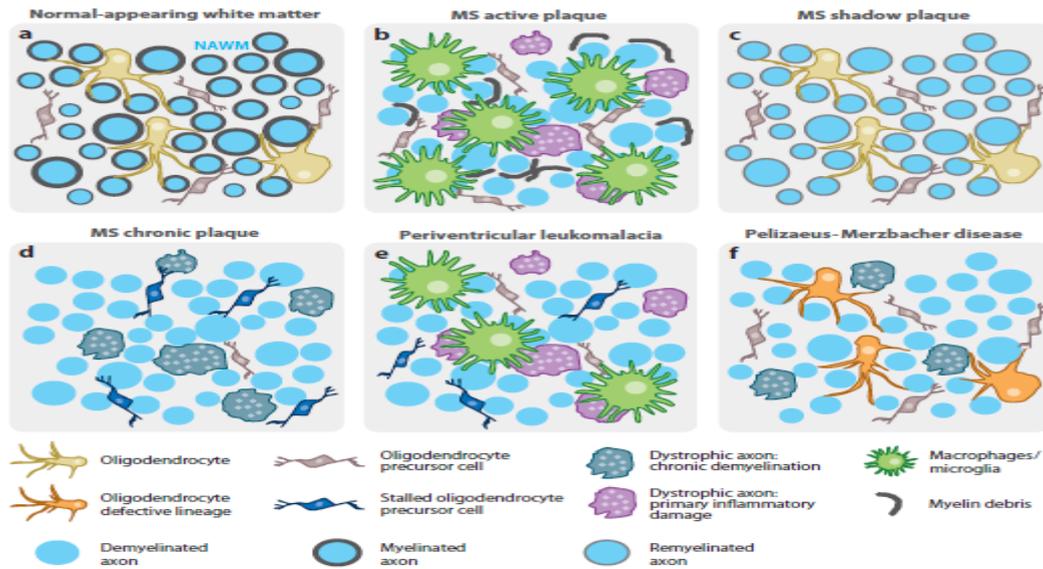
type métalloprotéinase (MMP) et vont également surexprimer une forme inductible de nitrique oxyde synthase (iNOS) permettant la synthèse de monoxyde d'azote (NO) et la libération de radicaux libres (RL) de type anion superoxyde. La réaction inflammatoire s'amplifie par la sécrétion de chimiokines, dont l'IL-10, par les cellules microgliales et les macrophages qui permettent le recrutement de LT CD8<sup>+</sup> et de LB supplémentaires et l'aggravation de la démyélinisation.

Dans les zones actives de démyélinisation, un degré variable de dégénérescence d'oligodendrocytes (OLG) est observé suivie par une apparition de nouveaux OLG au centre des plaques inactives grâce à la maturation de précurseurs oligodendrocytaires (OPC) présents dans le tissu. Au cours de la chronicisation de la lésion, une perte progressive des OLG est observée ; lorsque celle-ci devient massive des OLG, le recrutement de nouveaux OPC devient impossible. Les différentes attaques ciblant les OLG conduisent alors à la démyélinisation, à l'hyperexcitabilité neuronale et à un ralentissement ou blocage de l'influx nerveux.

## B. Remyélinisation

*Pour revue : Compston and Coles, 2008 ; Lubetzki et al., 2020 ; Cunniffe and Coles, 2021*

Au sein de certaines lésions actives précoces, une remyélinisation est observée et les OLG sont retrouvés en abondance. Dans certaines de ces lésions, cette remyélinisation endogène peut être complète mais les gaines nouvellement formées sont caractérisées par une moindre épaisseur et par des internœuds plus courts, conférant sur les colorations myéliniques un aspect pâle aux plaques remyélinisées dénommées « shadow plaques » (**Figure 12**). Lors de la phase inflammatoire aiguë, et plus précisément durant les phases de clairance des débris myéliniques, la remyélinisation est plus active alors qu'elle est en moindre proportion lors de la chronicisation de l'inflammation. Dans les lésions actives, les neurones démyélinisés sécrètent de la sémaphorine et provoquent la migration des OPC vers ces zones où ils se multiplient et se différencient en OLG myélinisants. Dans les lésions chroniques, les OPC sont rares et la remyélinisation est absente par absence de sécrétion de sémaphorine ou par incapacité des rares OPC à se différencier. Au cours du temps, le phénomène de remyélinisation tend à disparaître, y compris dans les lésions actives, car le « pool » d'OPC disponibles au sein du SNC s'épuise suite à la succession de cycles de démyélinisation et de remyélinisation (**William et al., 2007**). Enfin, il est important de noter qu'une répétition des phases de démyélinisation et de remyélinisation peut avoir lieu au sein d'une même lésion.



**Figure 12 : Représentation schématique du niveau de myélinisation et des cellules associées dans les différents types de plaques retrouvées dans la sclérose en plaques**

Coupes transversales d'axones (ronds bleus) dans :

- la substance blanche d'apparence normale (NAWM) où les axones sont myélinisés et entourés d'oligodendrocytes et de précurseurs oligodendrocytaires,
- une plaque active chronique où les axones sont démyélinisés et entourés de cellules immunes activées, de débris de myéline et de précurseurs oligodendrocytaires,
- une « shadow plaque » où les axones sont remyélinisés avec une gaine de myéline plus fine et entourés d'oligodendrocytes et de précurseurs oligodendrocytaires,
- une plaque inactive chronique où les axones sont démyélinisés et entourés d'un nombre réduit de précurseurs oligodendrocytaires sains, mais d'un nombre important de précurseurs oligodendrocytaires incapables de se différencier.

De façon notable, des axones dystrophiques en train de dégénérer sont observables dans la plaque active chronique et dans la plaque inactive chronique.

**Extrait de Fancy *et al.*, 2011**

### 5.5.3. Neurodégénérescence

**Pour revue : Kutzelnigg and Lassmann, 2014 ; Mahad *et al.*, 2015; Correale *et al.*, 2019**

#### A. Neurodégénérescence primaire

Le concept que la SEP est une affection d'origine immune a commencé à être remise en question depuis le milieu des années 90, suite à l'observation d'un phénomène de neurodégénérescence apparaissant lors des stades précoces et ne répondant pas aux traitements immunosuppresseurs classiquement utilisés dans la maladie (Lucchinetti *et al.*, 2011 ; Kutzelnigg and Lassmann, 2014). Cette neurodégénérescence sous-jacente cérébrale et

médullaire est précoce, chronique et indépendante de la phase initiale de la maladie (**Mahadet et al., 2015**). Elle peut survenir dès le début de la maladie conduisant à une perte axonale qui se traduit cliniquement par une progression du handicap tant sur le plan moteur que cognitif, et qui correspond de façon prépondérante à la symptomatologie des formes progressives, contribuant ainsi à l'évolution de la SEP progressive (**Hauser and Oksenberg, 2006 ; Bermel and Bakshi, 2006**). A ce jour, le mécanisme exact de cette neurodégénérescence primaire n'est pas élucidé mais plusieurs hypothèses ont été émises.

## **B. Neurodégénérescence secondaire à la réponse immunitaire et à l'inflammation**

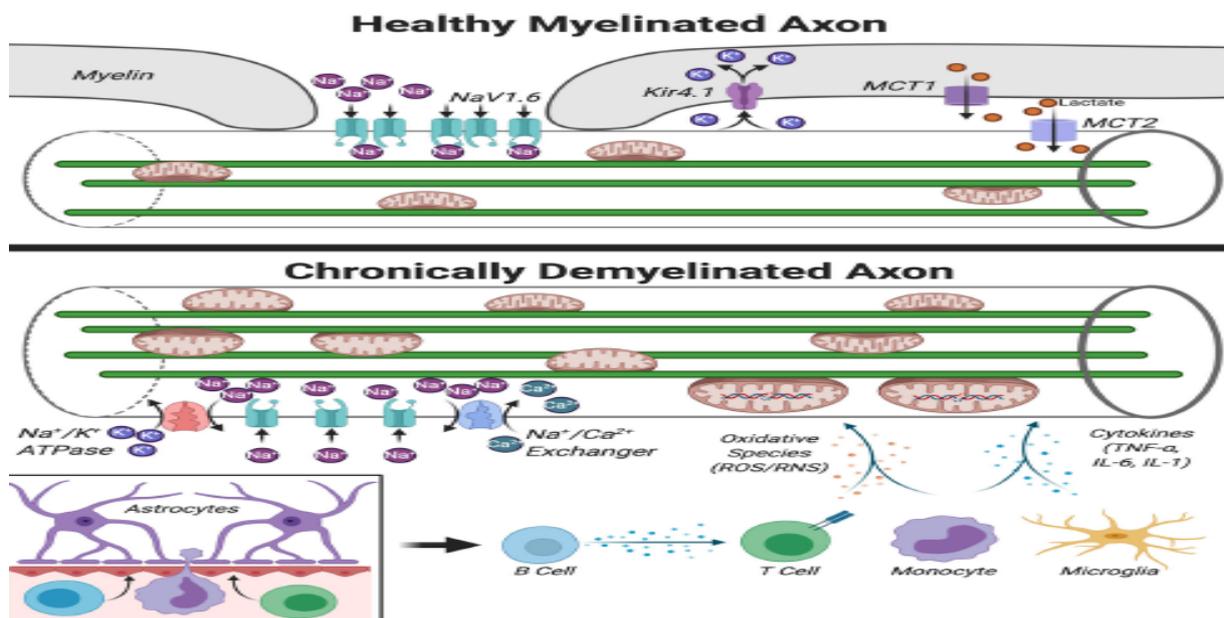
*Pour revue : Hemmer et al., 2002 ; Haines et al., 2011 ; Friese et al., 2014; Barcelos et al., 2019 ; Correale et al., 2019 ; Simkins et al., 2021*

### **a. Atteinte axonale dépendante de la démyélinisation**

Cette dégénérescence peut survenir directement après la démyélinisation dans certaines lésions et notamment au sein des lésions actives précoces où des macrophages et des cellules microgliales activées sont retrouvés à proximité d'axones lésés. Les atteintes axonales sont plus fréquentes dans les lésions chroniques, particulièrement les lésions chroniques inactives, que dans les NAWM ; elles sont rares dans les lésions remyélinisées. Des observations suggèrent l'existence de deux mécanismes différents qui sont à l'origine de la dégénérescence axonale en fonction du type de lésion. Les lésions axonales sont rapides et médiées par les cellules immunitaires et leurs médiateurs pro-inflammatoires au sein des lésions démyélinisantes actives alors qu'elles sont lentes et progressives *via* des mécanismes d'action plus complexes au sein des plaques inactives (**Kutzelnigg and Lassmann, 2014**). Dans les lésions actives aiguës ou chroniques, la dégénérescence débute dans les axones démyélinisés qui se trouvent en contact direct avec le tissu inflammé au niveau desquels la conduction du message nerveux est perturbée (**Hemmer et al., 2002 ; Kutzelnigg and Lassmann, 2014**).

De plus, afin de maintenir une transmission normale de l'influx nerveux, plusieurs mécanismes se mettent en place et peuvent avoir des conséquences délétères à long terme. Tout d'abord, au niveau des nœuds de Ranvier, les canaux sodiques, calciques et les récepteurs glutamatergiques se redistribuent tout au long de l'axone afin de maintenir la transmission de l'information de proche en proche (**Kornek et al., 2001**). Cette redistribution des canaux ioniques le long de l'axone va induire une augmentation de la demande énergétique (**Werner et al., 2001**) qui aura pour conséquence une augmentation du nombre de mitochondries accompagnée de certaines modifications morphologiques, notamment une

augmentation de taille (Mahad *et al.*, 2009). Malgré cela, la production d'adénosine triphosphate (ATP) ne sera pas suffisante pour le bon fonctionnement des pompes  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase. Il y aura alors accumulation de sodium au sein de l'axone conduisant au fonctionnement inverse des échangeurs  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  avec pour conséquence une augmentation de la concentration intracellulaire en  $\text{Ca}^{2+}$  (Figure 13). Une activation de protéases est retrouvée suite à cet excès de calcium, induisant un dysfonctionnement du transport axonal et de la fonction mitochondriale. Le dysfonctionnement des pompes  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase limite les capacités de repolarisation des axones, ce qui contribue au développement des troubles neurologiques (Dutta and Trapp, 2014).



**Figure 13 : Représentation schématique des processus métaboliques et homéostatiques clés dans un axone myélinisé sain par rapport à un axone chroniquement démyélinisé dans la sclérose en plaques**

IL-1 : Interleukine 1 ; IL-6 : Interleukine 6 ; Kir 4 : Canaux potassiques rectifiant dans le sens entrant ; MCT : Monocarboxylate transporteur ; NaV1.6 : Canal sodique voltage-dépendant ; RNS : Espèces réactives de l'azote ; ROS : Espèces réactives d'oxygène ; TNF- $\alpha$  : Facteur de nécrose tumorale alpha.

Simkins *et al.*, 2021

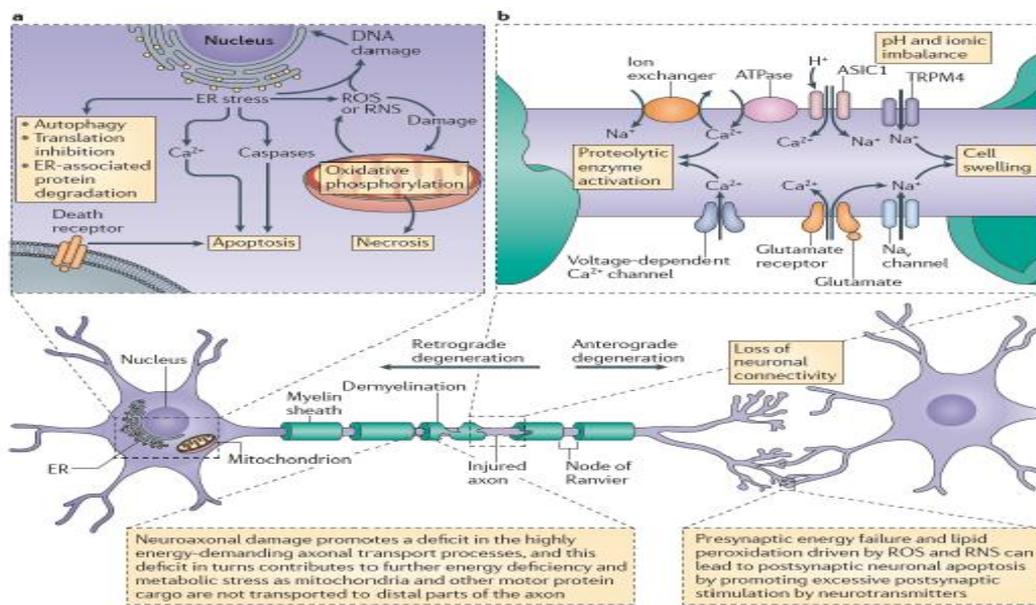
### b. Atteinte axonale indépendante de la démyélinisation

Outre la démyélinisation, la dégénérescence axonale pourrait également être due à d'autres facteurs. En effet, des lésions axonales diffuses ont été trouvées dans des zones du SNC en absence de phénomène de démyélinisation. Ces lésions seraient provoquées par un phénomène de transection des axones secondaires à de la dégénérescence Wallerienne

ourétrograde. C'est notamment le cas de la neurodégénérescence axonale observée au niveau de la NAWM (Dziedzic *et al.*, 2010).

Pour qu'une dégénérescence de l'axone puisse être induite directement en l'absence de démyélinisation, plusieurs mécanismes seraient impliqués notamment médiés par des cellules immunitaires. Ces cellules vont libérer des molécules cytolytiques, dont la perforine et/ou le granzyme B, qui sont dirigées contre les OLG mais également contre les axones des neurones, ainsi que des cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- $\alpha$  qui va à son tour participer aux processus de dégénérescence axonale (Kutzelnigg and Lassmann, 2014).

L'ensemble des mécanismes clés des processus impliqués à l'origine de la dégénérescence axonale est représenté dans la figure suivante (Figure 14) :



**Figure 14 : Les mécanismes clés des processus à l'origine de la dégénérescence axonale**

Dans la sclérose en plaques, l'inflammation chronique induit la production des espèces réactives d'oxygène (ERO) et des espèces réactive de l'azote (ERA) qui vont altérer le fonctionnement mitochondrial (a). Ceci favorise le stress métabolique, le mauvais repliement des protéines dans le réticulum endoplasmique (RE), une déficience énergétique. Une redistribution des canaux a lieu afin de permet de maintenir la conduction nerveuse, elle induit un déséquilibre ionique à l'origine d'une accumulation de glutamate dans l'axone conduisant à sa dégénérescence (b).

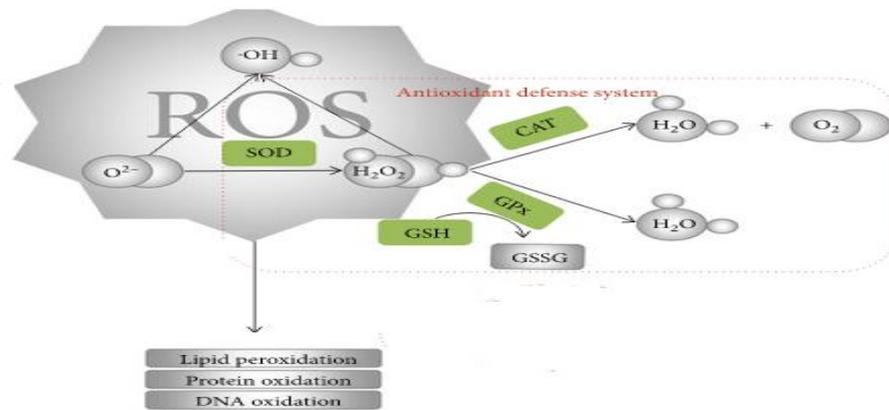
Extrait de Dendrou *et al.*, 2015

#### 5.5.4. Stress oxydant

##### A. Généralités sur le stress oxydant

*Pour revue : Ohl et al., 2016 ; Adamczyk and Adamczyk-Sowa, 2016 ; Waslo et al., 2019 ; Tanaka and Vécsei, 2020 ; Mannucci et al., 2021*

En conditions physiologiques, les systèmes biologiques produisent des radicaux libres (RL) ou espèces pro-oxydantes. Ces molécules sont indispensables pour certaines fonctions cellulaires, mais sont aussi très instables et peuvent rapidement causer des dommages tissulaires. Au sein de l'organisme, les systèmes de défense antioxydants existent afin de maintenir un niveau non cytotoxique des RL en les dégradant ou en empêchant la formation de ces espèces fortement réactives. Le stress oxydant est défini comme un déséquilibre entre la production des espèces pro-oxydantes qui est augmentée et la diminution du pouvoir des systèmes de défenses antioxydants engendrant des dégâts souvent irréversibles (**Dizdaroglu and Karakaya, 2012**). Le stress oxydant peut entraîner des dommages sur les macromolécules cellulaires (**Figure 15**), jouant ainsi un rôle important dans la physiopathologie d'une variété de maladies neurodégénératives, dont la SEP.



**Figure 15 : Schéma des principaux radicaux libres et de leurs effets sur les macromolécules et la défense antioxydante enzymatique**

ROS : Espèces réactives de l'oxygène	CAT : Catalase
SOD : Superoxyde dismutase	GPx : Glutathion peroxydase
GSH : Glutathion forme réduit	GSSH : Forme oxydée du glutathion

## B. Les radicaux libres

Les espèces pro-oxydantes (ou RL) sont des molécules possédant au moins un électron libre non apparié sur leur orbitale externe. Ces radicaux sont très réactifs et instables, car ils cherchent à transférer leur électron sur des molécules environnantes. Ainsi, ils participent à des réactions en chaîne pour former de nouveaux RL. Un radical est d'autant plus réactif qu'il a une durée de vie courte et qu'il a la possibilité de transférer son électron libre sur une autre molécule. Dans les systèmes biologiques, les RL les plus importants sont les espèces réactives de l'oxygène (ROS) et de l'azote (RNS) (**Alkadi, 2020**).

Le dioxygène ( $O_2$ ) est un élément indispensable au fonctionnement normal de tous les organismes vivants. Son rôle dans la survie cellulaire est associé à son potentiel redox élevé, ce qui fait de lui un excellent agent oxydant capable de capter facilement des électrons libres à partir de substrats réduits. Selon leurs nécessités métaboliques, les cellules ont des besoins différents en oxygène. Les neurones et les astrocytes sont en grande partie responsables de la consommation massive d'oxygène et de glucose par le cerveau. Ainsi, si le cerveau ne représente qu'environ 2% du poids total du corps, il requiert plus de 20% de la consommation totale d'oxygène (Halliwell, 2015). Les états de spin identiques de ses deux électrons orbitaux externes confèrent à l'oxygène une très grande stabilité, à l'exception de l'action de catalyseurs appropriés qui brouillent les états spin des électrons pour produire des formes d'oxygène partiellement réduites, intermédiaires radicalaires très réactifs et très instables, les ROS.

Ces ROS incluent à la fois des espèces radicalaires, tels que le radical hydroxyl ( $\cdot OH$ ) et l'anion superoxyde ( $O_2^{\cdot -}$  ou  $O_2^-$ ), et des espèces non radicalaires tels que le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), l'oxygène singulet ( $^1O_2$ ) et le trioxygène ou ozone ( $O_3$ ) qui peuvent être facilement convertis en RL (Figure 16) (Halliwell, 2015 ; Chen *et al.*, 2012).

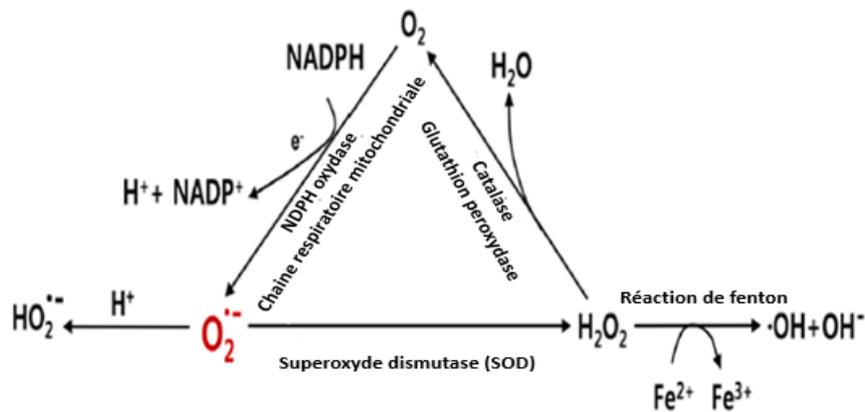


Figure 16 : Génération des espèces réactives de l'oxygène

L'anion superoxyde ( $O_2^{\cdot -}$ ), est généré à partir d' $O_2$  en tant que sous-produit du complexe de la chaîne respiratoire mitochondriale ou par l'nicotinamide adénine dinucléotide phosphate oxydase (NADPH). La superoxyde dismutase (SOD), transforme le  $O_2^{\cdot -}$  en peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), qui peut ensuite être transformé en plusieurs autres ERO tels que le radical hydroxyl ( $OH\cdot$ ) et l'anion hydroxyl ( $OH^-$ ).

Extrait de Chen *et al.*, 2012

Il existe deux sources de production des ROS : les sources exogènes et les sources endogènes. Parmi les sources exogènes, sont retrouvés les médicaments, les toxines, des produits

chimiques, les UV et les rayonnements ionisants. Les sources endogènes sont généralement médiées par des enzymes mitochondriales et non-mitochondriales dont les xanthines oxydases (XO), le nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) oxydases (NOXs), les cytochromes P450 du RE et les flavines oxydases du peroxyosome (Song and Zou, 2015). La mitochondrie est considérée comme la principale source de production endogène de ROS et ceci par le biais de plusieurs voies qui sont principalement modulées par les complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale (Widlansky and Gutterman, 2011), notamment les complexes I et III (Song and Zou, 2015). Dans certaines maladies neurodégénératives, le complexe I produit de manière excessive les ions superoxyde  $O_2^{\cdot-}$  (Zorov *et al.*, 2014) qui peuvent traverser la membrane mitochondriale interne où, sous l'action des SOD, ils peuvent être réduits en  $H_2O_2$ . Ce dernier sous l'action de la catalase péroxysomale est converti en  $H_2O$  et  $O_2$ . Le  $H_2O_2$  libéré dans le cytosol peut alors être converti en  $OH^{\cdot}$  hautement réactif et nocif, via la réaction de Fenton en cas d'un dysfonctionnement péroxysomal et en présence des métaux de transition de type  $Fe^{2+}$  (Valko *et al.*, 2007).

Une autre source endogène importante de production des ROS sont les peroxyosomes. En effet, ils produisent la majorité du  $H_2O_2$  cellulaire et ils possèdent des catalases capables de le décomposer. Ils permettent donc de maintenir l'équilibre entre la production et l'élimination des ROS. Ainsi, lorsque les peroxyosomes sont endommagés, cela peut entraîner un stress oxydant à cause de l'augmentation de la libération de  $H_2O_2$  dans le cytosol suite à une diminution de la quantité de catalase (Valko *et al.*, 2007).

### C. La défense antioxydante

La cellule doit s'opposer au développement d'un stress oxydant, en maintenant l'équilibre entre la production des ROS d'une part et leur destruction d'autre part. Ceci est assuré par des systèmes antioxydants qui peuvent être soit des antioxydants enzymatiques (primaires), soit des antioxydants non enzymatiques (secondaires).

#### a. Antioxydants enzymatiques (primaires)

Ce système est principalement composé des enzymes que sont les superoxydes dismutases (SOD), la catalase (CAT), les glutathion peroxydases (GPx) et les thiorédoxines.

##### • La superoxyde dismutase

La SOD représente la première ligne de défense contre les ROS et elle joue un rôle important dans la dismutation de l' $O_2^{\cdot-}$  hautement réactif en  $H_2O_2$  et en  $O$ . Il existe trois

isoformes qui se distinguent en fonction de leur localisation cellulaire et de leur cofacteur métallique : SOD1

(Cu/Zn-SOD) est la forme nucléaire ou cytosolique associée aux ions Cuivre et/ou Zinc, SOD2 (Mn-SOD) est la forme mitochondriale associée au Manganèse et SOD3 est une forme extracellulaire (**Dasuri et al., 2013**).

- **La glutathion peroxydase**

La GPx appartient à une famille de multiples isoenzymes qui métabolisent une grande variété d'hydroperoxydes (R-OOH). Elle catalyse aussi la réduction de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en utilisant le glutathion réduit (GSH) comme donneur d'électrons. La GPx est située à la fois dans le cytosol et les membranes mitochondriales et est impliquée dans la diminution de la peroxydation lipidique. Il existe plusieurs isoformes et la nature de chaque isoforme ainsi que leur localisation cellulaire définissent son activité antioxydante. L'une des principales enzymes antioxydantes du cerveau est la GPX1 localisée dans le cytosol et les mitochondries. Des études antérieures ont suggéré que la régulation de la GPX1 pourrait être un des mécanismes protecteurs contre les lésions neuronales (**Power and Blumbergs, 2009**).

- **La catalase**

La CAT est une enzyme responsable de la conversion de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en H<sub>2</sub>O et en O<sub>2</sub> en utilisant le Fer ou le Manganèse comme cofacteur. Elle est localisée préférentiellement au niveau du peroxydosome mais aussi dans le cytoplasme et les mitochondries en faible quantité (**Gandhi and Abramov, 2012**).

#### **b. Antioxydants non enzymatiques (secondaires)**

Les antioxydants secondaires sont considérés comme des piègeurs de RL non enzymatiques. Contrairement aux enzymes, la plupart des antioxydants secondaires ne sont pas synthétisés dans l'organisme et doivent donc être apportés par l'alimentation. Dans cette catégorie, sont retrouvés les oligoéléments (cuivre, zinc, manganèse, fer, sélénium), certaines classes de polyphénols, le GSH, l'ubiquinone (CoQ10), l'alpha-tocophérol (ou vitamine E), l'acide ascorbique (ou vitamine C) et les caroténoïdes (**Baudin, 2020**).

#### **D. Stress oxydant en tant que lien entre inflammation et neurodégénérescence dans le cas de sclérose de plaques**

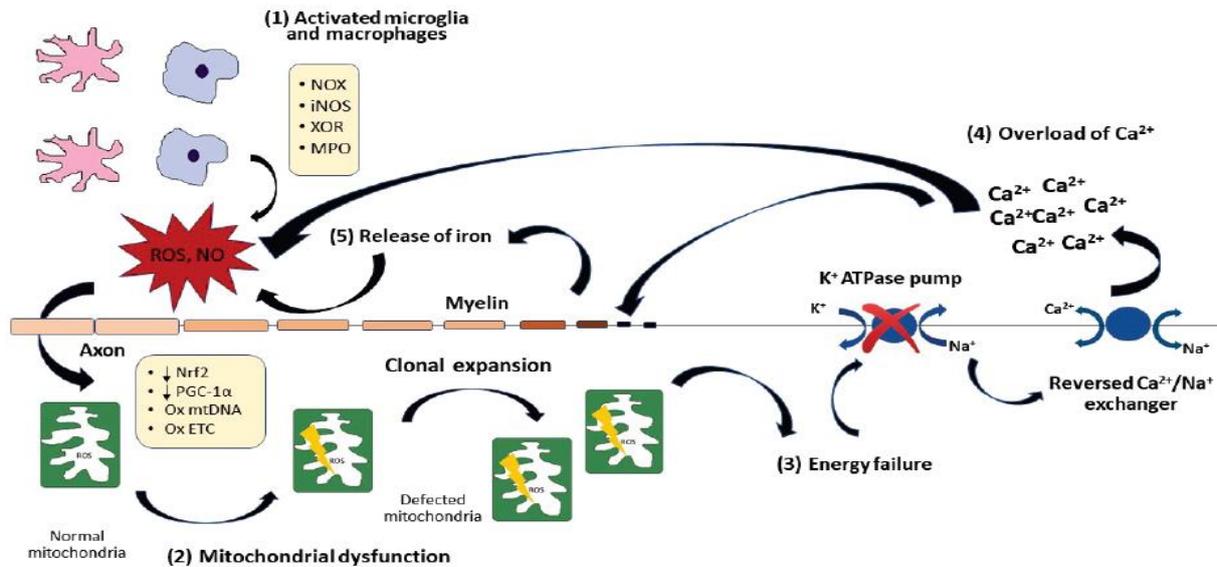
*Pour revue : Ciccarelli et al., 2014 ; Haider, 2015 ; Peruzzotti-Jametti and Pluchino, 2018 ; Michalíková et al., 2019*

Le cerveau est un organe particulièrement vulnérable au stress oxydant. En effet, le besoin accru en oxygène est associé à un métabolisme oxydatif élevé. Cependant, il est relativement déficient en enzymes antioxydantes (**Nunomura et al., 2006**), ce qui favorise l'augmentation de la production des ROS et des RNS. En plus, le SNC est riche en acides gras polyinsaturés qui sont facilement oxydés par des ROS (peroxydation lipidique) (**Perry et al., 2002**). La présence de la BHE est considérée comme un inconvénient supplémentaire pour le cerveau, le rendant encore plus sensible au stress oxydant. La BHE est conçue pour protéger le SNC contre les toxines en limitant leur diffusion vers les neurones et les cellules gliales. Cependant, elle empêche ou réduit l'absorption de certains agents antioxydants comme la vitamine E, ce qui facilite la propagation des RL et leurs effets toxiques. Le stress oxydant est ainsi un dénominateur commun de toutes les maladies neurodégénératives, puisqu'il participe toujours activement à la cascade d'événement conduisant à la dégénérescence (**Linand Beal, 2006**). L'implication du stress oxydant a été mise en évidence chez des patients atteints de SEP, caractérisé par des niveaux élevés en ROS et une altération du système de défense antioxydant entraînant la propagation du stress oxydant et l'évolution de la pathologie (**Ferretti et al., 2005 ; Van Meeteren et al., 2005 ; Koch et al., 2006**).

Au niveau des NAWM et des lésions chroniques, les axones comme les gaines de myéline sont en contact avec des cellules microgliales activées qui produisent des ROS par l'intermédiaire de la NOX et des myéloperoxydases. Ces ROS induisent l'oxydation des lipides contenus dans les axones et les gaines de myéline mais également dans les acides désoxyribonucléotides (ADN). De plus, les cellules immunitaires périphériques et les macrophages ayant infiltrés le SNC produisent également des ROS et des NOS induisant une atteinte de différents types cellulaires (neurones, OLG) ainsi que d'organites tels que les mitochondries (**Wang et al., 2014**).

Les mitochondries sont très sensibles aux ROS et NOS qui conduisent à un arrêt de la chaîne respiratoire mitochondriale et à la libération d'électrons induisant ainsi une seconde vague de production de ROS et une amplification du phénomène dégénératif (**Friese et al., 2014 ; Peruzzotti-Jametti and Pluchino, 2018**). Ainsi, les OLGs et les gaines de myéline endommagées libèrent dans l'espace extracellulaire l'ion  $Fe^{3+}$  qui se convertit en ion  $Fe^{2+}$  conduisant à une augmentation de la toxicité des ROS et participant dans certaines régions du cerveau à la propagation de la neurodégénérescence et de l'atrophie (**Mahad et al., 2015**).

En résumé, les principaux mécanismes responsables de la genèse du stress oxydant chez les patients atteints de SEP sont résumés dans la **Figure 17 (Haider, 2015)**.



**Figure 17 : Mécanismes de la lésion oxydative dans la sclérose en plaques**

La séquence temporelle et l'interrelation des événements redox dans la SEP sont différentes entre la SEP récurrente-rémittente et la SEP progressive mais aussi selon les stades d'avancement de la maladie et selon les patients. Par conséquent, cette figure n'illustre pas nécessairement une chronologie des événements de ceux présentés de (1) à (5), mais une possible co-existence de différentes situations. (1) La source initiale de la lésion oxydante est une activation des macrophages et de la microglie au cours de la phase inflammatoire de la maladie. Les enzymes responsables sont la NADPH oxydase (NOX), la forme inducible de l'oxyde nitrique synthase (iNOS), la xanthine oxydoréductase (XOR) et les myéloperoxydases (MPO). (2) Les espèces réactives libérées lors de la réponse inflammatoire à partir de la microglie et les macrophages endommagent les composants de la chaîne respiratoire, mettant en danger le métabolisme énergétique et la production d'adénosine triphosphate (ATP) par les mitochondries. Dans les conditions de phosphorylation oxydative inefficace (OxPhos), la chaîne respiratoire elle-même devient une source importante de stress oxydant. De plus, les espèces réactives endommagent l'ADN mitochondrial (ADNmt) provoquent des mutations de l'ADNmt. Au cours du temps, les mitochondries défectueuses sont amplifiées. (3) Une combinaison de ces événements entraîne finalement un déficit énergétique et une diminution de la production d'ATP. À un certain stade, le dysfonctionnement mitochondrial s'accumule : la production d'ATP devient alors insuffisante pour que la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase élimine l'excès de Na<sup>+</sup> des axones. L'augmentation intra-axonale de Na<sup>+</sup> entraîne l'inversion de l'échangeur Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>. (4) Cela conduit à une élévation de la concentration axonale en Ca<sup>2+</sup>, qui déclenche une cascade de plusieurs événements délétères, provoquant éventuellement une aggravation des perturbations des mitochondries intra-axonales et une production accrue de ROS, et enfin une dégénérescence axonale. (5) Le fer est physiologiquement stocké dans les feuillettes de myéline ; cependant, la démyélinisation déclenche sa libération dans l'espace extracellulaire. Par la suite, il subit une conversion en forme ferreuse divalente, ce qui peut augmenter la toxicité des ROS. Dans la réaction de Fenton, Fe<sup>2+</sup> est oxydé en Fe<sup>3+</sup>, tandis que le peroxyde d'hydrogène est converti en radical hydroxyle et anion hydroxyle hautement toxiques. Le fer libéré est absorbé par les macrophages et la microglie, qui libère et dépose du fer lors de la phagocytose des neurones endommagés. Une forte charge en fer peut même induire la mort cellulaire, après quoi le fer est davantage libéré, initiant une deuxième vague de stress oxydant et provoquant une amplification des lésions oxydantes.

Extrait de Michaličková *et al.*, 2019

## 6. Présentations cliniques

### 6.1. Formes cliniques

**Pour revue : Lublin et al., 2014 ; Baecher-Allen et al., 2018 ; Lublin et al., 2020**

L'évolution de la SEP au cours du temps est variable mais elle est généralement caractérisée par des épisodes aigus d'aggravation des signes cliniques suivis par des phases de récupération ou de détérioration progressive des fonctions neurologiques, ou la combinaison des deux. Vu cette hétérogénéité des formes cliniques, une première classification a été établie en 1996 (**Lublin and Reingold, 1996**) qui repose sur 4 grands motifs d'évolution de la maladie : la SEP précurrente-rémittente (SEP-RR), la SEP progressive primaire (SEP-PP), la SEP progressive secondaire (SEP-SP) et la SEP progressive à rechute (SEP-PR). Par la suite, cette classification a été révisée en 2011 par les sociétés américaines et européennes de la SEP et le «MS Phenotype Group» et deux nouvelles catégories ont été ajoutées : les syndromes radiologiquement isolés (RIS) et les syndromes cliniquement isolés (CIS). Réellement, le RIS ne constitue pas en lui-même un sous-type de SEP, mais plutôt un état de vulnérabilité pouvant évoluer vers une SEP et il correspond à la découverte fortuite par imagerie d'une inflammation démyélinisante en l'absence de signe clinique ou de symptôme. De même, le CIS ne constitue pas une forme de SEP à part entière mais les personnes qui le présentent ont un risque accru de développer une SEP et il correspond au premier événement clinique de la maladie qui associe des caractéristiques inflammatoires et démyélinisantes. Des études ont montré que si le CIS est associé à des lésions visibles à l'imagerie par résonance magnétique (IRM) suggérant une SEP, le patient présente un risque de 80% de développer une SEP dans les 10 ans alors que s'il n'est pas associé à des lésions typiques, ce risque diminue à 20% (**Thouvenot, 2015**) (**Figure 18**).

#### **6.1.1. Forme récurrente-rémittente (SEP-RR)**

La SEP-RR est la forme la plus fréquente et touche 85 à 90% des patients en début de la maladie (**Magy, 2009**). Elle se manifeste par des poussées qui sont des périodes durant lesquelles les signes neurologiques vont soit apparaître, soit réapparaître ou s'aggraver, suivies de rémissions qui sont des périodes durant lesquelles il y a atténuation ou disparition des symptômes (**Depaz et al., 2013**). Généralement, les poussées ne durent pas plus de quelques mois et au début de la maladie, elles sont espacées dans le temps avec une moyenne d'une à deux par année. Avec le temps, elles deviennent très souvent plus fréquentes. Au cours des périodes de rémission, la récupération est souvent complète en début de maladie et puis devient de moins en moins complète au cours du temps conduisant à la chronicisation voire à l'accumulation des atteintes neurologiques.

Les phases de poussées s'accompagnent d'un ralentissement voire d'un blocage de la conduction de l'influx nerveux causées par des phases d'inflammation démyélinisantes et un dysfonctionnement axonal. Les phases de rémission correspondent à la restauration de la conduction de l'influx nerveux grâce à la résorption de la réponse immune et inflammatoire et à la mise en place du phénomène de remyélinisation. C'est donc l'alternance entre les processus de démyélinisation et de remyélinisation qui est à l'origine du motif RR de cette forme de SEP. La forme RR peut durer pendant de nombreuses années (**Lublin et al., 2020**).

### 6.1.2. Formes progressives

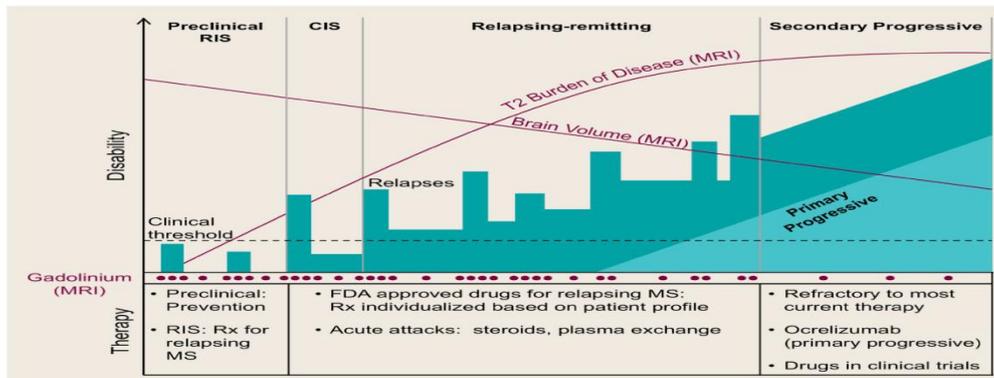
#### A. Formes secondaires progressives (SEP-SP)

La forme RR peut évoluer vers une forme secondairement progressive (SP) et ceci après une quinzaine d'année de développement de la maladie en moyenne. L'installation des troubles neurologiques et la progression du handicap de manière continue sont les caractéristiques de cette forme. Cette transition de la forme RR vers la forme SP affecte 50% des patients dans les 10 premières années de développement de la maladie, 70% dans les 20 premières années et jusqu'à 90 à 95% durant la totalité du développement de la maladie (**Ouallet and Brochet, 2004**). Cette forme serait expliquée par le fait que la chronicité de la maladie dépasse les capacités d'adaptation et de récupération du SNC en termes de remyélinisation comme de compensation des atteintes neuronales. Le point de transition de la forme RR vers la forme SP est repéré par l'évolution du profil des symptômes : les poussées disparaissent progressivement et une aggravation progressive des symptômes neurologiques est observée. Le suivi longitudinal des patients en imagerie a permis de montrer une accélération des phénomènes d'atrophie cérébrale et de perte axonale (L'aggravation progressive des symptômes serait ainsi à corrélérer à l'accumulation des processus neurodégénératifs (**Frischer et al., 2009**)). Le diagnostic de SEP-SP n'est pas facile à poser et nécessite souvent 1 à 3 années de surveillance de l'évolution des patients.

#### B. Formes progressive primaire (SEP-PP)

C'est une forme qui touche 10 à 15% des patients au moment du diagnostic de la maladie (**Depaz et al., 2013**). Elle est d'emblée progressive avec des poussées ou rémissions rares ou quasi-inexistantes. Pour cette forme de la maladie, les progressions du handicap et des signes neurologiques sont régulières et inéluctables. Cette forme apparaît plus tardivement vers 40 ans avec une même incidence entre hommes et femmes. C'est une forme non inflammatoire ou si l'inflammation est présente, elle l'est à moindre bruit. L'aggravation se produit à un

niveau comparable aux formes de SEP-SP, mais souvent sur une durée plus rapide, et probablement pour des raisons similaires et notamment l'accumulation des processus neurodégénératifs. Dans cette forme de SEP, il peut y avoir également chez de rares patients quelques poussées ; ils sont alors diagnostiqués pour une forme progressive rémittente (SEP-PR) observée chez moins de 5% des patients.



**Figure 18 : Représentation schématique des différentes formes de sclérose en plaques**

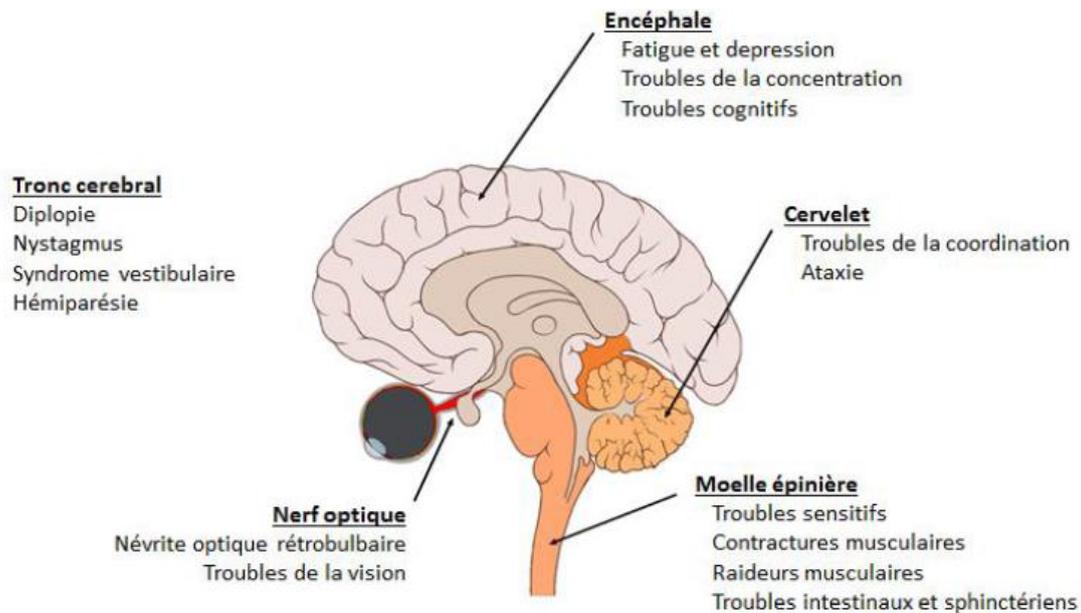
La SEP peut être découverte de façon accidentelle à l'imagerie par résonance magnétique (IRM) sous la forme d'un syndrome radiologiquement isolé (RIS) ou se manifester sous la forme d'un syndrome cliniquement isolé (CIS) suivi par une phase de symptômes récurrents-rémittents, caractérisée par des épisodes discrets de dysfonctionnement neurologique et de rémission. S'ensuit une aggravation progressive des symptômes sans récupération marquant l'entrée des patients dans la phase progressive secondaire. Certains patients peuvent présenter directement des symptômes progressifs dès le début de la maladie, c'est la forme progressive primaire (PP). Les corrélats IRM de la maladie incluent une augmentation des lésions positives au gadolinium, qui représentent la rupture de la barrière hémato-encéphalique et l'influx des cellules immunes dans le système nerveux central, l'accumulation des anomalies observables en T2 et une diminution du volume cérébral par mesure de l'atrophie.

Extrait de Baecher-Allen *et al.*, 2018

## 6.2. Symptômes

*Pour revue : Ouallet and Brochet, 2004 ; Papeix, 2011*

Les symptômes de la SEP dépendent de la localisation des lésions au sein du SNC, ainsi que de leur accumulation au cours de l'évolution. Ces symptômes peuvent être isolés ou bien coexister. Lors de la première poussée de la maladie, les premiers signes constatés sont les signes inauguraux qui peuvent par la suite être complétés par d'autres symptômes (**Figure 19**).



**Figure 19 : Représentation des symptômes de la sclérose en plaques en fonction du site de lésion observé**

### 6.2.1. Phase initiale

Parmi les symptômes inauguraux les plus fréquents, on retrouve :

- La névrite optique rétrobulbaire (NORB) qui résulte de la formation d'une plaque de démyélinisation au sein du nerf optique. Cette NORB, souvent révélatrice de la maladie (retrouvée dans 20% des cas), est presque constante dans la SEP et se manifeste au début de la maladie ou au cours de son évolution. Elle se traduit par une baisse rapide, en quelques heures ou quelques jours, de l'acuité visuelle d'un œil et une douleur oculaire ou orbitaire. Elle peut également se manifester par l'apparition dans le champ visuel de taches noires et d'une altération de la couleur. Le fond d'œil est normal au début mais un scotome central et un œdème papillaire peuvent parfois être observés. La névrite optique évolue favorablement en quelques mois. La récupération est complète dans 80% des cas (**Scherer *et al.*, 2009 ; Cambier *et al.*, 2012**).

Les troubles oculomoteurs font aussi partie des troubles inauguraux de la SEP mais peuvent également se développer au cours de la maladie. Ils résultent de lésions inflammatoires au niveau du tronc cérébral et se manifestent généralement par une diplopie (vision double) ou un nystagmus (mouvement d'oscillation involontaire et saccadé du globe oculaire) mais dans certains cas un syndrome vestibulo-oculaire peut être observé.

- La myélite aiguë est un des symptômes initiaux de la SEP et résulte d'une inflammation de la ME. Elle se manifeste par l'apparition d'une paraparésie aiguë en quelques heures (une paralysie légère des membres postérieurs) pouvant durer quelques jours.

D'autres symptômes moins fréquents à l'initiation de la maladie peuvent également être retrouvés. Peuvent être cités différents troubles moteurs tels que des tremblements, des troubles de l'équilibre, de la coordination des mouvements et de la motricité fine ou des déficits de la force musculaire. Ces troubles résultent de la présence des lésions dans le cervelet (**Cambier et al., 2012**). L'atteinte vestibulaire chez les patients peut provoquer des vertiges, des nausées lors des changements de position ou de rotation de la tête et peut même également entraîner une perte de l'équilibre.

### **6.2.2. Phase d'état**

Au bout de quelques années d'évolution, les atteintes motrices, sensibles, cérébelleuses et des nerfs crâniens aboutissent à des handicaps dans la vie quotidienne. Des troubles de la déglutition ou de la phonation peuvent être observés (**Pérennes et al., 2008**).

Les troubles cognitifs sont les plus fréquents chez 40 à 70% des patients atteints de SEP, au cours de l'évolution de la maladie, et dans certains cas, ils peuvent apparaître dès la phase précoce de la maladie. Parmi ceux-ci, figurent les troubles de l'attention, de la concentration, de la fluidité de la pensée, de la vitesse de traitement de l'information, de la mémoire et des fonctions visuospatiales (**Schulzet al., 2006**). Une grande variabilité interindividuelle est observée concernant le type et la sévérité de ces troubles cognitifs. Ces symptômes sont souvent provoqués par des lésions corticales ou hippocampiques de très petite taille.

Parmi les troubles les plus fréquemment recensés, il y a également les troubles urinaires. En effet, plus de 90% des patients atteints de SEP souffrent de troubles urinaires, dont les incontinences urinaires, une dysurie (difficulté à l'évacuation de l'urine, sans tenir compte de la douleur qui peut être associée), l'interruption du débit urinaire et la miction incomplète. En plus de la gêne fonctionnelle, ces troubles favorisent la survenue d'infections urinaires répétées (**Scherer et al., 2009**). Ils résultent le plus souvent d'atteintes bulbaires ou médullaires.

La dépression se retrouve fréquemment chez 25 à 55% des patients. Elle peut être provoquée par une plaque dont la localisation interfère avec le circuit de l'humeur tout comme elle peut être la conséquence de la dégradation du bien-être personnel. Le taux de suicide est plus élevé chez les patients atteints de SEP de sept fois et demi comparé à la moyenne nationale et la dépression figure comme une cause majeure.

La fatigue, quasi constante et très invalidante, est l'un des symptômes le plus fréquent chez les patients atteints de la SEP retrouvé chez 75 à 95% des patients. Elle peut survenir dès le début de la maladie et n'est pas nécessairement corrélée au degré de handicap physique. Deux

types de fatigue se distinguent, la fatigue aiguë qui dure moins de 6 semaines et la fatigue chronique présente plus de 50% du temps et depuis plus de 6 semaines. La fatigue a un important retentissement sur la qualité de vie des patients. Elle peut entraîner une modification de la qualité du sommeil, une diminution de la résistance à l'effort, une réduction des performances physiques et intellectuelles pouvant aboutir à un arrêt prématuré de l'activité professionnelle. Les patients sont également moins aptes à participer aux activités familiales, ce qui peut parfois entraîner une dépression et une désocialisation (**Ouallet and Brochet, 2004**).

Les troubles sexuels sont également très fréquents, touchant jusqu'à 82% des hommes et 52% des femmes. Ils se manifestent chez l'homme par une instabilité érectile avec une durée d'érection insuffisante qui peut même évoluer vers une perte totale de l'érection pendant les rapports. Ces troubles de l'érection résultent d'une atteinte spinale. Chez la femme, une dysorgasmie qui se définit comme un orgasme douloureux, mais sans douleur préalable lors des rapports sexuels, avec une abolition partielle ou totale de la sensation orgasmique est le principal trouble sexuel observé. D'autres troubles ont également été constatés comme une réduction de la libido ou une diminution plus ou moins importante de la lubrification vaginale causant des douleurs pendant les rapports. Les troubles sexuels peuvent être rendus plus complexes par la présence d'autres symptômes. En effet, la fatigue peut s'associer à une diminution du désir sexuel tandis que les troubles sensitifs au niveau des organes génitaux pourraient être associés à la diminution de la sensibilité.

L'évolution des symptômes chez les patients est évaluée par les neurologues en ayant recours à une échelle de cotation du handicap l'EDSS (Expanded Disability Status Scale en anglais, Echelle de statut d'invalidité étendue). Cette échelle prend en compte 8 paramètres fonctionnels dont quatre paramètres qualifiés de majeurs qui concernent les fonctions pyramidale, cérébelleuse, sensitive et du tronc cérébral et quatre paramètres mineurs concernant les fonctions des sphincters, de la vision, mentale et autres. Cette échelle correspond à un score de sévérité croissante, donné pour chaque paramètre fonctionnel allant de 0 à 6 ou 7. Par la suite, un score global de 0 à 10 (avec une évaluation par demi-point) est déterminé en fonction du score obtenu pour chaque paramètre fonctionnel et en fonction du nombre de paramètre fonctionnel atteint. Ce score global prend également en compte les scores supérieurs à 4 pour l'incapacité à la marche (**Figure 20**)(**Kurtzke, 1983**).

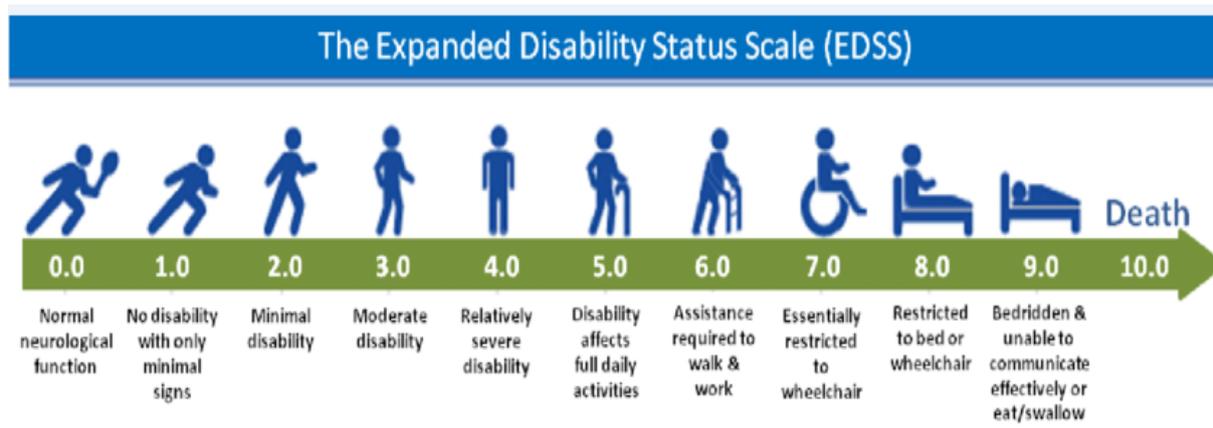


Figure 20 : Echelle de cotation du handicap chez les patients atteints de sclérose en plaques

### 6.2.3. Les troubles sensitifs et le cas particulier de la douleur

*Pour revue : Truini et al., 2013 ; Yilmazer et al., 2020 ; Mirabeli and Elkabes, 2021*

Parmi les troubles sensitifs retrouvés chez les patients atteints de SEP, certains entraînent des douleurs, alors que d'autres sont non douloureux. Parmi ces derniers, peuvent être cités l'hypoesthésie thermique ou tactile qui correspond à une sensation réduite à des *stimuli* non douloureux, l'hypoalgésie qui correspond à une sensation réduite à des *stimuli* douloureux, la perte de sensation ou encore la paresthésie qui correspond à des sensations anormales telles que des fourmillements ou des picotements (Tian et al., 2013 ; Österberg and Boivie, 2010).

Définie par l'Association Internationale pour l'Etude de la Douleur (IASP), la douleur est « une expérience sensorielle et émotionnelle désagréable liée à des lésions tissulaires réelles ou potentielles ou décrites en des termes évoquant de telles lésions ». Elle possède trois composantes principales : une composante sensorielle qui correspond à des mécanismes neurophysiologiques de la sensibilité profonde du corps, une composante émotionnelle ou affective qui donne à la douleur sa sensation désagréable et enfin une composante cognitive influant sur les deux autres composantes. Elle est divisée en deux catégories en fonction de sa durée en douleur aiguë et douleur chronique. La douleur aiguë correspond à un signal d'alarme, qui est une douleur intense et de courte durée déclenchée par le SN afin de protéger l'organisme alors que la douleur est dite chronique lorsque sa durée est supérieure à trois mois et qu'elle persiste même si la cause de déclenchement a disparu.

Chez les patients atteints de SEP, il existe différents types de douleur. Selon les études, la douleur chronique constitue un symptôme très invalidant et très fréquent avec une prévalence estimée de 29 à 86% (Solaro and Uccelli, 2011 ; Moisset et al., 2013). Il y a une

grandedifférence dans les paramètres utilisés pour évaluer et définir la douleur dans le cas de la SEP.

Plusieurs classifications des types de douleurs associées à la SEP ont été proposées, se basant sur : l'origine primaire (qui est directement associée à la maladie) ou secondaire des symptômes et les mécanismes physiopathologiques de ces douleurs (**O'Connor et al., 2008 ; Truini et al., 2013**). Cette classification regroupe les douleurs en trois grandes catégories : i) les douleurs par excès de nociception, ii) les douleurs neuropathiques et iii) les douleurs mixtes.

### **A. Les douleurs par excès de nociception**

Chez les patients atteints de SEP-RR, les douleurs par excès de nociception sont les plus fréquentes (**Moisset et al., 2013**). Parmi ces douleurs, il y a la migraine retrouvée dans 50% des cas, les douleurs musculaires associées à des anomalies posturales, notamment les douleurs dans le bas du dos dans 10 à 16% des cas, et les douleurs associées à la névrite optique retrouvées dans 8% des cas (**Moisset et al., 2013**).

### **B. Les douleurs neuropathiques**

*Pour revue : Brola et al., 2014 ; Mirabeli and Elkabes, 2021*

Les douleurs neuropathiques sont le résultat direct ou indirect de la démyélinisation du SNC. Ces symptômes déclarent un fort impact négatif sur leur qualité de vie (**O'connor et al., 2008 ; Thompson et al., 2010**). Elles se caractérisent par des sensations anormales et elles peuvent être indépendantes de toute stimulation comme le cas des douleurs paroxystiques ou être évoquées. Les douleurs évoquées se répartissent en deux catégories, l'hyperalgésie qui correspond à une réponse exagérée en réponse à un stimulus nociceptif et l'allodynie qui correspond à une réponse douloureuse en réponse à un stimulus non douloureux. Ces douleurs peuvent être évoquées par des *stimuli* thermiques (chaud ou froid) ou mécanique. Ainsi, des troubles de la sensibilité mécanique sont observés avec une forte prévalence d'hypoesthésie ou d'hyperesthésie retrouvée chez respectivement 61% et 34% des patients atteints de SEP (**Österberg and Boivie, 2010**).

En fonction de la localisation des lésions au sein du SNC, ces douleurs sont de localisation variable. Au niveau des membres inférieurs comme la jambe et le pied, les dysesthésies caractérisées par des sensations de fourmillements, de brûlure ou de douleur sont observées chez 12 à 28% des patients (**Truini et al., 2013**) de façon bilatérale (**Osterberg et al., 2005**). Elles sembleraient plus fréquentes chez les patients atteints de SEP-PP. Parmi les causes de ces douleurs, est retrouvée la désafférentation du thalamus ou du cortex due à des lésions

multiples le long des voies spinothalamiques (**Osterberg et al., 2005**). Le signe de Lhermitte qui se caractérise par une impression de décharge électrique lors de la flexion de la nuque qui se prolonge tout le long du dos ou des membres supérieurs est un type de douleur neuropathique présent chez environ 15% des patients. Il s'observe en général de manière transitoire au cours d'une poussée et ces décharges électriques sont causées par la démyélinisation des afférences de la ME cervicale et semblent provenir de leurs étirements lors du mouvement de flexion de la nuque (**Truini et al., 2013**). La névralgie du trijumeau est également retrouvée chez 2 à 5% des patients et se caractérise par des crises paroxystiques de sensations de chocs électriques spontanés ou évoqués par des *stimuli* inoffensifs au niveau oro-facial. Dans ce cas, les décharges ectopiques sont causées par la démyélinisation des afférences trigéminales et par la présence de lésions au niveau du pont et du tronc cérébral (**Truini et al., 2013**).

### C. Les douleurs mixtes

Ces douleurs sont provoquées principalement par des contractions involontaires des muscles provoquant des dommages tissulaires et l'activation des nocicepteurs. Elles peuvent être uni- ou bilatérales et regroupent :

- les spasmes toniques retrouvés chez 6 à 11% des patients notamment avec des formes de SEP progressives et résultant de lésions situées dans les ganglions de la base, la capsule interne, la médulla et la ME ;
- les douleurs liées à la spasticité (contraction continue des muscles) qui sont retrouvées chez environ 50% des patients (**Mirabeli and Elkabes, 2021**).

### 6.3. Le diagnostic

*Pour revue : Thompson et al., 2018a*

Les critères de diagnostic sont ceux de McDonald et *al.*, révisés en 2017, déterminés par consensus sur une initiative conjointe du Comité Européen pour le Traitement et la Recherche sur la Sclérose en Plaques (*European Committee for Treatment and Research in Multiple Sclerosis,ECTRIMS*) et la Société Nationale sur la SEP aux Etats-Unis (*US National MS Society*). Le diagnostic repose sur la mise en évidence des manifestations cliniques, neuroradiologiques et parfois biologiques.

Depuis leur introduction en 1965, les critères de diagnostic pour la SEP ont reposé sur deux critères principaux : la détection de la dissémination spatiale et temporelle des déficits neurologiques focaux et l'exclusion de diagnostics différentiels importants.

Ces disséminations doivent être confirmées par :

- deux poussées de symptômes séparées dans le temps, associées à deux lésions visibles en IRM qui sont corrélées aux symptômes observés ;
- deux poussées de symptômes séparées dans le temps, associées à une seule lésion visible en IRM, les symptômes cliniques des poussées doivent alors être différents et suggérer des atteintes du SNC sur des sites différents.

L'inconvénient d'attendre deux poussées avant de poser le diagnostic de SEP est le retard à l'initiation du traitement, ce qui a justifié la modification des critères de McDonald en 2017. Ces révisions suivent également ces principes, mais prennent en compte de nouvelles données IRM et renforcent le rôle des diagnostics du LCR dans la forme récurrente-rémittente de la SEP (SEP-RR). Les innovations spécifiques incluent les lésions corticales de l'IRM en tant que preuves de la dissémination (équivalent aux lésions juxta-corticales), la suppression de la nécessité d'une différenciation entre les lésions asymptomatiques et symptomatiques de l'IRM et la prise en compte des résultats caractéristiques du LCR pouvant remplacer les critères IRM pour la dissémination temporelle (Fox, 2019)(Tableau 1).

**Tableau 1 : Critères diagnostiques de la sclérose en plaques selon la version révisée en 2017 des critères de McDonald (Extrait de Thompson *et al.*, 2018a)**

	Number of lesions with objective clinical evidence	Additional data needed for a diagnosis of multiple sclerosis
≥2 clinical attacks	≥2	None*
≥2 clinical attacks	1 (as well as clear-cut historical evidence of a previous attack involving a lesion in a distinct anatomical location†)	None*
≥2 clinical attacks	1	Dissemination in space demonstrated by an additional clinical attack implicating a different CNS site or by MRI
1 clinical attack	≥2	Dissemination in time demonstrated by an additional clinical attack or by MRI OR demonstration of CSF-specific oligoclonal bands‡
1 clinical attack	1	Dissemination in space demonstrated by an additional clinical attack implicating a different CNS site or by MRI AND Dissemination in time demonstrated by an additional clinical attack or by MRI OR demonstration of CSF-specific oligoclonal bands‡

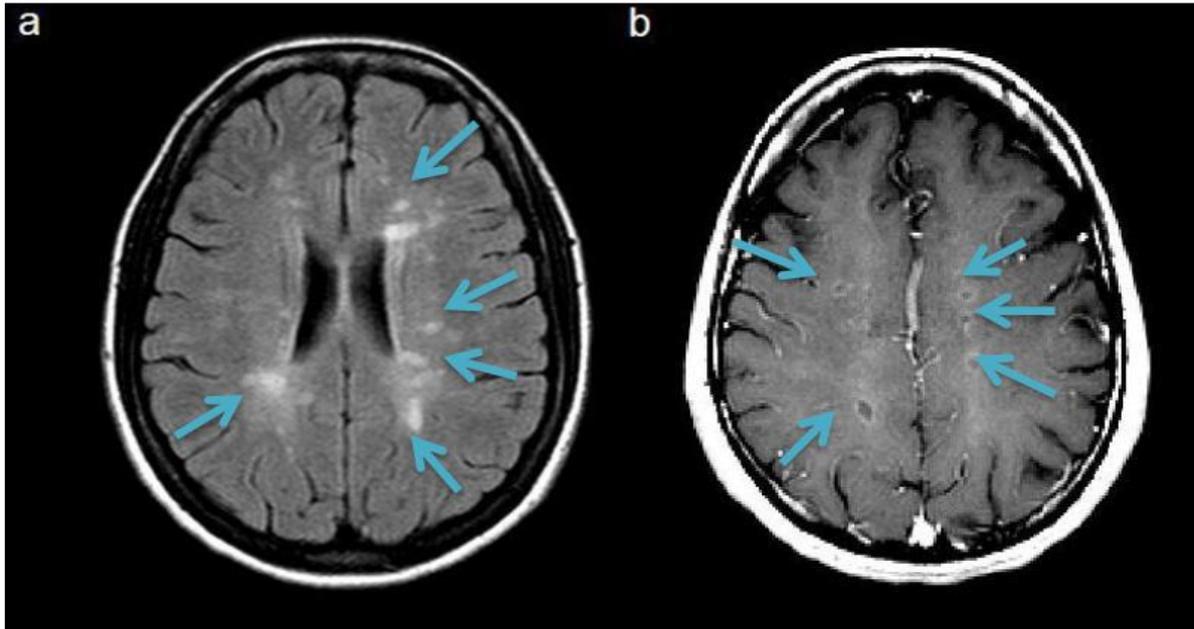
L'IRM est un examen de choix dans le diagnostic de la SEP et est actuellement l'examen paraclinique le plus utile pour le diagnostic précoce de la maladie car il permet l'observation des lésions dans le SNC.

Il existe plusieurs types de séquences utilisées en IRM (Figure 21) :

Les séquences pondérées en T1 qui sont des séquences anatomiques à faible contraste pour lesquelles les lésions apparaissent un peu plus foncées que la substance blanche, appelées lésions hypointenses ou « trous noirs ». Elles peuvent être utilisées pour mettre en évidence

une fixation anormale de gadolinium qui est un produit de contraste traversant la BHE endommagée par l'inflammation. L'injection de gadolinium permet donc de rehausser les signaux et distinguer les plaques actives dans lesquelles l'inflammation provoque une rupture de la BHE, des plaques chroniques et donc de suivre l'évolution de la maladie (Thompson *et al.*, 2018a).

- Les séquences pondérées en T2/ FLAIR (*Fluid Attenuated Inversion Recovery*) dans lesquelles les plaques apparaissent plus claires que la substance blanche.



**Figure 21 : Imagerie par résonance magnétique axiale (a) des lésions hyperintenses pondérées en T2 (b) des lésions en anneau en T1 prenant le gadolinium**

Les flèches bleues représentent les différents types des lésions.

**Extrait de Buzzard *et al.*, 2012**

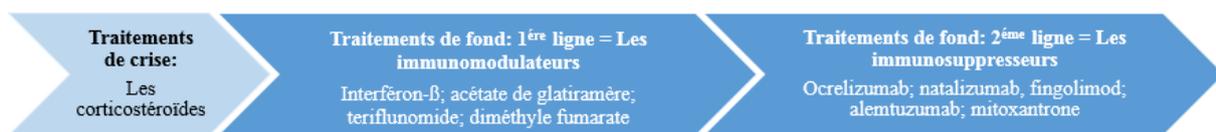
Ces séquences sont le plus souvent appliquées pour de l'imagerie cérébrale mais l'IRM médullaire peut aussi être réalisée, notamment si le nombre et la localisation des hypersignaux ne semblent pas suffisants pour poser le diagnostic.

L'analyse du LCR est actuellement la seule analyse biologique avec une sensibilité supérieure à 90% pour le diagnostic de la SEP (Lalive, 2011). L'exploration biochimique repose sur une analyse quantitative des immunoglobulines et de l'albumine présentes dans le LCR comparativement au sérum afin d'évaluer l'état de perméabilité de la BHE (Delaroche *et al.*, 2003) ainsi que sur une analyse qualitative à la recherche de bandes oligoclonales d'immunoglobulines IgG par la technique de focalisation isoélectrique. L'étude du LCR permet de confirmer l'existence d'une réaction inflammatoire et d'éliminer d'autres causes étiologiques, notamment un processus infectieux ou malin (Ouallet and Brochet, 2004).

## 7. Prise en charge thérapeutique de la sclérose en plaques : progrès et limites

### 7.1. Traitements actuels

Actuellement, il n'y a pas de traitement permettant de guérir la SEP, mais il existe une combinaison de plusieurs stratégies permettant d'améliorer les conditions de vie des patients. L'objectif principal est de stopper l'apparition et l'accumulation des déficits neurologiques en ralentissant l'activité de la maladie. Dans ce contexte, la stratégie thérapeutique actuelle repose sur des traitements de la crise pour réduire la sévérité et la durée de celle-ci et sur des traitements de fond ayant pour objectif de réduire la réponse immune afin de diminuer la survenue de nouvelles poussées (**Figure 22**). S'associe à cette stratégie une prise en charge des symptômes qui s'installent au cours du temps et qui ne sont pas complètement corrigés par les traitements de crise ou de fond. Depuis environ une vingtaine d'années, des progrès considérables ont permis la mise sur le marché de nouvelles molécules permettant une meilleure prise en charge des patients.



**Figure 22 : Représentation schématique des stratégies thérapeutiques actuelles dans la sclérose en plaques**

#### 7.1.1. Traitements de la crise

*Pour revue : Sloka and stefanelli, 2005; Tischner and Reichard, 2007; Loma and Heyman, 2011 ; Tintore et al., 2019 ; McGinley et al., 2021 ; Goldschmidt and McGinley, 2021*

Ce sont les traitements employés lors des épisodes aigus afin de réduire la durée et l'intensité des symptômes. Néanmoins, ces traitements n'apportent aucune amélioration à moyen et à long terme et ne permettent pas de prévenir la réapparition d'une poussée (**Pérennes et al., 2008 ; Morrow et al., 2009**). Les traitements communément employés sont les corticoïdes de synthèse avec principalement la méthylprednisolone mais aussi la bétaméthasone, la dexaméthasone, la prednisone et la prednisolone qui peuvent être utilisés comme traitement de substitution.

La méthylprednisolone (Solumédrol<sup>®</sup>, AMM le 23/09/1991) est un corticoïde de synthèse avec une forte biodisponibilité absolue orale, qui se distribue facilement dans l'organisme mais aussi au sein du SNC car il est capable de traverser la BHE (**Chen et al., 1996**). Son administration à forte dose induit une réduction de l'EDSS accélère la récupération des

poussées et provoque une réduction de l'activité inflammatoire et du volume des lésions observées en IRM (Miller *et al.*, 2000). Ces effets peuvent être observés sur une longue période en induisant une réduction de nouvelles lésions (Oliveri *et al.*, 1998).

En effet, au niveau du système immunitaire la méthylprednisolone inhibe l'activation des LT naïfs (LTn) (Vanderheyde *et al.*, 1999), réduit la maturation des cellules dendritiques, la production des cytokines pro-inflammatoires IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-6 et IL-12 (Leussink *et al.*, 2001) et augmente la production de cytokines anti-inflammatoires IL-10 (Hodge *et al.*, 1999). Elle induit également une fragmentation de l'ADN des LT circulants CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> (Yoshida *et al.*, 1997) en facilitant ainsi l'apoptose des cellules immunes activées (Leussink *et al.*, 2001). Au niveau de la BHE, elle permet également de réduire le flux d'eau à travers la BHE ce qui permet de réduire les œdèmes cérébraux (Olson *et al.*, 1988 ; Barkhof *et al.*, 1991).

### 7.1.2. Traitements de fond

*Pour revue : Muresanu et al., 2016 ; Tintore et al., 2019 ; Thompson et al., 2018b ; Hart et al., 2021*

Pendant de nombreuses années, aucun traitement n'était disponible pour ralentir l'évolution de la maladie et allonger la durée entre les rechutes et il a été considéré comme un défi avec des options de traitement se limitant principalement aux corticostéroïdes, au cyclophosphamide et au méthotrexate. C'est au milieu des années 90 que la prise en charge de la SEP a été révolutionnée avec le développement d'immunomodulateurs spécifiques. Depuis cette date, de très nombreuses molécules ont été commercialisées (Diebold and Derfuss, 2016). Le traitement de fond repose sur deux principaux mécanismes d'action : l'immunomodulation et l'immunosuppression.

#### A. Traitements de première ligne : les immunomodulateurs

Les traitements immunomodulateurs agissent en régulant l'activité du système immunitaire et en diminuant l'inflammation et les lésions provoquées par son activité contre la gaine de la myéline (Thompson *et al.*, 2018b). Ils sont utilisés en première intention dans le traitement de fond de la SEP car ils entraînent moins d'effets indésirables, notamment concernant le risque infectieux.

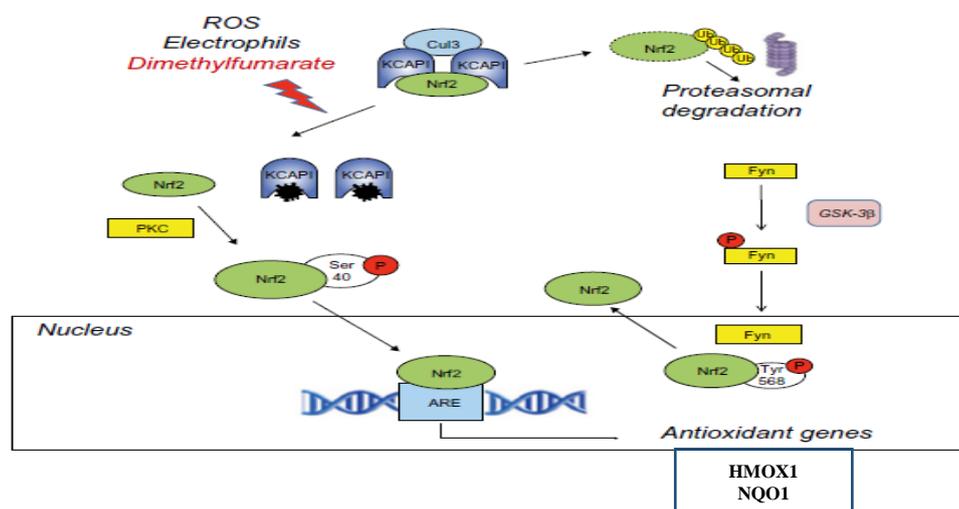
Il existe plusieurs molécules pouvant être utilisées comme immunomodulateur dans la prise en charge de la SEP dont les principales sont représentées dans le tableau ci-dessous (Tableau 2).

Tableau 2 : Liste des traitements immunomodulateurs

<i>Molécule</i>	<i>Médicaments utilisés en clinique</i>	<i>Forme de SEP</i>	<i>Cible/mécanisme d'action</i>	<i>Références bibliographiques</i>
Interféron-β 1a	Avonex®, AMM le 13/03/1997 Rebif®, AMM le 04/05/1998 Plegridy®, AMM le 18/07/2014	SEP-RR	* Inhibition de la production des cytokines Th1 pro-inflammatoires. * Stimulation de la sécrétion des cytokines Th2 anti-inflammatoires. * Augmentation de l'effet cytotoxique des LT natural killer (NK) et stimulation des LT suppressives.	Calabresi <i>et al.</i> , 2014 Mitsdoerffer <i>et al.</i> , 2009 Kay <i>et al.</i> , 2013
Interféron-β 1b	Betaféron®, AMM le 30/11/1995 Extavia®, AMM le 20/05/2008		* Inhibition du passage des lymphocytes auto-réactifs à travers la barrière hémato-encéphalique en augmentant le taux de molécules d'adhésion cellulaire dans le sérum et en réduisant la production d'intégrines et de métalloprotéinase (MMP) par les lymphocytes.	
Acétate de glatiramère	Copaxone®, AMM le 25/01/2002	SEP-RR	* Favorise la différenciation de LT selon la voie Th2 anti-inflammatoires et activation des LTreg en périphérie. * Effet immunomodulateur sur les LB, les LT NK en favorisant la sécrétion de cytokines anti- inflammatoires et en inhibant la sécrétion de cytokine pro-inflammatoires (IL-6, IL-12, TNF). * Effet neuroprotecteur par augmentation de la production du facteur neurotrophique dérivé du cerveau (BDNF).	Haas <i>et al.</i> , 2009 Kala <i>et al.</i> , 2011 Chen <i>et al.</i> , 2009
Térfunomide	Aubagio®, AMM le 26/08/2013	SEP-RR	* Effet cytostatique sur la prolifération des LB en inhibant la synthèse de la pyrimidine. * Inhibition de la prolifération des lymphocytes activés et diminution de la production d'IFN- γ par les LT activés.	Hauser <i>et al.</i> , 2020 Di Nuzzo <i>et al.</i> , 2014 Claussen <i>et al.</i> , 2012 Warnke <i>et al.</i> , 2010

En plus des traitements immunomodulateurs décrits ci-dessus, il existe le diméthyle fumarate ; son mécanisme d'action sera détaillé ci-dessous car il exerce son action en partie par un effet antioxydant, thématique directement en lien avec mon travail de thèse.

Le diméthyle fumarate (Tecfidera<sup>®</sup>, AMM le 30/01/2014), administré par voie orale, est un ester de l'acide fumarique. Il est indiqué pour le traitement des patients atteints de SEP-RR. Il possède des effets immunomodulateurs, anti-inflammatoires et antioxydants mais le mécanisme d'action précis reste encore mal connu (Lin *et al.*, 2011 ; Scannevin *et al.*, 2012 ; Huang *et al.*, 2015). En effet, il active la voie Nrf2 (Nuclear factor erythroid-derived 2) qui contrôle l'expression d'un grand nombre de protéines antioxydantes et d'enzymes inhibitrices du stress oxydant. Dans les conditions physiologiques, le Nrf2 est séquestré dans le cytoplasme par une interaction avec la protéine Keap1 (Kelch-like ECH-associated protein 1). Le traitement par le diméthyle fumarate entraîne des modifications conformationnelles des résidus de cystéine sur Keap1 (Linker *et al.*, 2011), ce qui permet l'activation par phosphorylation et la translocation nucléaire de Nrf2 par le proto-oncogène et protéine tyrosine kinase, Fyn. Ceci provoque l'expression de certains gènes protecteurs tel que l'hème-oxydase-1 (Lin *et al.*, 2011) et la NADPH-quinone oxydoréductase 1 (Linker *et al.*, 2011). L'activation de ces enzymes est associée à des réponses anti-oxydantes (Figure 23) (Matusheski *et al.*, 2004).



**Figure 23 : Activation de la voie Nrf2 par le diméthyle fumarate**

ARE : Élément de réponse aux antioxydants ; Cul3 : Culline 3 ; GSK3 $\beta$  : Glycogène synthase kinase-3 $\beta$  ; KEAP : Kelch-like ECH-associated protein (représenté ici par le nom du gène la codant KCAP1) ; ROS : Espèces oxygénées réactives ; Nrf2 : Nuclear factor (erythroid-derived 2)-related factor 2 ; HO1 : Hème-oxydase 1 ; NQO 1 : NADPH-quinone déshydrogénase

Adapté de Di Nuzzo *et al.*, 2014

De plus, il peut être associé à des réponses anti-inflammatoires. En effet, il intervient dans l'activation des récepteurs de l'acide hydroxycarboxylique de type 2 (HCA2), ce qui entraîne entre autres une activation de l'axe AMPK, SIRT1, provoquant *in fine* une inhibition du facteur de transcription NF-κB (Nuclear Factor-kappa B). Cela conduit à une diminution de la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires et de l'expression des molécules d'adhésion du système immunitaire et à une modulation des lymphocytes T et B (**Figure 23**)(Gillard *et al.*, 2015 ; Parodi *et al.*, 2015).

### **B. Traitements de seconde ligne : les immunosuppresseurs**

Ces médicaments agissent directement sur les cellules du système immunitaire impliquées dans la physiopathologie de la SEP, notamment les lymphocytes T et B. L'objectif est de « supprimer » leurs actions. Certains médicaments de cette classe agissent en empêchant la sortie des lymphocytes du thymus et/ou des ganglions lymphatiques, d'autres en empêchant le passage des lymphocytes du sang vers le tissu nerveux à travers la BHE, d'autres enfin en détruisant les cellules immunitaires. Le tableau suivant (**Tableau 3**) résume les traitements immunosuppresseurs les plus importants.

Tableau 3 : Liste des traitements immunosuppresseurs

<i>Molécule</i>	<i>Médicaments utilisés en clinique</i>	<i>Forme de SEP</i>	<i>Cible/mécanisme d'action</i>	<i>Références bibliographiques</i>
Natalizumab (Anticorps anti-intégrine alpha 4)	Tysabri®, AMM en 2007	SEP-RR	*Blocage du passage des leucocytes exprimant les intégrines $\alpha 4\beta 1$ à travers la barrière hémato-encéphalique.	Ramos-Cejudo et <i>al.</i> , 2011
Alemtuzumab (Anticorps anti-CD20)	Lemtrada®, AMM le 12/09/2013	SEP-RR	*Immunosuppresseur par lymphodéplétion, induit une cytotoxicité des LB exprimant le CD20 à médiation cellulaire Ac-dépendant entraînant ainsi une déplétion lymphocytaire périphérique sévère et prolongée.	Menge et <i>al.</i> , 2014
Fingolimod	Gilenya®, AMM le 17/03/2011	SEP-RR	*Antagoniste fonctionnel des récepteurs de la sphingosine-1-phosphate. *Action par rétention des lymphocytes au niveau du thymus et des ganglions lymphatiques.	Brinkman et <i>al.</i> , 2010 di Nuzzo et <i>al.</i> , 2014
Mitoxantrone	Esep®, AMM le 05/06/2017	SEP-RR SEP-SP	*Inhibition de l'activation et de la prolifération des LT, des LB et des macrophages, ainsi que de la production d'anticorps. *Effets immunosuppresseurs et anti-inflammatoires médiés par l'apoptose des cellules dendritiques et microgliales et capacité à réduire la production de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- $\alpha$ et IL-2.	Vollmer et <i>al.</i> , 2010 Li et <i>al.</i> , 2012
Ocrelizumab (Anticorps anti-CD20)	Ocrevus®, AMM le 08/01/2018	SEP-RR SEP-PP	*Immunomodulateur par lymphodéplétion en induisant une déplétion sélective des LB exprimant le CD20 par phagocytose cellulaire dépendante des anticorps (antibody-dependent cellular phagocytosis, ADCP), cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (antibody-dependent cellular cytotoxicity, ADCC), cytotoxicité dépendante du complément (complement-dependent cytotoxicity, CDC) et par apoptose.	Syed, 2018

### 7.1.3. Les traitements symptomatiques

*Pour revue : Ouallet and Brochet, 2004 ; Thompson et al., 2010 ; Chang et al., 2013 ; Meador et al., 2016 ; McGinley et al., 2021*

Les traitements symptomatiques ciblent différents symptômes présents chez les patients atteints de la SEP sans modifier le développement de la maladie.

\*La spasticité correspond à une exagération du tonus musculaire qui se manifeste chez les patients par des contractions, des spasmes ou une sensation de raideur globale des membres inférieurs et elle est retrouvée chez près de 90% des personnes atteintes (**Lebrun, 2001**).

La toxine botulinique est utilisée pour le traitement des spasticités localisées à impact fonctionnel. Elle est administrée par voie intramusculaire et son mécanisme d'action repose sur l'inhibition de la sécrétion pré-synaptique d'acétylcholine dans la jonction neuromusculaire.

Le baclofène (Liorésal<sup>®</sup>) et le dantrolène (Dantrium<sup>®</sup>) sont les médicaments les plus utilisés dans le cas des spasticités diffuses.

\*Les troubles anormaux incluent les tremblements, les troubles de la coordination et de l'équilibre peuvent être traités par le clonazépam (Rivotril<sup>®</sup>), l'isoniazide (Rimifon<sup>®</sup>) et la primidone (Mysoline<sup>®</sup>).

\* Les troubles de la marche sont pris en charge par de la rééducation, en particulier la kinésithérapie individuelle. Dans certains cas, il est possible que des antispastiques administrés par voie orale puissent être prescrits comme la fampridine (Fampyra<sup>®</sup>) qui est un inhibiteur des canaux potassiques. Cette molécule induit l'amélioration de la conduction nerveuse et donc l'amélioration de la capacité de marche (**Valet et al., 2019**).

\* La fatigue peut revêtir un caractère aigu ou chronique. Aucun traitement n'a réellement fait preuve de son efficacité pour ce symptôme, même s'il peut être conseillé de faire de la rééducation et d'avoir une hygiène de vie adéquate (**Ouallet and Brochet, 2004**). Par ailleurs, une prise en charge efficace des facteurs associés peut diminuer ce symptôme. Parmi ces facteurs il y a les troubles du sommeil, la dépression et la douleur. Les benzodiazépines peuvent être utilisées pour minimiser les troubles du sommeil, les inhibiteurs de recapture de la sérotonine sont souvent utilisés en cas de troubles dépressifs associés (**Ouallet and Brochet, 2004**).

\* Les troubles urinaires sont pris en charge en fonction de la présence ou de l'absence de résidus post-mictionnels. Les anticholinergiques oraux à propriétés myorelaxantes dont le chlorure de trospium (Ceris<sup>®</sup>) ou l'oxybutinyne (Ditropan<sup>®</sup>) et des molécules non anticholinergiques dont le flavoxate (Urispas<sup>®</sup>) sont prescrits en absence de résidus. En

présence de résidus, les dysnergies vésico-sphinctériennes sont traitées à l'aide de la toxine botulinique ou à l'aide d'alpha-bloquants (Alfuzosine, Xatral<sup>®</sup> ou tamsulosine, Josir<sup>®</sup>, Mecir<sup>®</sup>, Omix<sup>®</sup>) (Lebrun, 2001).

\*Les troubles sexuels : Chez l'homme le sildénafil (Viagra<sup>®</sup>), le tadalafil (Cialis<sup>®</sup>), le vardénafil (Levitra<sup>®</sup>) et l'avanafil (Spedra<sup>®</sup>) sont les traitements de première intention pour les troubles de l'érection. Chez la femme, la prise en charge de la sécheresse vaginale se fait par recours à des gels lubrifiants comme Sensilube<sup>®</sup>, Monasens<sup>®</sup>, etc. (Lebrun, 2001).

\* **La prise en charge de la douleur fait appel à des** traitements proposés en fonction du type et de la cause de la douleur observée.

*Pour revue : Dworkin et al., 2010; Khan et al., 2014a ; Colloca et al., 2017*

Pour les douleurs liées à la spasticité, le traitement repose sur la prescription des antispastiques. Pour les douleurs liées aux spasmes toniques, la prise en charge repose sur la prescription des antiépileptiques. Parmi ces traitements, il y a les inhibiteurs de la sous-unité  $\alpha 2$ - $\delta$  des canaux calciques voltages dépendants (la gabapentine, Neurontin<sup>®</sup> ou la prégabaline, Lyrica<sup>®</sup>) et des canaux sodiques (la lamotrigine, Lamictal<sup>®</sup>). Pour la névralgie du trijumeau, la carbamazépine (Tégretol<sup>®</sup>) peut être prescrite (Kremer et al., 2016). Pour les douleurs neuropathiques induites par la SEP, peu d'essais cliniques ont été réalisés pour évaluer l'efficacité et le bénéfice des traitements et dans ce cas les patients sont traités selon des recommandations de l'Association Internationale pour l'Etude de la Douleur. Le traitement repose sur les antidépresseurs tricycliques (amitriptyline, Laroxyl<sup>®</sup> et imipramine, Tofranil<sup>®</sup>), les inhibiteurs de la recapture de la noradrénaline et de la sérotonine (duloxetine, Cymbalta<sup>®</sup> et venlafaxine, Effexor<sup>®</sup>) (Coluzzi and Mattia, 2005), ainsi que les inhibiteurs de la sous-unité  $\alpha 2$ - $\delta$  des canaux calciques voltages dépendants (gabapentine, Neurontin<sup>®</sup> et prégabaline, Lyrica<sup>®</sup>) qui exercent une action antalgique centrale et périphérique par réduction de l'hyperexcitabilité neuronale (Kremer et al., 2016).

## 7.2. Pistes thérapeutiques actuellement explorées

Actuellement, de nouvelles pistes thérapeutiques sont explorées afin d'améliorer l'efficacité sur l'évolution de la maladie et notamment le passage vers une forme progressive. Pour cela, deux stratégies sont couramment évaluées : favoriser la remyélinisation ou empêcher la neurodégénérescence. Dans ce travail, nous intéresserons qu'aux molécules développées pour empêcher la neurodégénérescence.

Lorsque la myéline ne peut pas être régénérée, les axones ne sont plus protégés et vont se détériorer. La protection des neurones ou neuroprotection est par conséquent cruciale car elle pourrait éviter que des formes rémittentes évoluent vers des formes progressives.

### 7.2.1. Essais thérapeutiques en cours

*Pour revue : Shirani et al., 2016 ; Goldschmidt and McGinley, 2021*

Différents médicaments sont actuellement à l'essai pour tenter d'aboutir à cette neuroprotection, avec des résultats prometteurs mais encore très préliminaires. Les principaux médicaments seront décrits ci-dessous :

#### A. La simvastatine

La simvastatine est utilisée en première intention dans le traitement de l'hypercholestérolémie ainsi que dans la prévention des maladies cardiovasculaires. Elle a été proposée comme agent neuroprotecteur potentiel en raison de preuves obtenues sur des modèles animaux démontrant ses effets neuroprotecteurs. Une étude de phase II MS-STAT a permis de suivre les effets de l'administration de la simvastatine à une forte dose chez des personnes atteintes de SEP-SP durant deux ans. Cette étude a montré une bonne tolérance de la simvastatine en induisant une réduction de l'atrophie cérébrale et de l'incapacité chez les personnes présentant une forme progressive secondaire de SEP. Ces résultats sont encourageants et justifient la mise en place d'études de phase III appelée MS-STAT2 sur l'innocuité, l'efficacité et les effets à long terme de cette molécule (Chataway *et al.*, 2014).

#### B. L'ibudilast

Une étude récente de phase II a été réalisée évaluant l'effet de l'ibudilast, un inhibiteur de la phosphodiesterase, inhibant le sous-type 4 dans la plus grande mesure, mais montrant également une inhibition significative d'autres sous-types, ainsi que d'autres molécules notamment pour leurs capacités à ralentir le processus d'atrophie cérébrale chez les personnes atteintes de SEP-SP. Les résultats obtenus ont mis en évidence une réduction de 48% de l'atrophie cérébrale (Fox *et al.*, 2018). Ces résultats nécessitent une validation par une étude de phase III.

#### C. La phénytoïne

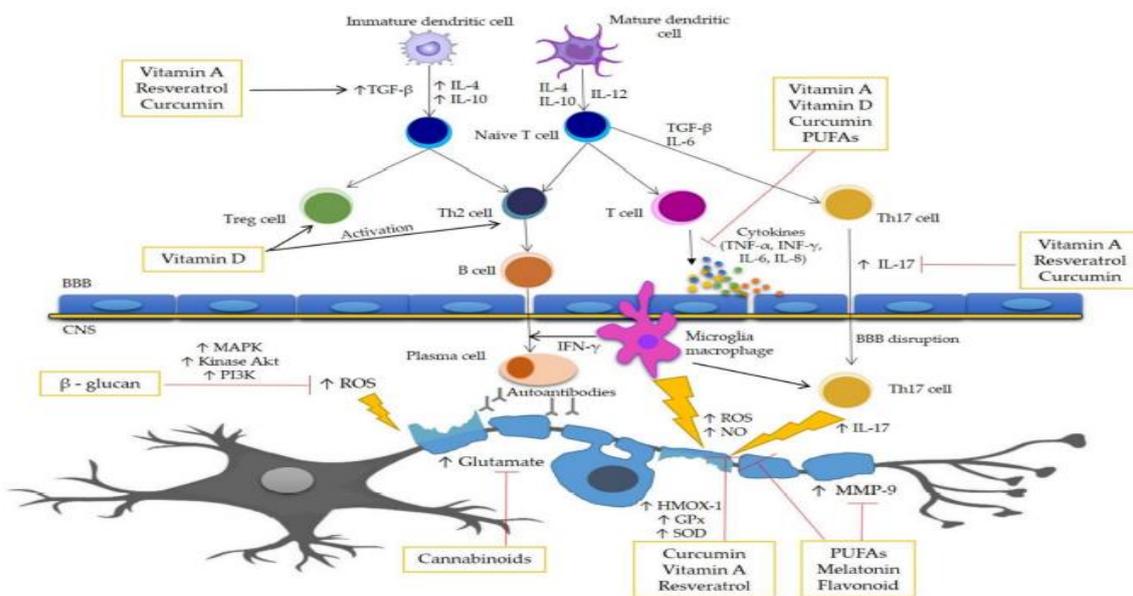
La phénytoïne est un inhibiteur des canaux sodiques voltage-dépendants, dont les propriétés neuroprotectrices ont été démontrées suite à un essai de phase II randomisé et contrôlé par

placebo qui a montré que des patients atteints de névrite optique aiguë recevant de la phénytoïne dans les 2 semaines après l'apparition des symptômes avait 30% d'amincissement de la couche de fibres nerveuses rétiniennes en moins par rapport au groupe placebo (**Raftopoulos et al., 2016**). La pertinence clinique de cela n'est pas entièrement confirmée, et il existe des événements indésirables graves potentiels avec l'administration de phénytoïne tels que des éruptions cutanées et des interactions avec d'autres médicaments limitant ainsi son utilisation.

### 7.2.2. Le stress oxydant et les polyphénols

*Pour revue : Mirshafiey and Mohsenzadegan, 2008 ; Zuliani and Baroni, 2015 ; Tandon et al., 2018 ; Miller et al., 2019 ; Yan et al., 2022*

Comme mentionné précédemment, au cours de la SEP, les conditions inflammatoires et le manque de mécanismes de défense antioxydants conduisent à une augmentation de l'expression des ROS, qui peuvent endommager les lipides, les protéines et les acides nucléiques. Ces dommages entraînent des dysfonctionnements mitochondriaux et induisent la mort cellulaire notamment axonale. Ainsi, une supplémentation en antioxydants pourrait être utile dans le traitement de la SEP et en particulier par les antioxydants d'origine végétale (**Van Meeteren et al., 2005**). Plusieurs études ont montré que la thérapie antioxydante est bénéfique *in vitro* et *in vivo* dans des modèles animaux de SEP (**Schreibelt et al., 2007**). Ces antioxydants exercent leurs effets sur différents sites d'action en ciblant différentes voies de signalisation (**Figure 24**).



**Figure 24 : Sites d'action potentiels des composés bioactifs antioxydants**

Extrait de Miller et al., 2019

Le tableau **Tableau 4** représente la majorité des molécules antioxydantes ayant été évaluées dans la SEP ou les modèles animaux de SEP.

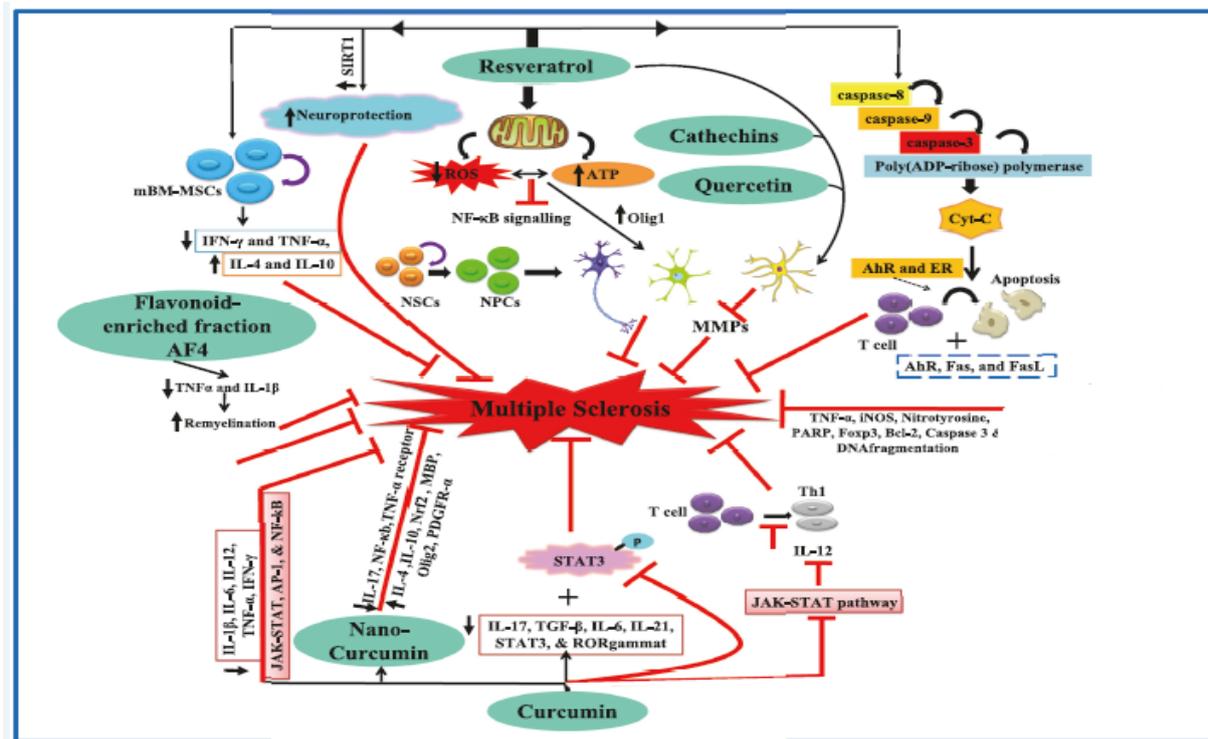
Tableau 4 : Tableau récapitulatif des études cliniques et précliniques ayant évaluées l'effet des antioxydants non polyphénoliques

<i>Composé/ molécule antioxydante</i>	<i>Références bibliographiques</i>	<i>Etude/Modèle</i>	<i>Effets</i>
Les acides gras polyinsaturés (AGPI): Oméga-3: Acide éicosapentanoïque (EPA) Acide docosahexanoïque (DHA)	Galai <i>et al.</i> , 1995 Mélange EPA et DHA	Essai clinique, 20 patients 6 g /jour; 6 mois.	Suppression de la capacité des monocytes à synthétiser IL-1 et TNF- $\alpha$ . Diminution de la sécrétion des cytokines inflammatoires : IL-1, IL-2, TNF- $\alpha$ , et IFN- $\gamma$ .
Acide oléique	Martin <i>et al.</i> , 2010	EAE-souris; 50 mg/kg/jour; 24 jours.	Amélioration des symptômes et des déficits neurologiques. Diminution de la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique. Réduction de l'infiltration des cellules inflammatoires dans le SNC . Jouer un rôle moléculaire dans la polarisation Th1/Th2. Inhibition des cytokines anti-inflammatoires: Un effet anti-inflammatoire.
Mélatonine	Miller <i>et al.</i> , 2013	Rats-Fœtus; 10 mg/kg/jour; 20 jours.	Augmentation de l'expression des gènes codant des enzymes anti-oxydantes : SOD et GPx au niveau du cerveau.
	Rathnasamy <i>et al.</i> , 2014	Essai clinique, 22 patients avec forme SEP-SP; 10 mg/jour; 30 jours.	Augmentation de la concentration de SOD et de GPx dans les érythrocytes. Diminution de la concentration de MDA dans les érythrocytes.
Vitamine A	Saboor <i>et al.</i> , 2015	Essai clinique, 39 patients avec la forme SEP-RR, 400IU/jour; 6 mois.	Augmentation de l'expression des TGF- $\beta$ et l'expression de Foxp3 dans les cellules mononuclées du sang périphérique (PBMCs).
	Raverdeau <i>et al.</i> , 2016	EAE-souris; 250 mg/kg; 18 heures	Induction de Foxp3- Tregs Inhibition de la différenciation des LT CD4 <sup>+</sup> en Th1 et Th17
Vitamine D	Oliveira <i>et al.</i> , 2017	Essai clinique en double aveugle vs contrôle placebo; 137 patients avec forme SEP-RR active vs 218 non malades; 50 nmoles/L.	Amélioration de la progression de la maladie évaluée par le MSSS et l'EDSS. Diminution du niveau de NOx dans le sérum.
Acide alpha-lipoïque (AAL)	Spain <i>et al.</i> , 2017	Essai clinique en double aveugle vs contrôle placebo; 27 patients avec SEP-PS vs 24 non malade; 2 ans; 1,2mg/jour.	Réduction du taux d'atrophie cérébrale avec une tendance à l'amélioration de la marche.

Parmi les antioxydants majeurs dans le traitement de la SEP, figurent les polyphénols, et particulièrement ceux issus des plantes.

*Pour revue : Adamczyk and Adamczyk-Sowa, 2016 ; Mojaverrostami et al., 2018 ; Rabiei, 2019*

Plusieurs voies sont ciblées par ces polyphénols et celles pertinentes dans la prise en charge thérapeutique de la SEP sont résumées dans la **Figure 25**.



**Figure 25 : Les voies physiopathologiques de la sclérose en plaques pouvant être améliorées par les polyphénols**

Les polyphénols tels que le resvératrol, la curcumine, la fraction AF4 enrichie en flavonoïdes, les catéchines, la quercétine ont montré un potentiel neuroprotecteur dans la SEP en ciblant la prolifération et la différenciation des cellules souches neurales (NSC) et en réduisant les niveaux élevés de cytokines pro-inflammatoires et de stress oxydant. Le resvératrol potentialise son action protectrice par les récepteurs AhR (*Aryl Hydrocarbon Receptor*) et ER (*Estrogen Receptor*) qui activent les lymphocytes T provoquant leur apoptose. De plus, le resvératrol exerce son rôle neuroprotecteur en réduisant le stress oxydant et en améliorant les fonctions mitochondriales par l'inhibition de la signalisation NF-κB. Enfin, le resvératrol a montré un effet bénéfique sur la remyélinisation. La quercétine et les catéchines ainsi que le resvératrol montrent un effet inhibiteur sur les métalloprotéases (MMP) qui inhibe la migration cellulaire et l'activité kinase du récepteur au facteur de croissance épidermique (EGFR).

Extrait de Tandon *et al.*, 2018

Les paragraphes suivants détaillent les composés phénoliques issus des plantes les plus utilisés dans les études précliniques et cliniques concernant la SEP.

### A. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des polyphénols colorés aux propriétés antioxydantes présentes dans les plantes, et sont classés en flavonols, flavones, flavanones, isoflavones, catéchines, anthocyanidines et chalcones en fonction de leur structure chimique. Les flavonoïdes purifiés tels que la quercétine, la lutéine, la génistéine et l'hespérétine, ou leurs extraits enrichis, peuvent réduire l'expression des cytokines pro-inflammatoires, dont l'IL-1, l'IL-6, et TNF- $\alpha$  (Miller *et al.*, 2019). L'épigallocatechine-3-gallate (EGCG) est l'un des flavonoïdes les mieux étudiés dans la SEP et l'EAE. En 2004, Aktas *et al.*, ont rapporté que l'EGCG administré par voie orale supprimait l'inflammation *in vivo* en inhibant la synthèse du TNF- $\alpha$  dans les cellules T chez des souris EAE. L'EGCG a réduit les dommages axonaux et la mort des cellules neuronales en ciblant directement la formation des ROS. Ainsi, la diminution de la prolifération des LT CD4<sup>+</sup> incubés avec l'EGCG pourrait être liée à son interférence avec le cycle cellulaire, l'activation de la voie NF- $\kappa$ B et de la voie de dégradation des protéines (protéasome) (Aktas *et al.*, 2004).

Une étude menée sur des souris femelles C57BL/6 a montré que l'EGCG améliorait de manière dose-dépendante les symptômes cliniques et retardait l'apparition de la maladie chez les souris atteintes d'EAE. Cet effet sur les symptômes est associé à une réduction de l'infiltration des cellules immunitaires et de la démyélinisation dans le SNC. Un des mécanismes mis en jeu serait la correction de la dérégulation des sous-ensembles de cellules CD4<sup>+</sup>T (Th1/Th17 régulé à la baisse et Treg régulé à la hausse). Il a également été montré dans cette étude que l'EGCG réduisait la production d'IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-17, IFN- $\beta$  et TNF- $\alpha$  (Wang *et al.*, 2012). Cette étude préclinique a été suivie d'une étude clinique. Un essai croisé randomisé, en double aveugle et contrôlé vs placebo a été réalisé sur des patients atteints de SEP-RR (n = 18) recevant de l'acétate de glatiramère comme traitement de fond et a montré que l'apport d'EGCG (600 mg par jour) par rapport à l'apport du placebo améliore le métabolisme énergétique musculaire pendant l'exercice modéré avec un effet prédominant chez les hommes comparé aux femmes (Mähler *et al.*, 2015). Une étude clinique randomisée en double aveugle et contrôlée vs placebo a été faite en utilisant l'EGCG (800 mg/jour) durant 18 mois dans le cas de SEP-RR (n=122) montrant des résultats moins encourageants puisque l'EGCG n'a pas d'effet chez les patients sur l'ensemble des paramètres et critères étudiés (Bellmann *et al.*, 2021).

## B. Le resvératrol

Le resvératrol (trans-3, 5,4'-trihydroxystilbène) est un composé polyphénolique naturel qui est retrouvé dans plus de 70 espèces de plantes telles que le raisin rouge, la canneberge et les arachides. Il a été rapporté que le resvératrol montre un ensemble d'activités biologiques de type neuroprotectrice, anti-inflammatoire, antioxydante et anti-vieillesse (Miller *et al.*, 2019). Chez les souris induites par l'EAE, il a été démontré que le resvératrol induisait une diminution significative de l'expression de certaines cytokines et chimiokines, telles que le TNF- $\alpha$ , l'IFN- $\beta$ , les IL-2, IL-9, IL-12, IL-17, et la chimiokine (motif C-C) ligand 5 (CCL5). Les propriétés anti-inflammatoires du resvératrol semblent médier par un certain nombre de mécanismes tels que l'inhibition de la synthèse et la libération des médiateurs pro-inflammatoires, la modification de la synthèse des eicosanoïdes ou le blocage des voies iNOS et COX-2 en inhibant NF- $\kappa$ B (de la Lastra and Villegas, 2005). De plus, une formulation pharmaceutique de resvératrol (SRT501) a empêché la perte neuronale au cours de la névrite optique, qui est une lésion inflammatoire du nerf optique. Le SRT501 a supprimé le dysfonctionnement neurologique pendant la rémission de l'EAE et son effet neuroprotecteur serait provoqué par son impact significatif sur les activateurs de SIRT1 chez les souris EAE. Fait intéressant, ni SRT501 ni d'autres composés activateurs de SIRT1 ne modulent l'inflammation dans l'EAE, suggérant que le resvératrol a le potentiel de compléter les thérapies immunomodulatrices actuelles contre la SEP qui ne parviennent pas à prévenir la neurodégénérescence (Shindler *et al.*, 2010).

L'importance des polyphénols et notamment ceux issus des plantes dans le traitement de la SEP est illustré par le fait que la phytothérapie fait partie des médecines complémentaires dans la prise en charge des patients et représente l'une des méthodes thérapeutiques les plus anciennes. Ainsi, lorsqu'ils ne sont pas utilisés sous des formes purifiées, les polyphénols cités précédemment peuvent être administrés sous forme de préparation à base de plantes qui peuvent à leur tour réduire l'intensité de certains symptômes.

Le **Tableau 5** représente les principaux extraits de plantes testés dans le cas de la SEP. Afin de mieux comprendre les effets de ces extraits de plante sur les symptômes de la pathologie, des études ont été menées chez l'animal afin de déterminer les mécanismes d'action de ces traitements en s'intéressant en particulier aux voies de l'inflammation et au stress oxydant (**Tableau 6**).



Tableau 5 : Tableau récapitulatif des études cliniques ayant évaluées les effets des plantes sur les symptômes de la sclérose en plaques

<i>Symptôme</i>	<i>Plante</i>	<i>Références</i>	<i>Etude / modèle</i>	<i>Effets</i>
Dépression	<i>Crocus sativus</i>	Akhondzadeh <i>et al.</i> , 2004	Essai clinique, randomisé en double aveugle; 30 patients; gélule (30 mg)/J; 6 semaines.	Effet antidépresseur chez les patients traités.
Troubles cognitives et mémoire	<i>Ginkgo biloba</i>	Lovera <i>et al.</i> , 2007	Essai clinique, en double aveugle contrôlé vs placebo; 38 patients; 240mg/J; 12 semaines.	Amélioration des performances cognitives chez les groupes traités.
	<i>Boswellia papyrifera</i>	Sedighi <i>et al.</i> , 2014	Essai clinique, randomisé en double aveugle; 80 patients; 2 gélules (300 g)/J; 2 mois.	Amélioration de la mémoire spatiale. Pas d'effet sur la mémoire verbale et la vitesse de traitement de l'information.
Dysfonctionnement du système urinaire	<i>Cannabis sativa</i>	Brady <i>et al.</i> , 2004	Etude pilote en ouvert 10 patients; 2,5 mg de THC et 2,5 mg CBD par pulvérisation; 8 semaines.	Diminution de l'urgence urinaire, du nombre et du volume des épisodes d'incontinence et de la nycturie.
Fatigue	<i>Ginkgo biloba</i>	Johnson <i>et al.</i> , 2006	Essai clinique, en double aveugle contrôlé vs placebo; 22 patients; 240mg/J; 4 semaines.	Soulagement de la fatigue.
	<i>Panax ginseng</i>	Etamadifar <i>et al.</i> , 2013	Essai clinique, randomisé en double aveugle; 52 patients; comprimé 250 mg/J, 12 semaines.	Réduction de la fatigue et un effet positif sur la qualité de vie des patients traités.
Spasticité	<i>Cannabis sativa</i>	Zajicek <i>et al.</i> , 2009	Essai randomisé, contrôlé vs placebo; 630 patients; gélule (2.5 mg THC et 1.25 mg cannabidiol); 15 semaines.	Amélioration de la mobilité et de la spasticité des patients.
		Wade <i>et al.</i> , 2004	Essai clinique, en double aveugle; contrôlé vs placebo; 160 patients; 120 mg cannabidiol et 120 mg THC; 10 semaines.	Amélioration de la spasticité.
		Corey-Bloom <i>et al.</i> , 2012	Essai randomisé croisé contrôlé vs placebo; 196 patients; 11 jours.	Amélioration de la spasticité.
		Markova <i>et al.</i> , 2018	Essai clinique, randomisé en double aveugle, contrôlé vs placebo; 191 patients résistant au traitement; Sativex utilisé comme inhalé; 7 sprays/jour; 3 mois.	Amélioration de la spasticité et de la douleur.
Douleur dont douleur neuropathique	<i>Cannabis sativa</i>	Vaney <i>et al.</i> , 2004	Essai clinique, randomisé en double aveugle contrôlé vs placebo; 57 patients, gélule (2.5 mg THC and 0.9 mg CBD); 14 jours.	Amélioration du mouvement et diminution de la fréquence des spasmes.
		Wade <i>et al.</i> , 2004	Essai clinique, en double aveugle contrôlé vs placebo; 160 patients, Sativex contenant 2,7 mg de THC et 2,5 mg CBD/spray; 4 semaines.	Diminution des spasmes musculaires.
		Zajicek <i>et al.</i> , 2012	Essai clinique, en double aveugle contrôlé vs placebo; 5-25mg/jour extrait; Voie orale; 10 semaines.	Diminution des spasmes musculaires.

**Tableau 6 : Tableau récapitulatif des études précliniques et cliniques évaluant les effets neuroprotecteurs, anti-inflammatoires et anti-oxydants des plantes et extraits de plantes dans le cas de la sclérose en plaques**

<i>Plant/composé</i>	<i>Références</i>	<i>Etude/Modèle</i>	<i>Effets</i>
<i>Curcuma longa</i>	Natarajan and Bright, 2002	EAE-souris; 50 et 100 mg/kg/J extrait de curcumine; 4 semaines.	Diminution de l'inflammation et de la démyélinisation du SNC. Diminution de la sévérité du score clinique.
	Xie <i>et al.</i> , 2009	EAE-rats; 100 et 200 mg/kg/J de curcumine; 2 semaines.	Diminution de l'inflammation et de la sévérité de l'EAE.
	Mohajeri <i>et al.</i> , 2015	EAE-rats; 12,5 mg/kg/ J de curcumine; 17 jours.	Diminution de la sévérité de l'EAE. Augmentation de la remyélinisation.
<i>Nigella sativa</i>	Fahmy <i>et al.</i> , 2014	EAE-rats; 2,8g/kg extrait de Nigella Sativa; 4 semaines.	Amélioration des signes cliniques de l'EAE, suppression de l'inflammation et amélioration de la remyélinisation dans le SNC.
	Noor <i>et al.</i> , 2015	EAE-rats; 2,8g/kg extrait de Nigella Sativa; 4 semaines.	Suppression de l'inflammation chez les rats EAE. Amélioration de la remyélinisation dans le cervelet et réduction de l'expression du TGF-β1.
<i>Crocus sativus</i>	Ghazavi <i>et al.</i> , 2009	EAE-souris; 100 µl extrait de Safran/souris; 3 semaines.	Diminution de la sévérité des signes cliniques de l'EAE. Diminution de l'inflammation dans la moelle épinière.
	Ghaffari <i>et al.</i> , 2015	EAE-rats; 5 et 10 µl/ rat extrait de Safran/souris; 3 jours.	Modulation des marqueurs du stress oxydatif (diminution de l'activité des enzymes GPx et SOD), par piégeage des ROS.
<i>Panax ginseng</i>	Hwang <i>et al.</i> , 2011	EAE-souris; 200 µg d'acide polysaccharide de Panax ginseng.	Diminution de l'infiltration des cellules inflammatoires dans le SNC. Suppression du score EAE en inhibant la prolifération des cellules T et la production de cytokines pro-inflammatoires.
<i>Cannabis sativa</i>	Buccellato <i>et al.</i> , 2011	EAE-souris, phase aiguë et chronique; Extrait éthanolique ΔTHC9 à 50 mg/kg PC et CBD à 50 mg/kg; IP; 4 semaines.	Réduction des déficits neurologiques.
<i>Lipia citriadora</i>	Mauriz <i>et al.</i> , 2015	Essai clinique, en double aveugle contrôlé par placebo; 30 patients; 1 gélule (600 mg/J); 28 jours.	Diminution de la protéine C-réactive, des niveaux d'IFN-γ, des niveaux d'IL-12, Niveaux IL-4 et IL-10.
<i>Pterodon emarginatus</i>	Alberti <i>et al.</i> , 2014	EAE-souris; huile essentielle; 50 et 100 mg/J; 21 jours	Diminution des déficits neurologiques. Inhibition de la réponse immunitaire par les cellules Th1, de la démyélinisation axonale et de la mort neuronale. Régulation de la réponse Treg <i>in vitro</i> . Activation de la microglie et expression d'iNOS.

Au cours de ces dernières années, de nombreuses preuves suggèrent que les molécules actives des plantes, et en particulier les polyphénols végétaux, pourraient avoir des avantages thérapeutiques dans la régulation du stress oxydant et la neuroprotection notamment dans la SEP (Mojaverrostami *et al.*, 2018 ; Miller *et al.*, 2019). Ceci a été démontré à travers les nombreuses plantes citées précédemment. Dans le chapitre suivant, nous nous intéresserons à un extrait préparé à partir de pépins de raisin qui a été largement décrit pour ces effets thérapeutiques et biologiques et qui pourrait avoir un effet potentiel dans le cas de la SEP.

## II. L'extrait de pépins de raisin ou « Grape Seed Extract » (GSE)

### 1. Situation socio-économique du raisin et du vignoble

*Pour revue : Ma and Zhang, 2017*

Le raisin est l'un des fruits les plus cultivés au monde avec une production de 77,8 millions de tonnes en 2018 dont 41% sont cultivés en Europe (13% en Espagne, 11% en France et 9% en Italie), 29% en Asie et 21% aux Etats-Unis. La majeure partie du raisin (environ 57%) est utilisée pour la production du vin, 36% est consommée comme du raisin de table et le reste est raffiné pour produire des aliments. *Vitis Vinifera. L* est la principale espèce de raisin cultivée au monde avec une production de plus de 68 millions de tonnes en 2018 (OIV, 2018).

En Tunisie, la production globale de raisin s'établit autour de 140 000 tonnes/an. La production de vin moyenne est d'environ 284 000 hectolitres, avec 32 millions de bouteilles de vin produites en 2015 (OIV, 2016). La superficie du vignoble Tunisien est de 18000 ha dont les deux tiers se situent dans le gouvernorat de Nabeul. Les variétés cultivées en Tunisie destinées à la production du vin sont en pleine évolution. En effet, les vins sont produits en Tunisie à partir des cépages dits nobles (Cabernet Sauvignon, Syrah et Chardonnay, ...). La plupart des bouteilles sont consommées localement. Cependant, l'exportation permet d'avoir des bénéfices assez importants pour l'état, aux alentours de 25 millions d'euros en 2015 (OIV, 2016).

Les résidus de pressurage du raisin appelés marc de raisin se composent d'une manière générale de rafles, de pellicules et de résidus de pulpes et de pépins. Les pépins représentent environ 5% du poids du raisin entier et environ 40 à 50% des déchets solides générés par les industries vinicoles lors de processus de vinification. Le marc a longtemps été considéré comme un déchet de l'industrie viticole, mais depuis un certain temps, il est considéré comme un coproduit intéressant. Depuis la mise en évidence de sa richesse en composés biologiquement actifs, en particulier des composés phénoliques contenus dans le marc,

un nombre croissant d'études a porté sur l'extraction, la purification et le pouvoir nutritionnel de ces composés.

## 2. Historique

### *Pour revue : Unusan, 2020*

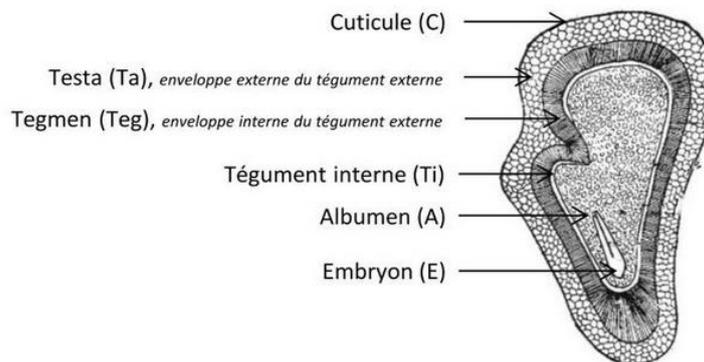
Le raisin est considéré comme originaire d'une région proche de la mer Caspienne en Asie du Sud-Ouest. Les cultivars de vin ont été apportés à Rome, dans le sud de la France et en Grèce par les Phéniciens. Les Romains à leur tour ont répandu le raisin dans toute l'Europe. Dans les années 1700, les espagnols ont amené les raisins *Vinifera* en Californie. Les raisins étaient consommés par les Égyptiens il y a environ 6000 ans, et certains philosophes grecs anciens ont documenté leurs pouvoirs de guérison. Plus tard, les Européens utilisèrent une lotion à base de sève de vigne pour soigner les maladies des yeux et de la peau ; les raisins non mûrs étaient utilisés pour soigner les maux de gorge et les raisins secs étaient utilisés pour soigner la soif et la constipation (**Badet, 2011**). L'étude des composants bioactifs des extraits de pépins de raisin a été initiée pour la première fois au début du XX<sup>ème</sup> siècle. Albert Szent-Györgyi, lauréat du prix Nobel de 1937, a découvert les flavonoïdes en travaillant sur la ségrégation de la vitamine C (**Szent-Györgyi, 1936**), les qualifiant de « vitamine P ». Par la suite, le professeur Jacques Masquelier a postulé que puisque l'écorce de pin présentait des effets similaires à ceux de l'ascorbate, il devait contenir de la vitamine C ainsi que des flavonoïdes, qu'il a désignés sous le nom de « pycnogénols », un terme qui n'est plus utilisé par la communauté scientifique, sauf comme une marque déposée pour les proanthocyanidines extraites de l'écorce de pin maritime français. Masquelier a amélioré et breveté une technique d'extraction de proanthocyanidines oligomères de pépins de raisin en 1947 (**Fine, 2000 ; Murray, 1999**) et a observé que les flavonoïdes dérivés des pépins de raisin semblaient être supérieurs en concentration et en effet antioxydant à ceux de l'écorce de pin (**Masquelier, 1991**). En 1952, Geissmann et Hinreiner ont utilisé le terme « flavonoïdes » pour la première fois, Bate-Smith et Swain définissant les tanins dans la décennie suivante en 1962. Il a été suggéré que les proanthocyanidines du vin contribuent au phénomène appelé « French Paradox », selon lequel une consommation élevée de graisses alimentaires chez les Français ne conduit pas à des taux élevés des maladies coronariennes et d'athérosclérose (**Richard et al., 1981**). En 1989, Harborne a classé le principal groupe polyphénolique de plantes de raisin en 13 sous-catégories, dont l'une correspond aux proanthocyanidines (**Harborne, 2013**). La popularité de ces composés n'a cessé d'augmenter par la suite pour

expliquer le paradoxe français, accompagnée d'allégations d'effets bénéfiques supplémentaires sur la santé.

### 3. Composition biochimique des pépins de raisin

*Pour revue : Xia et al., 2010 ; Gupta et al., 2020*

Le raisin est une plante riche en molécules bioactives et ses composés sont distribués dans les différentes parties de la plante à savoir les pépins, la peau, la pulpe et les feuilles (Xia et al., 2010). Les pépins de raisin ont la concentration la plus élevée en molécules bioactives. Chaque pépin est composé d'un embryon entouré d'un albumen. L'albumen à son tour est entouré par une coque ligneuse, le tégument formé par trois parties (interne, intermédiaire et externe) et enfin une fine cuticule qui constitue la dernière assise cellulaire (Pacottet, 2012) (Figure 26). La couleur des pépins évolue du vert au marron au cours de leur développement suite à l'oxydation des composés phénoliques présents dans le tégument (Cadot et al., 2006).



**Figure 26 : Coupe longitudinale d'un pépin de raisin mûr**

Les pépins de raisin frais contiennent entre 25 et 45% d'eau, environ 36% de composés glucidiques, entre 8 et 13% de lipides, environ 6% de composés azotés et environ 3% de minéraux alors que les pépins de raisin séchés contiennent environ 35% de fibres et 29% de composants extractibles, notamment des composés phénoliques, des protéines (11%), des minéraux (3%) et de l'eau (7%) (Matthäus, 2008).

La répartition tissulaire des différents composés au niveau des pépins n'est pas uniforme. Seuls les polysaccharides se répartissent au niveau des différents tissus, alors que les autres composés se localisent de manière spécifique. En effet, les protéines se localisent exclusivement au niveau de l'albumen, tout comme les lipides. Les polyphénols constituent la classe la plus abondante des substances bioactives du raisin. Ce sont des métabolites secondaires qui ne sont pas nécessaires au fonctionnement cellulaire, leur quantité et leur répartition dans les pépins dépendent en grande partie du lieu, de l'année de récolte, du

cultivar ainsi que du degré de maturité des pépins (**Shi et al., 2003**). Parmi les polyphénols, les principaux sont les proanthocyanidines, les anthocyanines, les flavonols, les stilbènes dont le resvératrol et les acides phénoliques dont l'acide gallique et l'acide élagique (**Hernandez-Jiménez et al., 2009 ; Xia et al., 2010**).

La répartition de ces composés dans les différentes parties du raisin est représentée dans le tableau suivant (**Tableau 7**). Selon les équipes de recherche et afin de travailler avec des extraits enrichis en polyphénols, il est possible de travailler avec des extraits de feuille, de peau et pépin de raisin (GSSE) ou de pépins de raisin (GSE). Depuis de nombreuses années, l'équipe du Pr. AOUANI « Polyphénols bioactifs du raisin » du Laboratoire des Substances Bioactives (LSBA) réalise la plupart de ces expériences en utilisant le GSE.

**Tableau 7 : Composition phénolique selon les différentes parties du raisin**

<b>Organe</b>	<b>Composés phénoliques</b>	<b>Références Bibliographiques</b>
Raisin	Composés non-flavonoïdes : acide phénolique (Acide gallique et acide élagique) et stilbènes (resvératrol). Composés flavonoïdes : flavonols, flavanols (catéchine), isoflavones, anthocyanidines, proanthocyanidines.	Karadeniz <i>et al.</i> , 2000 Fouad and Rizk, 2019
Pépins	Acide gallique, catéchine, épicatechine, dimère de procyanidine, proanthocyanidines.	Pastrana-Bonilla <i>et al.</i> , 2003 Huang <i>et al.</i> , 2005 Hernandez-Jiménez <i>et al.</i> , 2009 Kadri <i>et al.</i> , 2019
Peau	Proanthocyanidines, acide ellagique, myricétine, quercétine, kaempférol, trans-resvératrol.	Pastrana-Bonilla <i>et al.</i> , 2003 Hernandez-Jiménez <i>et al.</i> , 2009
Feuille	Myricétine, acide ellagique, kaempférol, quercétine, acide gallique.	Pastrana-Bonilla <i>et al.</i> , 2003

#### **4. Effets biologiques de l'extrait de pépins de raisin : données précliniques**

*Pour revue Xia et al., 2010 ; Rodriguez-Pérez et al., 2019 ; Sochorova et al., 2020 ; Unusan, 2020*

Grâce à sa richesse en composés bioactifs qui sont principalement polyphénoliques, le GSE aurait plusieurs effets pharmacologiques et thérapeutiques. Le mécanisme d'action du GSE pourrait s'expliquer partiellement par ses effets antioxydants et anti-inflammatoires.

#### 4.1. Effet antioxydant

L'activité antioxydante du GSE est 15 fois plus importante que celle de la vitamine C et de la vitamine E (**Belviranli et al., 2012**). Cette propriété se manifeste par la capacité de ses composés polyphénoliques à piéger les ROS notamment les radicaux hydroxyles et peroxydes, à chélater les métaux et à limiter l'oxydation des macromolécules biologiques (**Xia et al., 2010**).

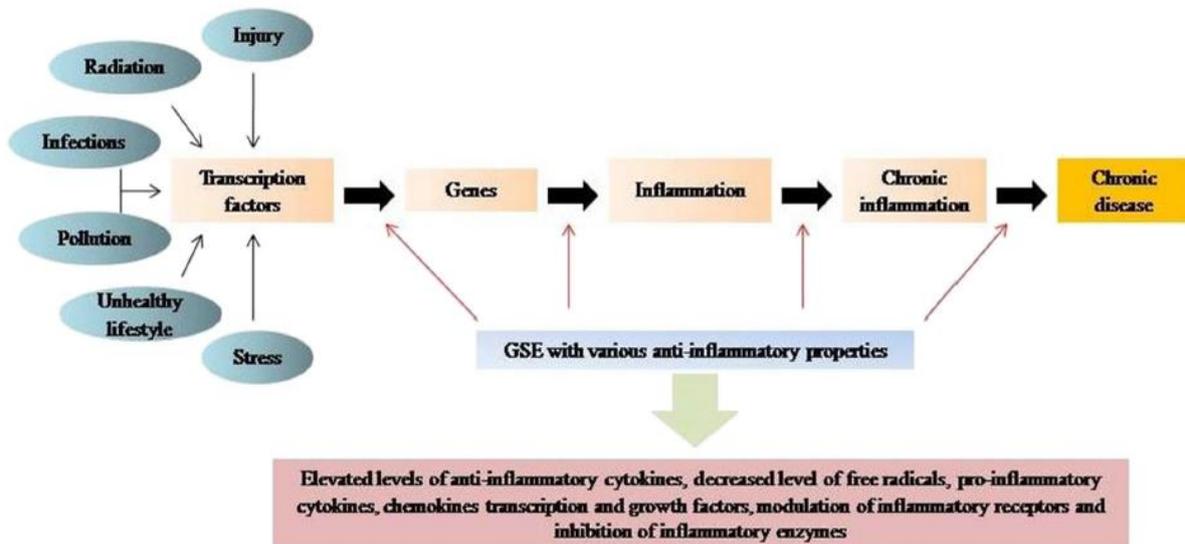
Les pépins de raisin présentent une capacité antioxydante importante pour réduire les radicaux peroxydes, démontrée par le dosage de la capacité d'absorption des radicaux oxygène (ORAC) (**Huang et al., 2005 ; Pinent et al., 2016**). Ils montrent également une forte capacité à piéger des électrons lors de la mesure de la capacité antioxydante équivalente au trolox (TEAC). **Arora et al., (1998)** a montré que les flavonoïdes des pépins de raisin possèdent une capacité antioxydante plus élevée contre la peroxydation induite par les ions métalliques que celle induite par le radical peroxyde (ROO<sup>-</sup>). Cette réaction génère des radicaux phénoxydes stables (**Yoshimura et al., 2003**). Ainsi, la propriété antioxydante des proanthocyanidines est due à la disponibilité des hydrogènes phénoliques en tant qu'extincteurs d'oxygène singulet et piègeurs de radicaux donneurs d'hydrogène.

Tout en contrôlant le stress oxydant, le GSE (et les molécules qu'il contient) peut également agir comme un régulateur de la réaction inflammatoire (**Gargari et al., 2011**).

#### 4.2. Effet anti- inflammatoire

Les composés phénoliques du raisin, notamment des pépins, ont montré des effets anti-inflammatoires chez les rats, les souris et même chez l'humain (**Chacón et al., 2009 ; Terra et al., 2009**). L'effet anti-inflammatoire du GSE se manifeste par l'inhibition ou la réduction de l'expression des gènes codant des cytokines pro-inflammatoires telles qu'IL-6 et l'augmentation de l'expression des gènes codant des protéines anti-inflammatoires telles que les adipokines et les adiponectines (**Chacón et al., 2009 ; Terra et al., 2009**) (**Figure 27**). De plus, les composés phénoliques des pépins de raisin aident également à inhiber les systèmes enzymatiques qui sont responsables de la production des RL et qui sont associés à des réactions inflammatoires. Parmi les composés existant dans les pépins de raisin, ce sont les procyanidines qui ont principalement montré un effet anti-inflammatoire en augmentant la synthèse et la libération de nombreuses substances qui modulent l'inflammation dont le

sérine-protéases, le NO et les leucotriènes (Shi *et al.*, 2003). Les procyanidines inhibent également l'activation de la hyaluronidase, une enzyme de dégradation des protéoglycanes qui attaque divers tissus pendant l'inflammation (Shi *et al.*, 2003).



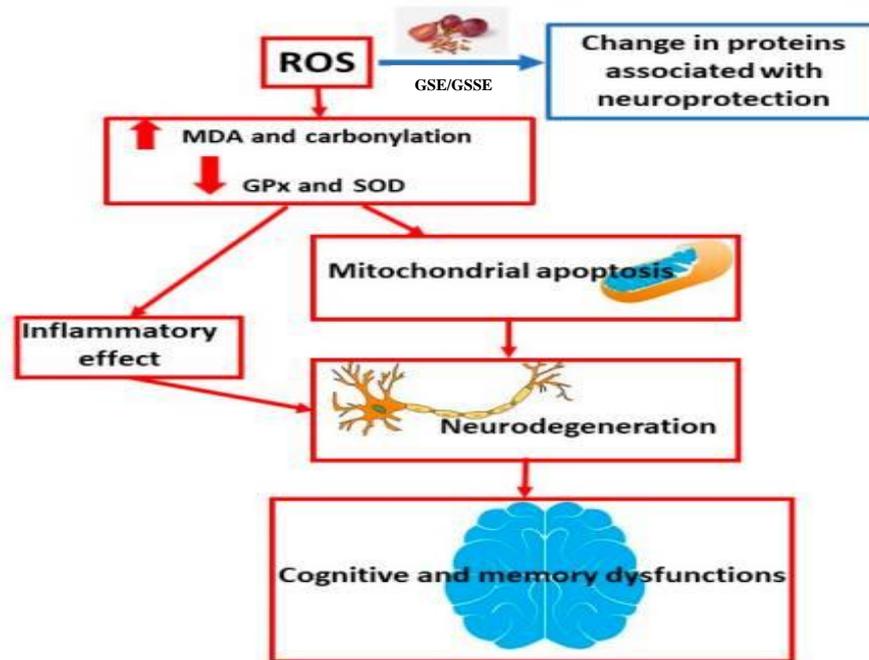
**Figure 27 : Diagramme schématisant l'effet anti-inflammatoire de l'extrait de pépins de raisin**

Extrait de Gupta *et al.*, 2020

### 4.3. Effet organoprotecteur

Grâce à ses effets antioxydant et anti-inflammatoire, le GSE a été décrit pour ses actions protectrices sur différents organes, tels que le cœur, le rein, le cerveau et dans différentes situations pathologiques comme le développement de cancer ou de syndrômes métaboliques. Dans ce manuscrit, nous ne développerons que les études ayant eu pour cible le SNC.

Ainsi, les différents extraits de raisins possèdent de nombreux effets protecteurs sur le cerveau. La **Figure 28** illustre l'effet du stress oxydant, en particulier des ROS, au niveau du cerveau et l'effet majeur du GSE. L'effet du GSE sur le cerveau se manifeste par plusieurs mécanismes et cette figure illustre notamment leurs effets sur la cognition et le dysfonctionnement de la mémoire.



**Figure 28 : Mécanismes pathologiques induits par le stress oxydant au niveau du cerveau et effets potentiels de l'extrait de pépins de raisin (GSE) et de l'extrait de peau et de pépins de raisin (GSSE)**

Les espèces oxygénées réactives (ROS) ont un effet négatif sur la vie des cellules cérébrales, ce qui peut entraîner des troubles neurodégénératifs et des réductions des fonctions cognitives et de la mémoire. Les antioxydants contenus dans le GSE ou le GSSE peuvent diminuer la quantité de ROS, en les convertissant en formes moins réactives, et donc des atteintes cérébrales.

Adapté de Sochorova *et al.*, 2020

Plusieurs études ont été effectuées démontrant l'effet du GSE sur le cerveau. En effet, **Bagchi *et al.*, (1998)** ont montré que l'extrait de pépins de raisin diminue la lipoperoxydation et la fragmentation de l'ADN au niveau du cerveau. D'autres études ont montré que l'extrait de pépins de raisin protège le SNC contre l'accumulation des dommages oxydatifs de l'ADN causés par le vieillissement (**Balu *et al.*, 2006**), en stimulant notamment les enzymes antioxydantes chez les rats âgés au niveau de la moelle épinière, du cortex cérébral, du striatum et de l'hippocampe et en augmentant les systèmes antioxydants non enzymatique tels que le glutathion réduit, la vitamine C et la vitamine E. De plus, **Wang *et al.*, (2009)** ont montré que la consommation de l'extrait de pépins de raisin pendant 6 mois préviendrait l'accumulation du peptide bêta-amyloïde au niveau du cerveau, diminuant ainsi son taux plasmatique sur un modèle murin de la maladie d'Alzheimer, ce qui a pour conséquence de réduire la détérioration des capacités cognitives.

De même, le GSSE a montré un effet neuroprotecteur dans le cas de l'ischémie/reperfusion cérébrale induite *in vitro* chez les rats selon plusieurs études menées par **Kadri et al., 2014 ; Kadri et al., 2020**). Dans ce modèle, l'effet du GSSE semble lié à son action sur le stress oxydant en diminuant la peroxydation des lipides et la carbonylation des protéines provoquées lors de l'ischémie/reperfusion, ainsi que par la diminution des ROS dont le peroxyde d'hydrogène, le radical hydroxyl et l'anion superoxyde. De plus, le GSSE a augmenté l'activité des enzymes antioxydantes dont la SOD, CAT et les peroxydases (**Kadri et al., 2014; Kadri et al.,2020**). Par ailleurs, l'effet neuroprotecteur du GSSE a été évalué dans des modèles *in vitro et in vivo* de la maladie de Parkinson chez les souris. Le GSSE a protégé les neurones dopaminergiques de la toxicité de la 6-hydroxydopamine (6-OHDA) en réduisant l'apoptose, le niveau des ROS et l'inflammation(**Yousef et al., 2018**). De même, les proanthocyanidines du GSE montrent des effets neuroprotecteurs contre les dommages induits par différents agents de chimiothérapie dont la thalidomide et le carboplatine au niveau du cerveau des rats en agissant sur le stress oxydant par augmentation de l'activité des enzymes antioxydantes (GPx, SOD et CAT) et par prévention de l'augmentation de la peroxydation des lipides et du NO (**Yousef et al., 2018**).

Le **Tableau 8** illustre l'ensemble des études effectuées démontrant un effet neuroprotecteur du GSE et de certains de ses composés chez le rongeur.

**Tableau 8 : Résumé des études portant sur l'effet neuroprotecteur de l'extrait de pépins de raisin (GSE) et de l'extrait de peau et de pépins de raisin (GSSE)**

<i>Extrait/ Composés</i>	<i>Effets observés</i>	<i>Modèle d'étude</i>	<i>Références bibliographiques</i>
GSE/ Proanthocyanidines	Diminution de la lipoperoxydation et de la fragmentation d'ADN causés par le vieillissement au niveau du cerveau.	Souris	Bagchi <i>et al.</i> , 1998
GSE	Protection du cerveau contre accumulation des dommages oxydants de l'ADN causés par le vieillissement : stimulation des enzymes antioxydantes, réduction de la peroxydation des lipides.	Rats	Bahu <i>et al.</i> , 2006
GSE	Effet neuroprotecteur: Induire des changements quantitatifs des protéines notamment impliquées dans les troubles cognitifs.	Rats	Kim <i>et al.</i> , 2006
GSE	Prévention de la formation d'oligomères de bêta-amyloïde et de la détérioration des capacités cognitives liées à la maladie d'alzheimer.	Souris	Wang <i>et al.</i> , 2008
GSSE	Effet protecteur lors de l'ischémie/reperfusion cérébrale: prévention contre le stress oxydant, contre l'épuisement énergétique conduisant à l'apoptose et la nécrose, contre le déséquilibre de l'homéostasie. Effet correcteur contre l'ischémie/reperfusion cérébrale.	Rats	Kadri <i>et al.</i> , 2014
		Rats	Kadri <i>et al.</i> , 2020
GSE/ Procyanidine	Effet protecteur lors de l'ischémie/reperfusion cérébrale: diminution du stress oxydant et de l'apoptose. Diminution de la peroxydation des lipides (MDA) et augmentation de l'activité GPx. Diminution de l'expression NeuN (semble délétère), CD34, Bcl2 et Bax.	Souris	Kong <i>et al.</i> , 2017
GSE/ Proanthocyanidines	Effet neuroprotecteur et réduction du stress oxydant induits par les chimiothérapies au niveau du cerveau. Modulation de l'inflammation et de la sécrétion des cytokines.	Rats	Yousef <i>et al.</i> , 2018
GSSE	Effet neuroprotecteur: protection des neurones dopaminergiques de la toxicité de la 6-OHDA en réduisant l'apoptose, les niveaux des ROS et l'inflammation. Evite la perte neuronale et amélioration de la fonction motrice	Souris / <i>In vitro</i> : Modèle de la maladie de Parkinson	Ben Youssef <i>et al.</i> , 2021
GSE/ Proanthocyanidines	Effet protecteur lors de l'ischémie/reperfusion cérébrale: Diminution de l'apoptose par diminution de l'expression Bax, bcl2 et caspase 3.	Souris	Tu <i>et al.</i> , 2019

## **5. Données cliniques sur les effets biologiques de l'extrait de pépins de raisin**

### **5.1. Effets thérapeutiques**

*Pour revue : Sochorova et al., 2020 ; Foshati et al., 2022*

Ces dernières années, le nombre d'études cliniques testant les effets des extraits de raisin, et en particulier du GSE, est en forte croissance. Un résumé de certaines études cliniques utilisant des extraits ou composés de raisin, et particulièrement les pépins de raisin, est présenté dans le **Tableau 9**. Ces études concernent le plus souvent les maladies cardiovasculaires, les troubles métaboliques, notamment le diabète et l'obésité, ainsi que les maladies rénales chroniques. Ces dernières sont notamment étudiées par notre équipe de recherche de Borj Cédria. Les résultats positifs obtenus lors des premiers essais cliniques sont très encourageants quant aux effets bénéfiques du GSE également chez l'humain.

Tableau 9 : Etudes cliniques illustrant l'effet de l'extrait de pépins de raisin (GSE)

<i>Pathologie</i>	<i>Références bibliographiques</i>	<i>Extrait/Composé</i>	<i>Effets observés</i>
Maladies cardiovasculaires	Clifton, 2004 ; Ward <i>et al.</i> , 2005; Mellen <i>et al.</i> , 2010; Park <i>et al.</i> , 2016; Lee and Kim, 2019; Odai <i>et al.</i> , 2019	GSE; Etude clinique randomisée, en double aveugle contrôlée vs placebo; Dose: entre 100 et 400 mg/J; Patients: entre 36 et 69; entre 4 et 12 semaines.	Effet sur la vasodilatation médiée par le flux (FMD).
	Clifton, 2004; Sano <i>et al.</i> , 2007; Shon <i>et al.</i> , 2021	GSE; Etude clinique randomisée, en double aveugle contrôlée vs placebo; Dose: entre 50 et 400 mg/J; Patients: entre 36 et 80; entre 4 et 16 semaines.	Effet sur la pression artérielle systolique (PAS) et la pression artérielle diastolique (PAD).
	Clifton, 2004; Ward <i>et al.</i> , 2005; Sano <i>et al.</i> , 2007; Ras <i>et al.</i> , 2013; Lee and Kim, 2015; Odai <i>et al.</i> , 2019	GSE; Etude clinique randomisée, en double aveugle contrôlée vs placebo; Dose: entre 100 et 300 mg/J; Patients: entre 36 et 70; entre 4 et 8 semaines.	Effet sur la fréquence cardiaque (FC).
Diabète	Gargari <i>et al.</i> , 2011	GSE; Etude clinique randomisée, en double aveugle contrôlée vs r placebo; Dose: entre 100 et 300 mg/J; 60 patients avec diabète type II; 2 mois.	Effet sur le statut et la peroxydation lipidique chez les patients avec le diabète de type II.
Maladies rénale chronique	Turki <i>et al.</i> , 2016	GSE; Etude clinique randomisée; contrôlée vs placebo; 350mg/J; 23 patients; 6 mois.	Effet antioxydant, anti-inflammatoire chez les patients atteints d'insuffisance rénale: Amélioration du débit de filtration glomérulaire et de la protéinurie, augmentation du statut antioxydant (CAT et SOD) plasmatique, diminution de la lipoperoxydation et de la carbonylation protéique, diminution de la CRP et de la triglycémie.
Obésité	Yilmazer-Musa <i>et al.</i> , 2012	GSE/ catéchine-3-gallates; salive des patients et sérum.	Effet inhibiteur sur l'activité de l'alpha-amylase et de l'alpha-glucosidase.
	Parandoosh <i>et al.</i> , 2020	GSE; Etude clinique randomisée, en double aveugle contrôlée vs placebo; Dose: 300 mg/J; 40 patients; 12 semaines.	Réduction des mesures anthropométriques et des marqueurs d'inflammation et amélioration du profil lipidique sanguin.

### 5.3. Sécurité d'utilisation

*Pour Revue : Unusan, 2020*

Jusqu'à aujourd'hui, il n'y a pas de dose préférentielle établie pour l'utilisation du GSE. Chez l'Homme, les doses qui ont été décrites dans les différentes études et qui sont prescrites dans certains pays européens sont comprises entre 100 et 300 mg/jour (**Griffin, 2021**).

En raison de ces effets bénéfiques sur la santé humaine, le GSE a été examiné pour une analyse toxicologique par le NIEHS (*National Institute of Environmental Health Sciences*), a été certifié comme sûr par la FDA (*Food and Drug Administration*) (**Unsuwan, 2020**) et est vendu comme additif alimentaire répertorié dans la base de données Everything Added to Food aux États-Unis. La toxicité orale aiguë du GSE a tout d'abord été déterminée chez les rats et la dose maximale sans effet nocif observé a été évaluée ; celle-ci est de 1410 mg/kg PC/jour chez le mâle et 1501 mg/kg PC/jour chez la femelle. De même, le GSE a montré une dose létale 50% (DL50) supérieure à 4 g/kg (**Yamakoshi et al., 2002**). Chez l'Homme, la prise orale du GSE jusqu'à 400 mg pendant 12 semaines et 2500 mg pendant 4 semaines (**Sano et al., 2007**) ne montre pas d'effet indésirable et semble bien tolérée. Les effets indésirables probables à long terme des apports élevés en GSE doivent être déterminés par rapport à l'interaction avec d'autres composés alimentaires, l'inhibition des enzymes digestives et l'interaction avec les médicaments. Ainsi, des études toxicologiques plus systématiques devront être réalisées.

### 6. Intérêts potentiels de l'extrait de pépins de raisin dans la sclérose en plaques

Les études testant l'effet du GSE sur la SEP restent peu nombreuses et se limitent à des études précliniques (**Tableau 10**) qui concernent principalement l'évaluation individuelle des composés polyphénoliques présents dans le GSE. Le resvératrol est le composé qui a été le plus fréquemment testé. Un extrait de jus de raisin blanc a également été testé, mais jusqu'à présent aucune étude ayant testé l'effet du GSE dans le cadre de la SEP n'a été réalisée.

**Tableau 10 : Etudes illustrant l'effet bénéfique de l'extrait de pépins de raisin (GSE) dans des modèles murins de sclérose en plaques**

Extrait/ Composé de raisin	Références bibliographiques	Etude/Modèle	Effets
<i>Vitis vinifera</i>	Shindler <i>et al.</i> , 2010	EAE-souris /20 mg/kg/J resvératrol; 4 semaines.	Réduction du dysfonctionnement neurologique pendant l'EAE.
	Kelly <i>et al.</i> , 2012	EAE-souris /100 et 250 mg/kg/J resvératrol; 4 semaines.	Retard de l'apparition du pic de l'EAE. Effet neuroprotecteur (prévention de la perte neuronale).
	Sato <i>et al.</i> , 2013	EAE-souris /500 et 100 mg/kg/J resvératrol; 8 semaines.	Pas d'effet neuroprotecteur, préserve la démyélinisation et l'inflammation.
	Giacoppo <i>et al.</i> , 2015	EAE-souris/20 et 40 mg/Kg/J Extrait de jus de raisin blanc; 28 jours.	Réduction des signes cliniques et du score histologique de la maladie. S'oppose à l'altération des voies inflammatoires et oxydatives.

Il existe une étude clinique randomisée, en double aveugle, contrôlée vs placebo, menée en Iran et publiée par Siahpoosh *et al.*, en 2018. Elle a été réalisée chez 66 patients atteints de SEP-RR divisés en deux groupes de 33 personnes chacun, l'un recevant deux capsules de 450 mg de GSE par jour durant un mois (groupe traité), l'autre deux capsules de placebo (groupe témoin). Les résultats obtenus montrent que l'utilisation du GSE améliore significativement l'activité physique et mentale des patients atteints de SEP-RR et les résultats de l'étude sont représentés dans les **Tableaux 11 et 12** :

**Tableau 11 : Comparaison de la moyenne des sous-échelles physiques mesurées dans les deux groupes (Extrait de Siahpoosh *et al.*, 2018)**

Sub-scores	Treatment		Placebo	
	Before	After	Before	After
Physical function	10.77 ± 1.26	12.63 ± 2.38*	10.92 ± 1.25	12.55 ± 2.48*
Health perceptions	11.01 ± 1.24	11.56 ± 1.89	10.19 ± 1.99	10.37 ± 1.01
Energy/fatigue	5.78 ± 0.5	7.63 ± +0.96*	6.23 ± 0.16	6.74 ± 0.53
Role limitations-physical	6.52 ± 0.4	8.27 ± 2.25*	7.20 ± 0.63	6.91 ± 0.68
Pain	7.63 ± 0.77	8.46 ± 0.84*	7.55 ± 0.67	7.67 ± 0.91
Sexual function	4.26 ± 0.50	4.72 ± 0.44	4.10 ± 0.62	4.24 ± 0.94
Social function	8.08 ± 1.08	9.45 ± 1.01*	8.70 ± 0.90	9.22 ± 1.05
Health distress	4.97 ± 0.44	7.31 ± 0.94*	6.48 ± 0.10	6.68 ± 0.8
Total physical score	59.72 ± 10.34	71.05 ± 9.10*	62.53 ± 9.66	65.54 ± 10.01

**Tableau 12 : Comparaison de la moyenne des sous-échelles mentales mesurées dans les deux groupes (Extrait de Siahpoosh *et al.*, 2018)**

Sub-scores	Treatment		Placebo	
	Before	After	Before	After
Health distress	6.33 ± 0.87	9.31 ± 0.74*	8.25 ± 0.94	11.48 ± 1.76
Overall quality of life	5.12 ± 0.45	6.73 ± 0.80*	6.47 ± 0.85	6.66 ± 0.92
Emotional well-being	15.73 ± 1.76	20.37 ± 2.19*	16.90 ± 1.65	17.06 ± 1.39
Role limitations-mental	13.21 ± 1.46	14.25 ± +1.93	12.99 ± 1.67	14.32 ± 1.27
Cognitive function	8.80 ± 0.95	9.55 ± 0.57	8.63 ± 0.46	8.41 ± 0.44
Total mental score	48.73 ± 4.11	61.27 ± 6.13*	53.26 ± 5.86	55.31 ± 4.09

### III. Modèles animaux de la sclérose en plaques

*Pour revue : Mix et al., 2010 ; Procaccini et al., 2015 ; Lassmann and Bradl, 2017 ; Glatigny and Betteli, 2018 ; Bjelobaba et al., 2018 ; Smith et al., 2021*

#### 1. Généralités

Depuis le premier modèle animal mis en place en 1933 par Rivers (**Figure 29**), de nombreux autres modèles ont été proposés pour étudier la SEP. Bien que les modèles animaux ne puissent pas reproduire la complexité et l'hétérogénéité de la pathologie, ils se sont révélés utiles pour le développement de plusieurs médicaments utilisés pour le traitement des patients atteints de SEP. Ainsi, chaque modèle animal mime partiellement une/des caractéristique(s) spécifique(s) des aspects de la pathologie.

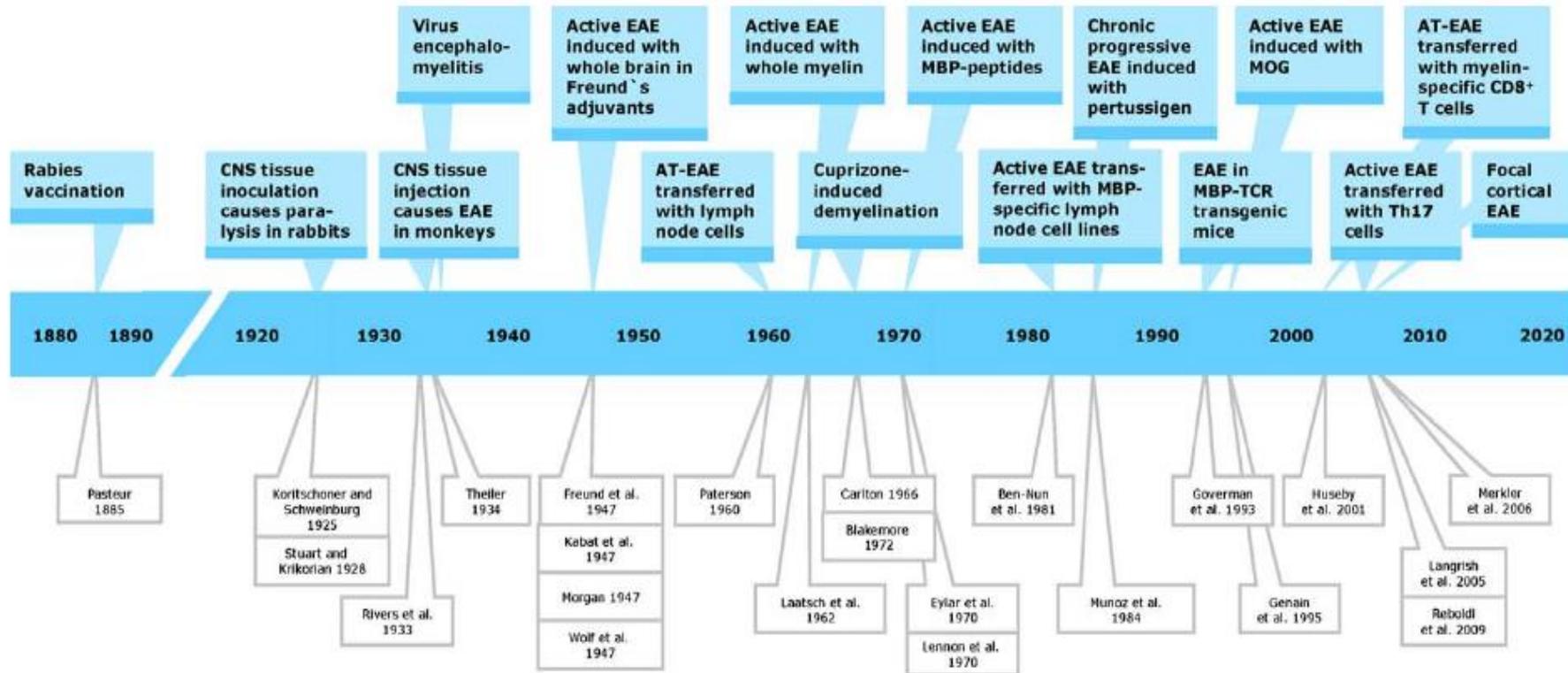


Figure 29 : Chronologie des étapes clés dans l’histoire des modèles animaux de sclérose en plaques

AT-EAE: Adoptive transfer EAE CD: Cluster of differentiation

CNS: Central nervous system

MBP: Myelin basic protein

MOG : Myelin oligodendrocyte glycoprotein

TCR : T cell receptor

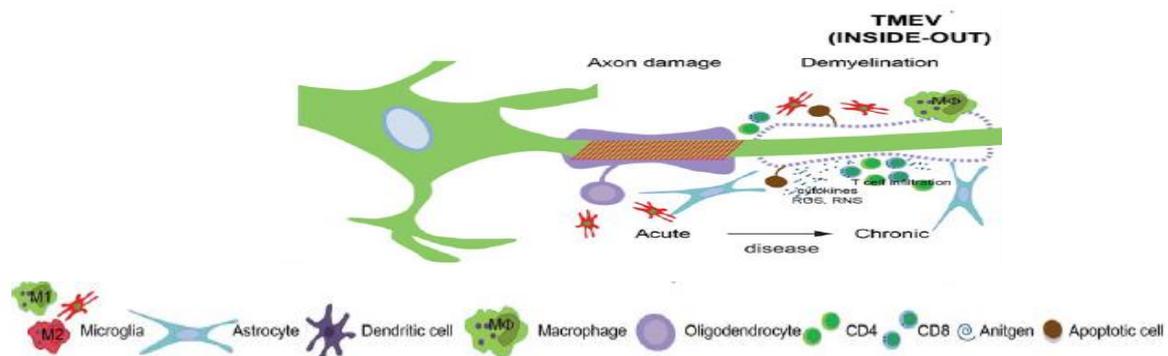
EAE : Experimental autoimmune encephalomyelitis

Extrait de Mix *et al.*, 2010

Il existe trois grandes catégories de modèles de SEP : i) les modèles de démyélinisation induite par des virus, ii) les modèles de démyélinisation induite par des toxines et iii) les modèles d'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE).

### 1.1. Les modèles de démyélinisation induite par des virus

La mise en place de ces modèles animaux repose sur l'hypothèse que certains facteurs environnementaux, en particulier les facteurs infectieux de type viral, jouent un rôle dans l'initiation et la progression de la SEP (Bjelobaba *et al.*, 2018). Plusieurs virus pourraient être utilisés tels que le virus de l'encéphalomyélite murine de Theiler (TMEV), le virus de la maladie de carré canine et le virus de l'hépatite murine (Lassman and Bradl, 2017). Parmi ces modèles, celui utilisant le TMEV est le mieux caractérisé. Ainsi, grâce à ce modèle, les animaux manifestent une inflammation intense et multifocale de la SB et de la SG, une apoptose neuronale, une prolifération des cellules de la microglie ainsi que des processus de démyélinisation/remyélinisation (Procaccini *et al.*, 2015). La réponse immune induite lors de la TMEV provoque une dégénérescence axonale similaire à celle observée dans la SEP (Figure 30).



**Figure 30 : Représentation schématique du modèle de démyélinisation induite par le le virus de l'encéphalomyélite murine de Theiler**

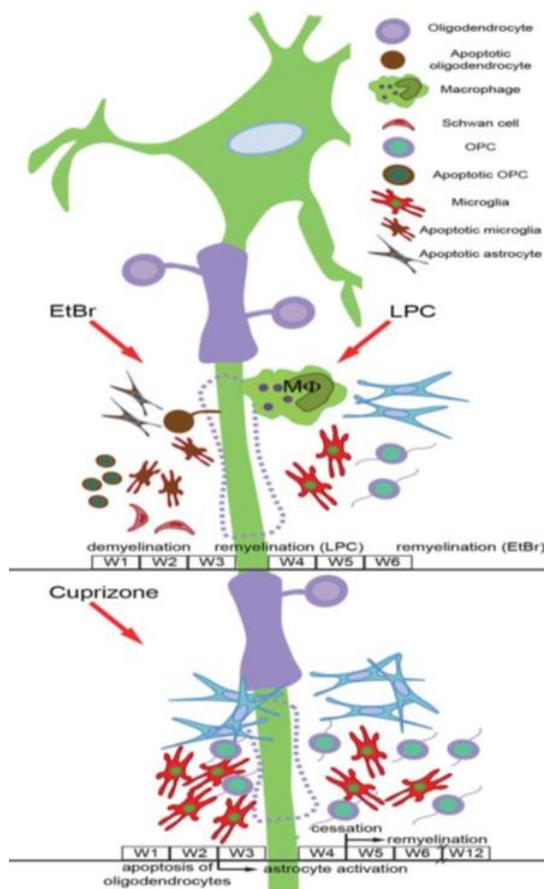
L'infection par le TMEV induit des dommages axonaux qui précèdent la démyélinisation, observés également au cours de la phase chronique de la maladie. Les dommages axonaux affectent les cellules immunitaires qui vont recruter des médiateurs pro-inflammatoires pour induire la démyélinisation.

Adapté de Bjelobaba *et al.*, 2018

### 1.2. Les modèles de démyélinisation induite par des toxines

Ces modèles sont indispensables pour étudier les processus de démyélinisation/remyélinisation. De plus, ils se caractérisent par une bonne reproductibilité et une localisation anatomique bien définie de la zone de démyélinisation. Il

existe plusieurs agents gliotoxiques utilisés pour générer des foyers de démyélinisation. Ces agents peuvent être injectés directement dans la SB, comme le bromure d'éthidium (EtBr) et la lysolécithine, ou des toxines administrées par voie systémique, telles que la cuprizone (Woodruff and Franklin, 1999). Par ailleurs, l'ionomycine, l'anticorps contre le galactocérébroside, le 6-aminonicotinamide et la toxine diphtérique sont d'autres agents gliotoxiques qui peuvent être utilisés, mais ils permettent plus difficilement l'exploration des processus de remyélinisation dans ces modèles car ce phénomène n'est pas spontanément observé. Généralement, les modèles induits suite à l'administration de lysolécithine et de cuprizone sont les plus utilisés. Cependant, l'inconvénient majeur de tous ces modèles réside dans la présence d'une activité immunitaire très restreinte (Figure 31).



**Figure 31 : Représentation schématique des modèles de démyélinisation induite par des toxines**

Le bromure d'éthidium (EtBr) induit l'apoptose des astrocytes, des oligodendrocytes et des progéniteurs oligodendrocytaires (OPC) durant la première semaine post-injection. La remyélinisation débute 6 semaines après l'induction.

La lysophosphatidylcholine (LPC) ne produit pas de mort cellulaire, et dans ce modèle la remyélinisation intervient plus rapidement dès la 3<sup>ème</sup> semaine après l'injection.

La cuprizone induit l'apoptose des oligodendrocytes uniquement. L'activation microgliale débute 2 semaines après l'initiation du modèle. Elle se corrige progressivement au fur et à mesure que la remyélinisation se met en place. L'activation astrocytaire quant à elle perdure tout au long de la maladie. La remyélinisation intervient à partir du moment où l'administration de cuprizone est arrêtée.

**Extrait de Bjelobaba *et al.*, 2018**

### 1.3. L'encéphalomyélite auto-immune expérimentale

L'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE) est le modèle de référence pour l'étude de la SEP. C'est l'un des modèles animaux les plus étudiés car il reproduit diverses caractéristiques histopathologiques et immunologiques de la SEP. Il existe différents types d'EAE reproduisant chacun certains aspects de la maladie (Bjelobaba *et al.*, 2018).

## 2. L'encéphalomyélite auto-immune expérimentale

*Pour revue : Mix et al., 2010 ; Procaccini et al., 2015 ; Bjelobaba et al., 2018 ; Glatigny and Betteli, 2018*

### 2.1. Historique et généralités

Historiquement, la mise en place de ce modèle a été développée suite à l'observation de complications neuroparalytiques induites par une sensibilisation par des fragments de tissus ou des cellules issus de cerveaux humains. Ce fût notamment le cas avec l'effet indésirable observé lors de la vaccination antirabique utilisant des virus inactivés amplifiés dans des cellules neuronales ou dans des cerveaux insuffisamment purifiés qui entraîna chez les patients vaccinés des complications neurologiques dont l'encéphalomyélite aiguë disséminée (**Stuart and Krikorian, 1928**). En se basant sur ces observations cliniques, Rivers a développé en 1933 le premier modèle d'EAE grâce à l'immunisation de singes par injection d'extraits de cerveau de lapin (**Rivers et al., 1933**). Par la suite, dans le but d'améliorer ce modèle et afin de potentialiser la réponse immune humorale lors de l'immunisation, les extraits de cerveau ont été administrés sous une forme mélangée avec l'Adjuvant Complet de Freund (CFA) constitué de *Mycobacterium tuberculosis* tuée à la chaleur et la toxine pertussique (PTX) (**Freund and McDermott, 1942**). Le CFA permet de libérer progressivement les Ag, le *Mycobacterium tuberculosis*, et donc de stimuler la réponse immune (**Munoz et al., 1984**) et la PTX qui est produite par la bactérie *Bordetella pertussis* (responsable de la coqueluche) permet d'augmenter la perméabilisation de la BHE favorisant ainsi l'infiltration de leucocytes activés dans le SNC (**Pittman et al., 1979**). La concentration de chaque composé varie en fonction des protocoles utilisés et de la forme de SEP à mettre en place. Au cours du temps, les extraits de cerveau ont été remplacés par des protéines spécifiques de la myéline, telles que la Myelin Basic Protein (MBP) qui a été la première à avoir été purifiée et utilisée (**Einstein et al., 1962**), MOG (**Lebar et al., 1986**) ou la PLP (**Tuohy et al., 1988**). Par la suite, les protéines totales ont été remplacées par des peptides synthétiques (**Eylar et al., 1970 ; Lennon et al., 1970**) tels que la MBP<sub>1-37</sub>, MOG<sub>35-55</sub> et la PLP<sub>139-151</sub>, permettant d'avoir des modèles plus reproductibles (**Wekerle et al., 1994**). D'autres Ag additionnels sont également supposés être impliqués dans la réaction auto-immune de la SEP et de l'EAE (**Tableau 13**).

**Tableau 13 : Protéines et lipides jouant le rôle d'auto-antigènes putatifs dans le modèle d'encéphalomyélite auto-immune expérimentale ou dans la sclérose en plaques (Extrait de Mix *et al.*, 2010)**

Antigens	Results in MS and/or EAE	References
Myelin basic protein	T and B cell response in EAE and MS	Einstein <i>et al.</i> (1962), Laatsch <i>et al.</i> (1962)
MOG	T and B cell response in EAE and MS	Lebar <i>et al.</i> (1986)
PLP	T and B cell response in EAE and MS	Tuohy <i>et al.</i> (1988)
2',3'-CNP	T and B cell response in EAE and MS	Määttä <i>et al.</i> (1998)
NF 155	Antibodies recognize the extracellular domain in MS and cause axonal injury in EAE, but only in preexisting demyelinated lesions	Charles <i>et al.</i> (2002), Derfuss <i>et al.</i> (2010), Mathey <i>et al.</i> (2007)
NF 186	Antibodies recognize the extracellular domain in MS, inhibit axonal conduction in a complement-dependent manner and cause axonal injury in EAE	Derfuss <i>et al.</i> (2010), Hedstrom <i>et al.</i> (2007), Mathey <i>et al.</i> (2007)
Neurofilament-M	Neurofilament-M-specific T cells induce severe clinical EAE with confluent demyelination and massive axonal loss	Krishnamoorthy <i>et al.</i> (2009)
Contactin-2/TAG-1	Contactin-2/TAG-1-specific T cells induce inflammatory lesions in the cortex and white and gray matter thereby opening locally the BBB and causing occasionally clinical EAE	Derfuss <i>et al.</i> (2009, 2010), Mörtl <i>et al.</i> (2007), Shimoda and Watanabe (2009)
S100β	Strong T cell response in EAE	Kojima <i>et al.</i> (1997)
Phosphatidylserine	Promotion of demyelination in marmoset EAE	Ohler <i>et al.</i> (2004)
Sulfatides	T and B cell response in EAE	Kanter <i>et al.</i> (2006)
Oxidized phosphatidylcholine	Strong antibody reactivity in MS brain and EAE spinal cord	Qin <i>et al.</i> (2007)
Ganglioside GM1, sulfatide and galactosylceramide	Increased reactivity of pro-inflammatory cytokine secreting CD8 <sup>+</sup> T cells in MS patients	Shamshiev <i>et al.</i> (1999)
Gangliosides GM3 and GQ1b	Increased T cell response in primary progressive MS patients	Pender <i>et al.</i> (2003)
Ganglioside GD1a	Increased antibodies in serum and cerebrospinal fluid of patients with MS and optic neuritis	Mata <i>et al.</i> (1999)
Lactosylceramide and L-α-lysophosphatidylserine	Strong antibody reactivity in serum and cerebrospinal fluid of MS patients	Kanter <i>et al.</i> (2006), Quintana <i>et al.</i> (2008b)

L'EAE peut être induite dans différentes espèces animales ; les premières utilisées furent les primates non-humains comme le marmoset et le macaque rhesus à cause de leurs ressemblances génétiques et immunologiques avec les humains (**Rivers and Schwentker, 1935**). Les cochons d'Inde (**Freund *et al.*, 1947**) et les lapins (**Waksman *et al.*, 1956**) furent utilisés par la suite. Les souris (**Olitzky and Yager, 1949**) et les rats (**Lipton and Freund, 1952**) sont dorénavant les espèces les plus utilisées en plus des poissons-zèbres (**Kulkarni *et al.*, 2017**).

## 2.2. L'encéphalomyélite auto-immune expérimentale murine

### 2.2.1. Par immunisation passive

Une façon d'induire l'EAE est de réaliser un transfert adoptif, c'est-à-dire d'inoculer des souris syngéniques naïves avec des lymphocytes T activés en présence de l'antigène spécifique de la myéline. Cette méthode est appelée « EAE passive » (**Racke, 2001**). La première vérification démontrant que l'injection à des rats naïfs de cellules de ganglions lymphatiques de rats précédemment sensibilisés permet de développer l'EAE a été réalisée par Paterson en 1960 (**Paterson, 1960**). Vingt ans plus tard, le protocole d'expansion des cellules T spécifiques de l'antigène a été établi et l'EAE passive avec des cellules T activées contre la MBP a été induite (**Ben-Nun *et al.*, 1981**).

Les LT activés peuvent être obtenus soit *in vivo* dans les ganglions lymphatiques de modèles murins immunisés de façon active (**Paterson *et al.*, 1960**), soit *in vitro* grâce à la mise en

culture de LT en présence de l'antigène (**Ben-Nun et al., 1981**). L'EAE passive s'avère précieuse pour évaluer le rôle central des LTCD4<sup>+</sup> au cours de la maladie. Ce modèle est également utile pour étudier la phase effectrice de la maladie en l'absence d'adjuvant. L'EAE se développe plus rapidement et de manière plus homogène, permettant l'étude de la phase effectrice indépendamment de la phase d'induction dont la pertinence est discutable pour la SEP (**Wekerle et al., 1994**). Il est possible de manipuler les LT *in vitro* avec une variété de molécules inflammatoires avant le transfert, ce qui permet d'étudier l'influence des différents sous-types de LT impliqués dans la SEP. L'EAE passive peut également être utilisée pour examiner de plus près la migration des LT dans le SNC (**McCarthy et al., 2012**). Ce modèle est très important dans la recherche des thérapies anti-inflammatoires appropriées (**Gold et al., 2006**). La limitation de ce modèle est que les LT spécifiques transférés pourraient ne pas avoir la capacité encéphalitogène *in vivo*, ce qui signifie que le transfert adoptif des LT serait incapable d'induire la perte de myéline.

### 2.2.2. Par immunisation active

L'EAE par immunisation active est induite de façon directe dans un modèle murin grâce à l'administration d'un peptide mimant un épitope de myéline et d'adjuvants potentialisateurs de la réponse immune à savoir le CFA et/ou la PTX. Selon les protocoles d'immunisation et les fonds génétiques de modèles murins utilisés, différentes formes de SEP peuvent être modélisées. Chez les souris, plusieurs lignées peuvent être utilisées, dont les plus fréquemment utilisées sont les lignées SJL ou C57BL/6J (**Tableau 14**). Les souris SJL sont sensibles à l'immunisation par l'administration de PLP, de MOG et de MBP, que ce soit la protéine entière ou un peptide. Lorsqu'elles sont immunisées avec du PLP, elles présentent souvent une forme d'EAE-RR (**Kono et al., 1988 ; Tuohy et al., 1989**) alors qu'une immunisation avec de la MOG<sub>35-55</sub> induit une forme chronique (**Tompkins et al., 2002**). En revanche, les souris C57BL/6 sont sensibles uniquement à une immunisation par la MOG ou ses peptides dérivés.

**Tableau 14 : Les principaux modèles murins d'encéphalomyélite auto-immune expérimentale obtenus par immunisation active**

Mouse strain	MHC	Peptide	Peptide sequence	Peptide origin	Clinical course	Reference
PL/J	H-2 <sup>u</sup>	MBPac1-11	Ac-ASQKRPSQRHG	rat	Classic	114
B10.PL	H-2 <sup>u</sup>	MBPac1-9	Ac-ASQKRPSQR	rat/mouse	Classic	115
SJL/J	H-2 <sup>s</sup>	PLP139-151	HCLGKWLGH PDKF	human/mouse	Classic <sup>c</sup>	116
		PLP178-191	NTWTTCQSIAPFSK	human/mouse	Classic <sup>c</sup>	117
		MBP84-104 <sup>b</sup>	VHFFKNIVTPRTPPPSQGKGR	mouse	Classic <sup>c</sup>	118-121
		MOG92-106 <sup>d</sup>	DEGGYTCFFRDHSYQ	rat	Classic <sup>c</sup>	47,91
C57BL/6	H-2 <sup>b</sup>	MOG35-55	MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGK	rat/mouse	Classic	122
		MOG35-55	MEVGWYRPPFSRVVHLYRNGK	human	Classic	46
NOD	H-2 <sup>g7</sup>	MOG35-55	MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGK	rat/mouse	Classic	123
		PLP48-70	TYFSKNYQDYEYLINIHAQYV	human/mouse	Classic	124
C3H.SW	H-2 <sup>b</sup>	MOG35-55	MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGK	rat/mouse	Classic	122
ABH (Biozzi)	H-2 <sup>dq1</sup>	PLP56-70	DYELINVIHAQYV	mouse	Classic	124,125
		MOG8-22	PGYPIRALVGDEQED	rat	Classic	125,126
A.SW	H-2 <sup>s</sup>	MOG92-106 <sup>d</sup>	DEGGYTCFFRDHSYQ	rat	Atypical	47
C3H/HeJ	H-2 <sup>k</sup>	PLP190-209	SKTSASIGSLCADARMYGVL	human/mouse	Classic or Atypical	61,127
		PLP215-232	PGKVCGSNLLSICKTAEFQ	human/mouse	Classic or Atypical	61,127
CBA/J	H-2 <sup>k</sup>	PLP190-209	SKTSASIGSLCADARMYGVL	human/mouse	Atypical	127
		PLP215-232	PGKVCGSNLLSICKTAEFQ	human/mouse	Atypical	127
DBA/1	H-2 <sup>d</sup>	MOG79-96 <sup>d</sup>	GKVALRIONVRFSDHGGY	rat	Classic	128

Ce tableau résume les principaux modèles murins d'EAE qui peuvent être activement induits en mettant l'accent sur les épitopes encéphalitogènes dominants qui ont été décrits. Cette liste n'inclut pas tous les modèles apportés dans la littérature. Les souches en gras sont les plus couramment utilisées.

b : Plusieurs peptides de cette région sont encéphalitogènes

c : Signalé comme présentant une évolution clinique récurrente-rémittente.

d : La toxine pertussique (PTX) n'est pas nécessaire pour l'induction de l'EAE avec cette combinaison souche/antigène, mais influence l'évolution clinique chez les souris A.SW.

MBP : protéine basique de myéline

PLP : protéolipoprotéine

MOG : glycoprotéine oligodendrocytaire de myéline.

#### Extrait de Stromnes and Goverman, 2006a

Dans ces modèles, le rapport entre l'antigène et l'adjuvant est d'une importance cruciale pour le développement de l'EAE. Le CFA est l'adjuvant le plus fréquemment utilisé et favorise plutôt la réponse immunitaire Th1, tandis qu'un adjuvant moins couramment utilisé dépourvu de *Mycobacterium tuberculosis* (appelé adjuvant incomplet de Freund [IFA]) induit une réponse à dominance Th2 (Bjelobaba *et al.*, 2018). En plus d'améliorer la réponse immunitaire périphérique, le CFA augmente la perméabilité de la BHE, sans activation évidente de la microglie et des astrocytes (Rabchevsky *et al.*, 1999). Le principal inconvénient du CFA est qu'il peut provoquer des granulomes et des lésions au niveau du site d'inoculation. Pour générer une maladie, les souris reçoivent des injections supplémentaires de PTX administrées le plus souvent le jour de l'immunisation et 48 heures après (Stromnes et Goverman, 2006a).

Bien que l'effet précis de la PTX dans l'EAE soit encore indéterminé, il est suggéré qu'elle facilite l'entrée des cellules immunitaires dans le SNC, ou encore qu'elle favorise la prolifération et la production de cytokines par les LT et rompt la tolérance de ces derniers (**Waldner et al., 2000**). D'une manière générale, cette immunisation conduit à l'amorçage des LT spécifiques de la myéline dans les organes lymphoïdes secondaires. Les LT activés subissent une maturation et une expansion clonale, formant ainsi un grand pool de cellules T CD4<sup>+</sup> spécifiques de la myéline à la périphérie. Ces lymphocytes se différencient ensuite en cellules effectrices et deviennent capables de quitter les organes lymphoïdes secondaires par les vaisseaux lymphatiques efférents pour passer dans la circulation sanguine. L'entrée de ces cellules dans le SNC est accomplie lors de l'expression de molécules d'adhésion, de cytokines et de chimiokines, ainsi que de leurs récepteurs, conduisant à la dégradation de la BHE (**Engelhardt, 2006**). Dans l'espace périvasculaire ou dans le parenchyme du SNC, les LT effecteurs sont réactivés après avoir reconnu les Ag sur les CPA, telles que les microglies/macrophages, ce qui amplifie la réponse inflammatoire par l'activation continue de ces cellules et le recrutement constant d'autres cellules. Ces événements sont suivis par la sécrétion de médiateurs pro-inflammatoires attirant un grand nombre de LT effecteurs et de cellules mononucléaires dans le SNC, conduisant à des lésions tissulaires et une démyélinisation mimant ainsi la physiopathologie de la SEP (**McQualter and Bernard, 2007**). Un déficit fonctionnel, tel qu'une paralysie de la queue et des membres postérieurs, se produit alors. En outre, il a été rapporté que des niveaux élevés de cytokines, telles que l'IFN- $\gamma$  et le NO, peuvent avoir un rôle régulateur en supprimant les réponses des LT dans les stades ultérieurs de la maladie EAE (**Arellano et al., 2015**).

Etant donné l'ampleur de la littérature concernant les différents modèles EAE induits chez les souris, il n'est pas possible d'en donner une présentation exhaustive dans ce manuscrit. Ainsi, nous nous limiterons à présenter de façon générale les modèles utilisés pour l'évaluation des troubles sensitifs et de façon détaillée le modèle d'EAE que nous avons utilisé dans la présente étude.

### **3. Les modèles souris d'encéphalomyélite auto-immune expérimentale utilisés pour l'évaluation des troubles sensitifs**

*Pour revue : Tian et al., 2013 ; Khan et al., 2014a*

#### **3.1. Présentation générale**

A l'heure actuelle, différents modèles de souris d'EAE, mimant différentes formes de SEP (chronique, chronique à poussées ou récurrente-rémittente) sont disponibles pour l'évaluation

et la compréhension des mécanismes physiopathologiques des troubles sensitifs associés à cette maladie. La caractéristique commune de ces modèles est d'induire une EAE avec des troubles moteurs modérés afin de pouvoir réaliser une évaluation des troubles sensitifs qui sont évalués la plupart du temps par des tests comportementaux mesurant la latence d'apparition de comportement d'échappement ou d'expression de la gêne ou de la douleur lors de stimulation sensitive évoquée. Plusieurs études ont été menées afin de caractériser les troubles sensitifs et les mécanismes physiopathologiques de leur apparition dans différentes variantes d'EAE induites chez les souris. Les données obtenues peuvent être regroupées en fonction des formes d'EAE utilisées. En résumé, quatre grands types de variantes peuvent être définis :

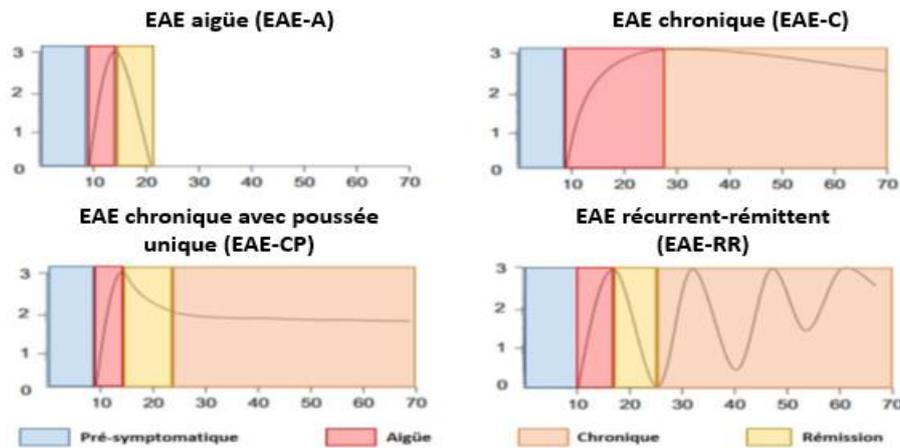
\* le modèle d'EAE aiguë (EAE-A) dans lequel la phase pré-symptomatique est suivie d'une phase aiguë qui correspond à l'apparition et au pic des symptômes, elle-même suivie d'une phase de rémission complète des symptômes ;

\* le modèle d'EAE chronique (EAE-C), dans lequel la phase pré-symptomatique est suivie d'une phase aiguë qui correspond à l'apparition et au pic des symptômes qui perdure sous la forme d'un plateau car aucune amélioration des symptômes n'est constatée ;

\* le modèle d'EAE chronique avec une poussée unique (EAE-CP) dans lequel la phase pré-symptomatique est suivie d'une phase aiguë qui correspond à l'apparition et au pic des symptômes évoluant vers une phase de rémission partielle des symptômes suivie d'un plateau de stagnation des symptômes ;

\* le modèle d'EAE récurrent-rémittent (EAE-RR), dans lequel la phase pré-symptomatique est suivie d'une phase aiguë qui correspond à l'apparition et au pic des symptômes elle-même suivie d'une alternance de phase de rémission et de rechute.

Ces différentes variantes d'EAE murines sont représentées dans la figure suivante (**Figure 32**) :



**Figure 32 : Représentation schématique du déroulement temporel des symptômes dans les différents modèles d'encéphalomyélite auto-immune expérimentale murine utilisés pour l'étude des troubles sensitifs**

Chez les souris, l'EAE se caractérise par une paralysie ascendante débutant par une atteinte de la queue, suivi de la paralysie des pattes arrière puis avant, évaluée à l'aide d'une échelle à cinq points, pouvant varier d'un modèle à un autre, mais qui communément s'échelonne de 0 (aucun signe clinique) à 5 (mort de l'animal). Un score de 4 correspond à l'apparition de paralysies sévères des membres inférieurs et/ou supérieurs.

Suite à l'immunisation, plusieurs phases de la maladie peuvent être distinguées en fonction des modèles. Une phase pré-symptomatique suivie i) d'une phase aiguë, qui correspond à l'apparition et au pic des symptômes, puis d'une phase de rémission complète des symptômes dans le cas d'une EAE aiguë (EAE-A), ii) d'un plateau lorsqu'aucune amélioration des symptômes n'est constatée dans le cas d'une EAE chronique (EAE-C), iii) d'une récupération incomplète suivie d'un plateau de stagnation des symptômes dans le cas d'une EAE chronique à poussée unique (EAE-CP), iv) d'une alternance de phase de rémission et de rechute dans le cas d'une EAE récurrente-rémittente (EAE-RR).

**Adapté de Kipp *et al.*, 2012**

**Extrait de Démosthènes, 2018**

Il est aussi important de souligner le fait que, bien qu'ayant des traits communs, chacun de ces modèles possède également ses propres caractéristiques, telles que la cinétique d'apparition des symptômes sensitifs, la sévérité clinique et la persistance dans le temps. Une importance particulière doit être apportée à ces différences puisqu'elles orientent le choix du modèle à utiliser en fonction des objectifs définis et des types de traitement recherchés. Au cours de ce travail de thèse, nous avons choisi un modèle particulier d'EAE que nous détaillons dans le chapitre suivant.

### 3.2. Modèles d'encéphalomyélite auto-immune chronique à poussée unique (EAE-CP)

Ces modèles ont été initialement développés chez des souris SJL (mâles et femelles) en administrant du PLP<sub>139-151</sub>, du CFA mais sans PTX, et ce en se focalisant sur les troubles sensitifs (Aicher *et al.*, 2004). Au cours du temps, la plupart de ces modèles ont été développés chez des souris femelles C57BL/6J par immunisation active. Les protocoles d'immunisation diffèrent en fonction de l'âge des souris (6-12 semaines), des quantités de MOG<sub>35-55</sub> (50-250µg) et de PTX (200-350ng) utilisées et de la concentration en *Mycobacterium tuberculosis* contenu dans le CFA (0,5-5mg/mL) (Tableau 15).

Plusieurs équipes de recherche, dont le groupe de Bradley J. Kerret *et al.*, travaillent sur les modèles EAE développés chez les souris C57BL/6J en administrant de la MOG<sub>35-55</sub>, du CFA et de la PTX, et s'intéressent notamment à l'évaluation des troubles sensitifs. Quel que soit le protocole d'induction utilisé, l'EAE suit la même évolution qui se caractérise par une phase pré-symptomatique durant une dizaine de jours, une phase d'apparition des symptômes, un pic des symptômes observés à J17 ou à J21 et une phase de récupération non complète. Le score clinique forme un plateau caractéristique d'une phase chronique qui ne retourne jamais au niveau basal même après 30 jours d'expérimentation. Pour ces modèles d'EAE, l'infiltration de cellules immunes en particulier les LTCD3<sup>+</sup> est retrouvée au niveau de la ME, au début des symptômes et tout au long de la maladie (Olechowski *et al.*, 2009 ; Benson *et al.*, 2015). La démyélinisation n'a été étudiée que dans une seule étude qui a montré qu'elle est présente au moment du pic des symptômes, et a été retrouvée au niveau de la ME et du nerf sciatique (Wang *et al.*, 2017). Pour ces modèles, il a été mis en évidence des troubles de la motricité par diminution de l'activité locomotrice dès le pic des symptômes et jusqu'à la phase chronique (Benson *et al.*, 2015 ; Wang *et al.*, 2017). De même, une diminution de la coordination motrice par le test rotarod a été observée lors de la phase chronique mais pas au cours de la phase aiguë (Olechowski *et al.*, 2009 ; Wang *et al.*, 2017). Olechowski *et al.* se sont intéressés à l'étude de l'influence de la source de la MOG sur la nature des symptômes dans ce modèle d'EAE. Ils ont montré qu'une référence de MOG (MOG<sub>35-55</sub>, PeptideSynthesis Facility, University of Calgary, Calgary AB) était capable d'induire une diminution de la coordination motrice dès la période d'apparition des symptômes, alors que pour la seconde référence (MOG<sub>35-55</sub>, AnaSpec Inc, San Jose, CA) la diminution a lieu au cours de la phase chronique (Olechowski *et al.*, 2009). Des données similaires ont été retrouvées au cours de l'étude de Seo *et al.* 2016, pour laquelle la

comparaison de plusieurs références de MOG<sub>35-55</sub> produites par divers fournisseurs a mis en évidence plusieurs décours temporels et sévérités de la maladie (**Sao et al., 2016**).

D'après Olechowski et al. (2009), ce modèle développe lors de la phase pré-symptomatique et lors de l'apparition des symptômes moteurs une allodynie mécanique, une allodynie au froid mais pas d'altération de la sensibilité au chaud. Au pic des symptômes, une hyposensibilité mécanique et thermique au chaud est observée ainsi qu'une normalisation de l'allodynie au froid. Au cours de la phase de récupération, un retour au niveau basal de la sensibilité mécanique et thermique au chaud et une réapparition de l'allodynie au froid sont observés (**Olechowski et al., 2009**). Il est très probable que l'absence de troubles sensitifs lors du pic symptomatique soit due aux troubles moteurs importants à ce moment de la maladie.

En conclusion, même si les protocoles d'immunisation utilisés sont parfois très proches les uns des autres, la sévérité des symptômes peut différer de manière notable. Une cause potentielle de cette variabilité est l'origine du peptide de myéline utilisé comme antigène, comme cela a été montré dans les études menées par **Olechowski et al., 2009** et **Seo et al., 2016**.

Tableau 15 : Etudes précliniques ayant évalué les troubles sensitifs dans les modèles murins d'EAE chronique à poussée unique (EAE-CP)

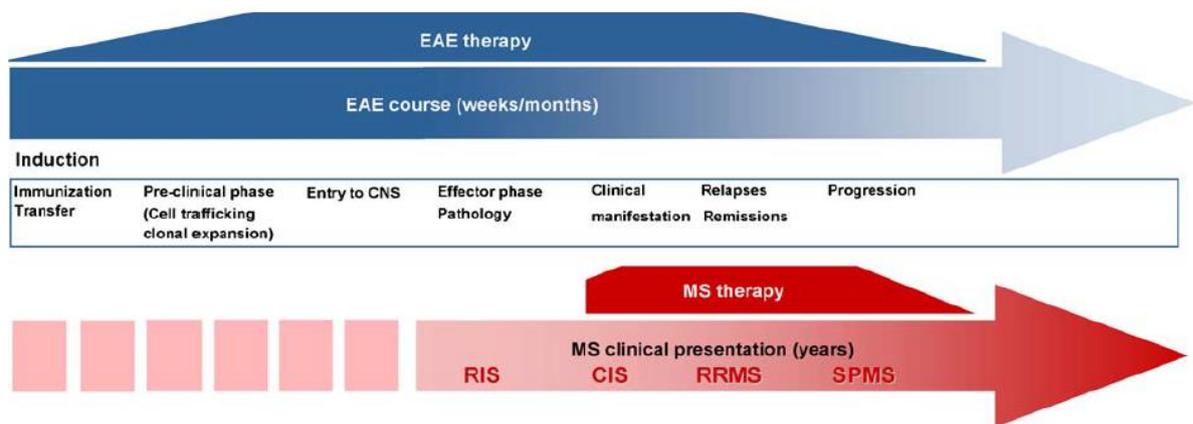
Référence bibliographique	Fond génétique	Sexe	Âge (Semaines)	Protocole d'immunisation	Troubles sensitifs
Aicher <i>et al.</i> , 2004	SJL	F/M	6-8	150 µg PLP <sub>139-151</sub> 1mg/mL CFA	Hypoalgésie thermique au chaud au pic des symptômes, aux phases de récupération et chronique.
Rodrigues <i>et al.</i> , 2009; 2016	C57BL/6J	F	8-10	100 µg MOG <sub>35-55</sub> 4 mg/mL CFA 2x300 ng PTX	Allodynie mécanique à la phase pré- symptomatique et à la phase d'apparition des symptômes.
Olechowski <i>et al.</i> , 2009; 2010; 2013	C57BL/6J	F	10-12	50 µg MOG <sub>35-55</sub> 5 mg/mL CFA 2x300 ng PTX	2009: Allodynie mécanique aux phases pré- symptomatique, d'apparition des symptômes et de récupération. Alors qu'une hyposensibilité mécanique est observée au pic des symptômes. Allodynie au froid aux phases pré-symptomatique, d'apparition et de pic des symptômes, ainsi qu'à la phase de récupération. 2010 et 2013: Allodynie mécanique aux phases pré- symptomatique et de récupération des symptômes.
Warwick <i>et al.</i> , 2014	C57BL/6J	F	6-8	250 µg MOG <sub>35-55</sub> 0.5 mg/mL CFA 2x350 ng PTX	Allodynie mécanique à la phase pré- symptomatique et à la phase de récupération des symptômes.
Benson <i>et al.</i> , 2015	C57BL/6J	F	10-12	50 µg MOG <sub>35-55</sub> 0.5 mg/mL CFA 2x300 ng PTX	Allodynie mécanique à la phase d'apparition des symptômes.
Potter <i>et al.</i> , 2016	C57BL/6J	F	10-12	50 µg MOG <sub>35-55</sub> 0.5 mg/mL CFA 2x300 ng PTX	Allodynie mécanique à la phase d'apparition des symptômes.
Yousuf <i>et al.</i> , 2017	C57BL/6J	F	10-12	50 µg MOG <sub>35-55</sub> 0.5 mg/mL CFA 2x300 ng PTX	Allodynie mécanique à la phase d'apparition des symptômes.
Wang <i>et al.</i> , 2017	C57BL/6J	F	8-12	100 µg MOG <sub>35-55</sub> 4 mg/mL CFA 2x200 ng PTX	Allodynie mécanique à la phase de récupération et au phase chronique .
Rahn <i>et al.</i> , 2014	C57BL/6J	F	12-14	2x300 µg MOG <sub>35-55</sub> 5 mg/mL CFA 2x200 ng PTX	Allodynie mécanique aux phases d'apparition et de pic des symptômes. Allodynie au froid aux phases pré-symptomatique, d'apparition et de pic des symptômes.

#### 4. Limites des modèles EAE

*Pour revue : Procaccini et al., 2015*

Les limites du modèle de l'EAE résident principalement dans les différences de pathogenèse par rapport à celle de la SEP. Certaines limites peuvent être ainsi soulignées :

- L'évolution de la maladie au cours du temps : en effet, dans le modèle animal, l'initiation et l'évolution temporelle des symptômes diffèrent de ce qui est observé en clinique. Chez l'Homme, la maladie est très probablement initiée plusieurs années avant le début des manifestations cliniques, alors que les symptômes dans les modèles EAE sont détectés dans les semaines, voire même les jours qui suivent l'induction de la maladie (**Figure 33**).



**Figure 33 : Représentation chronologique des décours temporels physiopathologique et clinique de la sclérose en plaques et de l'encéphalomyélite auto-immune expérimentale**

Dans l'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE), le déroulement temporel complet de la maladie en prenant en compte la phase pré-symptomatique est identifiable et les interventions thérapeutiques peuvent débuter très précocement y compris en préventif. La situation est bien différente dans la sclérose en plaques (SEP) où les premiers signes radiologiques restent en général non identifiés et où les traitements ne sont initiés qu'à l'apparition des premiers signes cliniques et même après.

CIS : Syndrome cliniquement isolé

RRMS : SEP récurrente-rémittente

CNS : Système nerveux central

SPMS : SEP secondairement progressive

RIS : Syndrome radiologiquement isolé

**Extrait de Mix et al., 2010**

- L'homogénéité des fonds génétiques : les modèles murins utilisés et notamment les souris ont des fonds génétiques très homogènes comparés à l'hétérogénéité génétique observée chez l'Homme (**Mix et al., 2010**).
- Il existe des différences entre les systèmes immunitaires humain et murin ainsi qu'entre les systèmes nerveux humain et murin (**Mix et al., 2010**).

- L'EAE est une maladie affectant principalement la substance blanche de la moelle épinière, alors que la SEP est principalement une maladie du cerveau avec une démyélinisation importante du cortex cérébral et cérébelleux. Malheureusement, très peu d'études ont analysé l'implication du cortex dans l'EAE.
- Le modèle EAE fournit très peu d'informations sur la progression de la maladie. En effet, les modèles EAE ont montré un intérêt notable dans le développement des traitements immunomodulateurs et immunosuppresseurs actuellement commercialisés pour le traitement de la SEP-RR (**Ridge et al., 1985 ; Rice et al., 2005 ; Steinman and Zamvil, 2006**) mais les connaissances sur l'évolution progressive de la maladie restent dérisoires.

A cause de l'ensemble de ces limitations, plusieurs études ayant travaillé avec ces modèles EAE pour essayer de déterminer les effets bénéfiques potentiels de certains facteurs de croissance, de facteurs de survie neuronale ou encore de facteurs de différenciation n'ont pas réussi à reproduire leurs résultats positifs (**Oliver et al., 2003**). De même, plusieurs autres approches thérapeutiques prometteuses chez les souris se sont révélées inefficaces voire même nocives chez l'Homme (**Steinman and Zamvil, 2006 ; Mehl et al., 2011**). Le tableau ci-dessous (**Tableau 16**) résume quelques exemples marquants d'échec de validation clinique pour des traitements ayant montré une grande efficacité chez les souris.

**Tableau 16 : Thérapies testées en clinique sans effet notable sur les symptômes de la sclérose en plaques (Extrait de Mix et al., 2010)**

Therapy	Results in MS patients	References
Anti-TNF- $\alpha$ mAb infliximab	Increased MRI activity	van Oosten et al. (1996)
Anti-CD3 and anti-CD4 antibodies	No significant clinical effect	Wiendl and Hohlfeld (2002)
Anti-CD28 mAb TGN-1412	Cytokine storm causing multiple organ failure	Hünig (2007)
Altered peptide ligands	Anaphylactic reactions and exacerbation of MS	Bielekova et al. (2000), Kappos et al. (2000)
Oral tolerogens	No significant clinical effect	Faria and Weiner (2006)
Sulfasalazine	Only transient clinical effect	Noseworthy et al. (1998)
Linomide	Cardiopulmonary toxicity	Noseworthy et al. (2000)

Enfin, il est important de rappeler et de noter qu'un seul modèle animal ne peut refléter toute la complexité de la SEP et qu'à l'heure actuelle il existe surtout un manque des modèles de forme progressive de la maladie.



***Partie 2 : Matériels et Méthodes***



## I. Caractérisation de l'extrait de pépins de raisin

### 1. Matériel végétal : Poudre de pépins de raisin

La poudre de pépins de raisin est obtenue à partir de grappes de raisin de l'espèce *Vitis Vinifera*, variété *Carignon* du nord de la Tunisie. Les pépins ont été récupérés à partir des résidus de vinification de la coopérative vinicole Ceptunes (Grombalia, Gouvernorat de Nabeul). Ils ont été séparés du reste du marc de raisin, séchés à l'air libre et à l'abri de la lumière puis broyés jusqu'à l'obtention d'une poudre fine. Cette poudre a été conservée dans des flacons en verre hermétiquement fermés et conservés à l'obscurité et à température ambiante.

### 2. Extraction des composés phénoliques

L'extraction des polyphénols à partir de la poudre de pépins de raisin a été réalisée par dissolution de 1g de poudre sèche dans 20 mL d'éthanol 10% à l'obscurité. Après une agitation vigoureuse à l'aide d'un vortex, suivie de 3 min de sonication, le mélange a subi une centrifugation à 10 000 rpm pendant 15 min à 4°C. Le surnageant obtenu a été filtré à travers un papier Whatman no. 4 et conservé +4°C pour la réalisation des différentes manipulations.

### 3. Calcul du rendement massique

Après évaporation totale du solvant sous vide à 45°C à l'aide d'un rotavapeur (Büchi® rotary evaporator Model R-205) pour l'actétate d'éthyle et à l'aide d'un lyophilisateur (CHRIST®, alpha 1-2 LSCbasic) pour le cyclohexane et la fraction aqueuse, le rendement massique en matière sèche (R%) a été calculé selon la formule suivante :

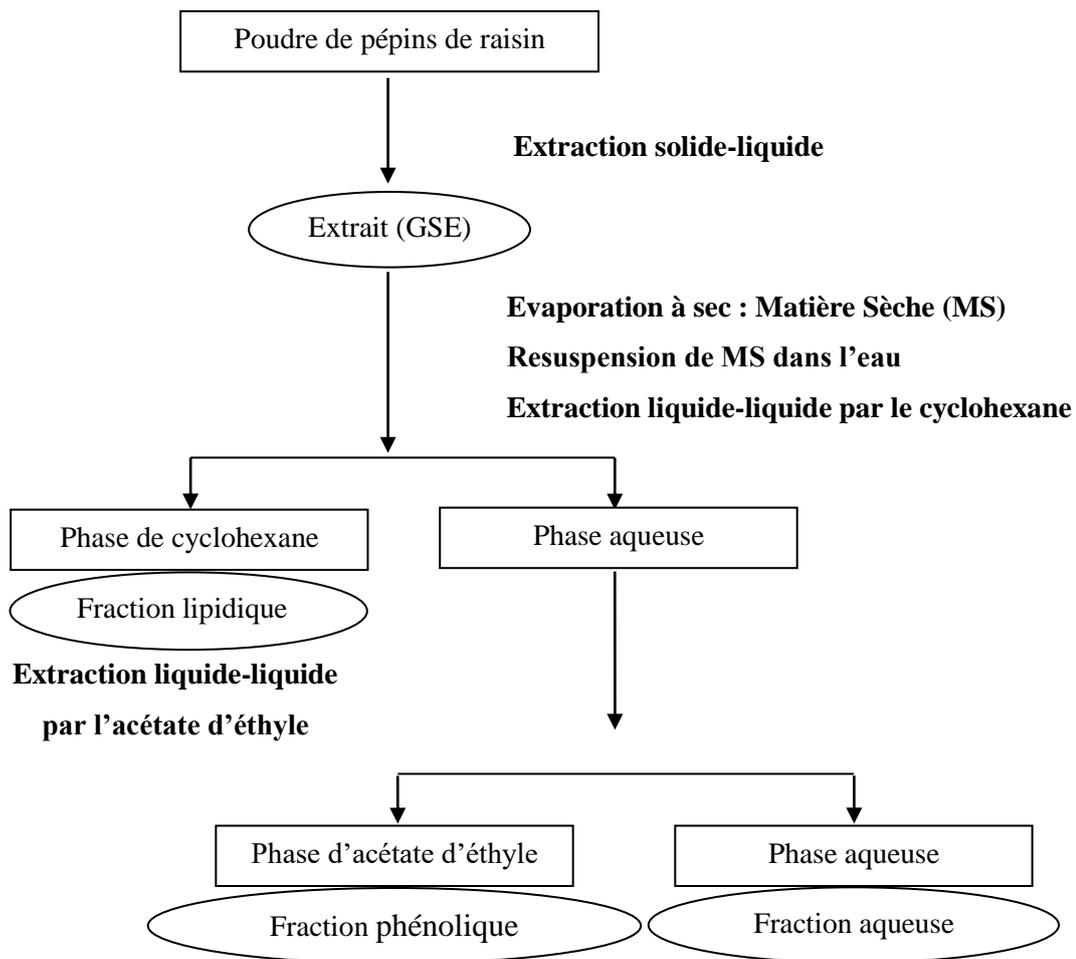
$$R (\%) = M/Mo * 100$$

- ❖ R (%) : Rendement exprimé en %
- ❖ M : Masse de la matière sèche obtenue après évaporation (en gramme)
- ❖ Mo : Masse de la poudre utilisée (en gramme)

### 4. Fractionnement de l'extrait de pépins de raisin

Le fractionnement du GSE a été réalisé après une extraction liquide-liquide répétée trois fois. En effet, 1g de la poudre de pépins de raisin a été dissout dans 50 mL d'eau distillée. Après agitation magnétique durant 30 min, l'extraction des lipides a été faite par l'ajout de 10 mL de cyclohexane. Après une agitation de 24 h à température ambiante, le mélange obtenu a subi une décantation pendant 30 min. Il y a alors apparition de deux phases, l'une aqueuse et l'autre organique contenant les lipides dissous dans le cyclohexane. Après récupération de la phase organique, nous avons ajouté à la phase aqueuse 5 mL de cyclohexane.

De même, le mélange obtenu a subi une agitation pendant 2 h à température ambiante suivie d'une nouvelle étape de décantation de 30 min. La dernière opération d'extraction dans la phase aqueuse a ensuite été répétée en ajoutant 5 mL (Vf=20 mL de cyclohexane). A la fin de l'extraction, nous avons récupéré la phase organique contenant les lipides et nous avons ajouté à la phase aqueuse restante le solvant d'extraction des polyphénols qui est l'acétate d'éthyle tout en suivant les mêmes étapes d'extraction pour les lipides. Les étapes d'extraction ont été résumées dans la figure suivante (**Figure 34**).



**Figure 34 : Protocole de préparation des différentes fractions**

Chaque phase obtenue a subi une évaporation (rotavapeur pour l'acétate d'éthyle ou lyophilisateur pour le cyclohexane et l'eau) et le pourcentage de chaque fraction est calculé selon la formule suivante :

$$F \% = M/M_0 * 100$$

F% : Fraction exprimée en % avec :

FL% : Fraction lipidique ; FP % : Fraction de polyphénols et FA% : Fraction aqueuse

M : Masse de la matière sèche obtenue après évaporation du solvant (en gramme)

Mo : Masse de matière sèche initialement dissoute(en gramme)

### 5. Dosage des polyphénols totaux, flavonoïdes totaux et tanins condensés

Tous les dosages ont été effectués par des méthodes spectrophotométriques en utilisant les standards adéquats et ont été faits en triplicate.

Le dosage des polyphénols totaux a été effectué selon la méthode adaptée de **Singleton and Rossi, (1965)**, en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu. Ce réactif est un acide de couleur jaune constitué d'un mélange d'acide phosphotungestique ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ) et d'acide phosphomolybdique ( $H_3PMoO_{40}$ ), qui sont réduits lors de l'oxydation des polyphénols en un mélange d'oxydes de tungstène ( $W_8O_{23}$ ) et de molybdène ( $MO_8O_3$ ) bleu. Ainsi, les produits formés présentent un maximum d'absorbance à 760 nm dont l'intensité est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans l'extrait. Brièvement, 125  $\mu$ L de GSE à la concentration de 1mg/mL ont été dissouts dans 500  $\mu$ L d'eau distillée et 125  $\mu$ L de réactif de Folin-Ciocalteu. Après agitation rapide et une incubation de 5 min, 1250  $\mu$ L de carbonate de sodium  $Na_2CO_3$  ont été ajoutés(7 g/100 mL). Après incubation pendant 2h à température ambiante et à l'obscurité, l'absorbance à 760 nm a été mesurée.

Le dosage des flavonoïdes totaux est basé sur un test colorimétrique utilisant le trichlorure d'aluminium ( $AlCl_3$ ) (**Dewantoet al., 2002**). Ce réactif forme des complexes acides stables avec les atomes d'oxygène présents sur les carbones 4 et 5 des flavonoïdes qui absorbent à 510 nm. Brièvement, 1 mL de GSE à la concentration de 1 mg /mL a été mélangé avec 1 mL de solution de nitrite de sodium ( $NaNO_2$ ; 2 %) et 150  $\mu$ L d' $AlCl_3$  (10 %). Après 5 minutes, 0,5 mL de solution d'hydroxyde de sodium ( $NaOH$ ; 1 M) a été ajouté. Le volume final a été ajusté à 2,5 mL avec de l'eau distillée, soigneusement mélangé et l'absorbance a été déterminée à 510 nm.

Le principe de la méthode de dosage des tanins condensés repose sur la fixation du groupement aldéhydique de la vanilline sur le carbone C-6 du cycle A de la catéchine pour former un complexe chromophore rouge qui absorbe à 500 nm (**Price et al., 1977**). Brièvement, 1mL de GSE de concentration de 1mg/mL a été mélangé avec 3 mL de vanilline (4 %) et 1,5 mL de HCl pur et l'absorbance mesurée à 500 nm après 15 min d'incubation à température ambiante et à l'obscurité.

Tous les dosages ont été réalisés dans des cuves en quartz en utilisant le spectrophotomètre UV-visible SmartSpec 3000 Bio-Rad (Laboratoires Bio-Rad, Allemagne).

## 6. Détermination de l'activité antioxydante *in vitro* de l'extrait de pépins de raisin

L'activité antioxydante totale du GSE a été évaluée par la méthode utilisant le phosphomolybdène décrite par **Prieto *et al.*, 1999**. Cette technique est basée sur la réduction de l'oxyde de molybdène (VI) présent sous la forme d'ions molybdate  $\text{MoO}_4^{2-}$  en molybdène(V)  $\text{MoO}^{2+}$  conduisant à la formation d'un complexe vert de phosphate à pH acide qui absorbe à 695 nm. Brièvement, un volume de 0,1 mL d'extrait (de concentration de 1 mg/mL) ou standard (acide ascorbique préparé dans du méthanol) a été mélangé à 1,5 mL de mélange réactionnel contenant 0,5 mL d'acide sulfurique (0,6 M), 0,5 mL de phosphate de sodium (28 mM) et 1 mL de molybdate d'ammonium (4 mM). Les tubes ont ensuite été incubés à 95°C pendant 90 min. Après refroidissement, l'absorbance est mesurée à 695 nm. L'activité antioxydante totale est déduite à partir de l'équation de régression de la courbe d'étalonnage de l'acide ascorbique qui représente la variation de l'absorbance à 695 nm en fonction de la concentration ( $R^2 = 0,97$ ). Ainsi, elle est exprimée en microgramme d'équivalent d'acide ascorbique par milligramme de matière sèche ( $\mu\text{g EAA}/\text{mg MS}$ ).

L'activité de piégeage du radical DPPH est mesurée selon le protocole décrit par **Hanato *et al.*, 1988**. En présence des piègeurs de radicaux libres, le DPPH de couleur violette se réduit en 2,2 Diphényle-1-Picryl-Hydrazine de couleur jaune qui absorbe à 517 nm. Brièvement, 1,5 mL d'une solution méthanolique de DPPH (0,2 mM) a été ajouté à 2 mL de GSE de concentration de 1 mg/mL. Après une période d'incubation de 30 min à température ambiante, l'absorbance a été mesurée contre un blanc à 517 nm. Le pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH (% IP) a été calculé comme suit :

$$\text{IP \%} = [(A_{\text{blanc}} - A_{\text{échantillon}}) / A_{\text{blanc}}] \times 100$$

Avec :  $A_{\text{blanc}}$  : Absorbance de la réaction de contrôle

$A_{\text{échantillon}}$  : Absorbance en présence d'extrait de GSE.

La concentration inhibitrice 50% a été calculée à partir la courbe de régression de différentes concentrations des extraits en fonction du pourcentage d'inhibition. Le hydroxytoluène butylé (BHT) a été utilisé comme contrôle positif.

En plus de l'activité antioxydante totale et du test au DPPH, nous avons eu recours à deux autres méthodes pour l'évaluation de l'activité antioxydante *in vitro* du GSE, à savoir le test de chélation du fer et le test de réduction du fer (FRAP).

La capacité chélatrice est déterminée selon la méthode de **Zhao *et al.*, 2006**. Le principe de la méthode repose sur l'inhibition de la formation du complexe  $\text{Fe}^{2+}$ /Ferrozine après traitement des échantillons avec les ions  $\text{Fe}^{2+}$ . Le complexe formé absorbe à 562 nm.

Brièvement, le mélange réactionnel contenant 0,1 mL de GSE (de concentration 1mg/mL) et 0,05 mL de FeCl<sub>2</sub> (2 mmol/L) a été incubé pendant 5min à température ambiante et à l'obscurité puis la réaction a été initiée en ajoutant 5 mM de ferrozine (0,1 mL) en ajustant le volume total à 3 mL avec de l'eau distillée. Après une agitation vigoureuse et une incubation pendant 10 min à température ambiante, l'absorbance a été mesurée à 562 nm et l'activité de chélation des métaux calculée comme suit :

$$\text{Activité de chélation du fer (\%)} = [A_{\text{blanc}} - A_{\text{échantillon}}] / A_{\text{blanc}} \times 100$$

Avec :  $A_{\text{blanc}}$  : Absorbance de la réaction du contrôle

$A_{\text{échantillon}}$  : Absorbance en présence d'extrait de GSE

La concentration chélatrice 50% a été déduite à partir du graphique exprimant le pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration d'extrait. L'éthylènediaminetétraacétique (EDTA) a été utilisé comme contrôle positif.

**Le test FRAP** a été réalisé selon la méthode de **Barreira *et al.*, 2008**, basée sur la réduction du fer ferrique (Fe<sup>3+</sup>) présent dans le complexe ferricyanure de potassium (K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>) en fer ferreux (Fe<sup>2+</sup>). La réaction est révélée par le virement de la couleur jaune de Fe<sup>3+</sup> en bleu vert du Fe<sup>2+</sup> et l'intensité de la coloration est mesurée par spectrophotométrie à 700 nm. En effet, l'augmentation de l'absorbance dans le milieu réactionnel indique l'augmentation de la réduction du fer. Brièvement, 1 mL de GSE à la concentration de 1mg/mL a été mélangé avec 2,5 mL de tampon phosphate de sodium (200 mmol/L, pH = 6,6) et 2,5 mL de ferricyanure de potassium à 1% puis incubé à 50°C pendant 20 min. Après addition de 2,5 mL d'acide trichloroacétique (TCA ; 1%) suivi de 5 mL d'eau distillée et de 1 mL de 0,1% de chlorure ferrique (incubation 5 min), l'absorbance a été déterminée à 700 nm. L'activité réductrice du fer a été calculée à partir de la courbe de contrôle préparée à partir de l'acide ascorbique.

## 7. Identification des composés de l'extrait de pépins de raisin par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse

Au cours de notre étude, nous nous sommes intéressés à déterminer la composition de chaque fraction du GSE grâce à la technique de chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG-SM).

Les compositions des phases phénoliques et aqueuses ont été déterminées selon les protocoles décrits par **Erbing *et al.*, 1995** en y introduisant quelques modifications. Brièvement, 0,45 mg des fractions lyophilisées ont été hydrolysées par 1 mL de TCA (2 M) à 70°C pendant 2 h dans un tube scellé sous atmosphère d'azote. Les composés libérés ont été convertis en leurs dérivés triméthylsilyl en ajoutant 100 µL de pyridine et 100 µL de N,O-bis (triméthylsilyl)-

trifluoroacétamide (BSTFA) à l'échantillon séché selon la méthode utilisée par **Guentas *et al.*, 2001**. Pour la phase lipidique, les extraits ont été méthylés avec du méthylate de sodium dans du méthanol selon la méthode décrite par **Visioli *et al.*, 1993**.

Tous les échantillons ont été analysés par CPG-SM (Agilent, MSD inerte 5975C avec son Détecteur à Triple Axe, Allemagne). Brièvement, 1 µL d'échantillon silylé a été injecté par l'intermédiaire d'un injecteur fendu (250 °C, rapport de partage de 20:1, débit fractionné de 18 mL/min), dans une colonne HP-5 ((5 % phényl)-méthylpolysiloxane) 30 m, 0,25 mm, 0,25 µm). La température initiale de la colonne de 150°C (1 min) a été augmentée à 180°C à raison de 1°C/min, de 180 à 250°C à 2°C/min et de 250°C à 300°C à 15°C/min (maintenue pendant 10 min). La source d'ions du spectromètre de masse (impact électronique) a été réglée à 250°C, le gaz porteur est l'Hélium N60 (1 mL/min). La condition du détecteur est de 70 eV. Les températures utilisées sont de 150°C pour le MS Quad, 230°C pour la source de la MS et 250°C pour la ligne de transfert.

## **II. Induction de l'encéphalomyélite autoimmune expérimentale et traitement curatif précoce à l'extrait de pépins de raisin**

### **1. Animaux**

Toutes les expérimentations ont été réalisées conformément à la Directive 2010/63/UE du Parlement européen et du Conseil du 22 septembre 2010 relative à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques et son application dans la loi française (Décret n° 2013-118 du 1er février 2013) avec l'approbation du comité d'éthique local (APAPIS-4306). Elles étaient également conformes aux directives éthiques de l'Association Internationale pour l'Etude de la Douleur (**Zimmerman *et al.*, 1983**) et aux directives ARRIVE sur la norme de notification pour les études précliniques (**Kilkenny *et al.*, 2010**).

Soixante douze souris femelles C57BL/6J âgées de 6 semaines au moment de l'induction ont été utilisées au cours de cette étude (Janvier Labs, le Genest Saint Isle, France). Les souris ont été stabulées à l'animalerie à six par cage (3 CTL et 3 EAE) dans un environnement à température contrôlée (22°C ± 2°C) sous un cycle lumière/obscurité de 12h (lumière de 7h00 à 19h00), avec l'accès à la nourriture et à l'eau *ad libitum*. Une adaptation d'au moins 7 jours aux conditions de l'animalerie a été réalisée avant le début de l'expérience.

### **2. Induction et évaluation de l'encéphalomyélite auto-immune expérimentale**

Suivant le protocole décrit par **Olechowski *et al.*, 2009**, les souris EAE ont été immunisées à l'aide d'un mélange contenant 50 µg de MOG<sub>35-55</sub>(M4939, Sigma Aldrich, Darmstadt, Germany) dans 100 µL de CFA (1 mg/mL) (F5881, c) au niveau de la base du cou et du bas

du dos. Une injection intrapéritonéale (i.p) de 300 ng de PTX (P7208, Sigma Aldrich, Darmstadt, Germany) dissoute dans 200  $\mu$ L de NaCl 0,9% à également été réalisée le jour de l'immunisation (J0) avec un rappel 48h plus tard (J2). Les souris contrôle (CTL) ont reçu une injection de CFA (0,5 mg/mL) et de PTX (300 ng) seuls. Les souris ont été injectées par un expérimentateur indépendant (Mélina BEGOU, MB) différent de celui ayant réalisé le reste de l'étude (Maha MABROUK, MM) pour éviter les biais expérimentaux.

Le score clinique et le poids corporel des souris ont été déterminés quotidiennement. Pour le score clinique, l'échelle de points établie par **Olechowski *et al.*, 2009** a été utilisée, définissant la notation suivante : Grade 0 : souris normale, grade 1 : queue flasque, grade 2 : faiblesse légère des membres postérieurs avec réflexe rapide, grade 3 : faiblesse sévère des membres postérieurs avec réflexe lent, grade 4 : paralysie de l'un ou des deux membres postérieurs. Cette échelle de points permet de surveiller et d'enregistrer les changements comportementaux et physiques graduels qui se sont produits au cours de l'étude. L'apparition des signes cliniques est considérée comme significative si le score clinique est  $\geq 1$ . Les scores cliniques ont été évalués en aveugle.

### 3. Traitement curatif précoce

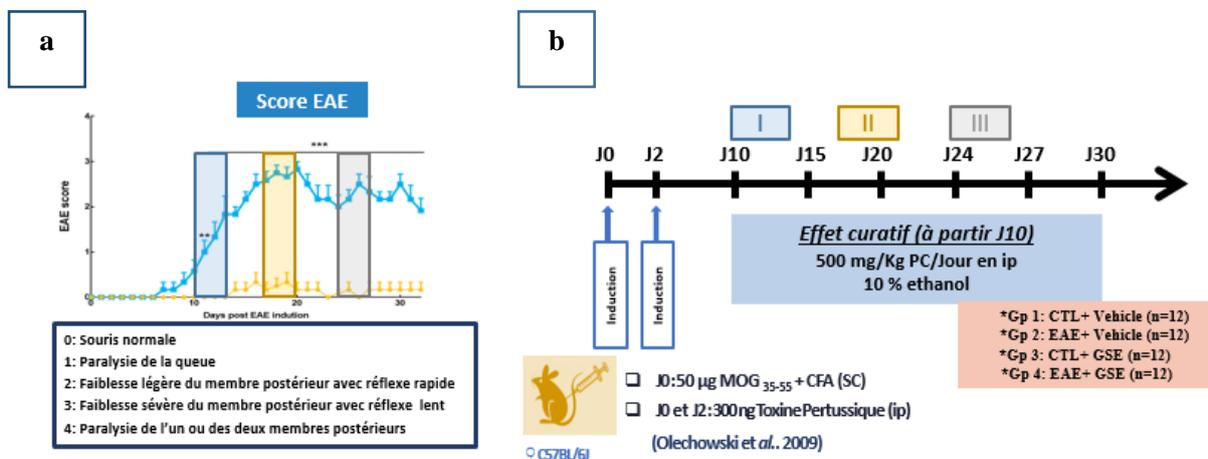
L'extraction des polyphénols à partir du GSE a été réalisée après dissolution de 400 mg de poudre sèche dans 8 mL d'éthanol à 10% (w/2v) à l'obscurité. Après une agitation vigoureuse à l'aide d'un vortex et une sonication de 3 min, le mélange a été centrifugé à 4 100 rpm, 15 min à 4°C et le surnageant obtenu contenant les polyphénols solubles a été récupéré et utilisé pour le traitement.

Le traitement curatif précoce par le GSE a débuté au jour 10 post-immunisation (J10) jusqu'à J30. Chaque jour, les souris traitées au GSE ont reçu une injection intrapéritonéale de 200  $\mu$ L de surnageant fraîchement préparé correspondant à une dose de 500 mg/kg de poids corporel d'animal/jour (500mg/kg PC/J). En tant que contrôle, les souris véhicule ont reçu chaque jour une injection intrapéritonéale de 200  $\mu$ L d'une solution d'éthanol à 10% (**Figure 35a**). Cinq cohortes (groupes d'animaux immunisés en même temps et évalués avec les mêmes tests) ont été utilisées pour cette étude (4 pour l'évaluation comportementale et 1 supplémentaire pour les prélèvements biochimiques à D20). Chaque cohorte est composée de 12 souris CTL et 12 souris EAE réparties au hasard en 4 groupes de 6 animaux : CTL + véhicule, EAE + véhicule, CTL + GSE et EAE + GSE.

### III. Etude comportementale

Pour l'étude comportementale, les souris EAE et CTL ont été testées pendant les différentes phases de développement de la pathologie, à savoir la phase pré-symptomatique (J10-J12), le pic de la maladie (J17-J19) et la phase chronique de la maladie (J24-J26), à l'exception du test de von Frey pour lequel les souris ont été évaluées tous les 2 à 4 jours (**Figure 35b**). Au cours des procédures comportementales, le nombre de tests pour chaque animal a été limité de 4 à 7 selon la sévérité des procédures imposées. De plus, pour prendre en considération la variabilité de l'induction de l'EAE (**Teuscher *et al.*, 2004 ; Olechowski *et al.*, 2009 ; Bittner *et al.*, 2014**), chaque évaluation comportementale a été réalisée dans deux cohortes différentes. C'est la raison pour laquelle, comme décrit ci-dessus, 4 cohortes de souris ont été nécessaires pour cette étude.

Tous les tests ont eu lieu durant la période de la journée entre 8h00 et 12h00 pour le test de von Frey, le test rotarod, le test de l'open field et le test de la grille, et entre 14h00 et 18h00 pour le test du labyrinthe en croix surélevé, le test de la plaque chaude, le test de labyrinthe en Y et le test de l'acétone sur la patte. Tout au long de l'étude, le score EAE et le poids corporel ont été évalués quotidiennement.



**Figure 35 : Protocole expérimental**

#### 1. Evaluation des troubles sensitifs

**L'allodynie mécanique** a été évaluée à l'aide du test de von Frey selon la méthode décrite par Dixon en 1980 et modifiée par Chaplan *et al.*, en 1994. Les souris ont été placées dans des boîtes en plastique individuelles (3,5 cm de long x 8 cm de large x 14 cm de haut) sur une plate-forme grillagée surélevée, permettant un accès complet aux pattes. Les souris ont été habituées au dispositif pendant 45 à 60 min avant le test. La stimulation a été appliquée en utilisant la méthode dite « *up and down* ». Des filaments de von Frey calibrés de 0,02 à 1,4 g

(Bioseb Aesthesio<sup>®</sup>, Chaville, France) ont été appliqués perpendiculairement à la plante de la patte arrière droite avec une force suffisante pour provoquer un léger ploiement du filament contre la patte pendant 3 à 5 s. Une réponse positive correspond à un retrait ou une secousse de la patte. Le niveau du seuil de retrait des pattes (PWT) a été déterminé comme décrit précédemment (Chaplan *et al.*, 1994).

**L'hyperalgésie au chaud** a été évaluée à l'aide du test de la plaque chaude (MacDonald *et al.*, 1946). Les souris ont été placées sur une surface métallique carrée chauffée à une température de 52°C ou 56°C (Modèle DS 37, Ugo Basile, Gemonio, Italie), et les latences d'apparition de la première réponse nociceptive sous forme de léchage, secousse de la patte arrière ou de saut, a été mesurée. Dès que la réponse nociceptive a été observée, la souris a été immédiatement retirée de la plaque chauffante. La validation des données nécessite l'obtention de deux latences stables (moins de 1 s de différence) avec un maximum de 4 essais réalisés par souris. Les données qui ne remplissent pas ce critère de validation ont été exclues. Des latences seuils de 30 s (pour 52°C) et 15 s (pour 56°C) ont été utilisées pour éviter les blessures aux pattes des animaux.

**L'allodynie au froid** a été évaluée à l'aide du test de l'acétone appliquée sur la patte, adapté de Chen *et al.*, 2018. Les souris ont été placées dans des boîtes individuelles en plastique (sur une plate-forme grillagée surélevée identiques à celle utilisée pour le test de von Frey), permettant un accès complet aux pattes. Avant la stimulation, les souris ont été habituées pendant 30 à 45 min. Une goutte (20 µL) d'acétone (Laboratoires humeau, La Chapelle-sur-Erdre, France) a été déposée sur la surface plantaire de la patte arrière (sans toucher la peau avec l'embout pipette) et l'ensemble des réponses observées pendant 60 s après application de l'acétone a été enregistré. Les réponses à l'acétone ont été notées selon un score pour chaque réponse selon l'échelle suivante : 0 : pas de réponse, 1 : retrait rapide, secousse unique de la patte, 2 : retrait prolongé, secousse prolongée ou répétée de la patte, 3 : léchage de la patte, 4 : saut. Le score nociceptif représente la somme de toutes les réponses évoquées pendant 60 s après l'application d'acétone. L'acétone a été appliquée en alternance 3 fois sur chaque patte arrière (gauche et droite). Parce que nous n'avons pas manipulé un côté particulier du SNC, une moyenne des scores des 6 applications a été calculée pour chaque souris.

## 2. Evaluation des troubles moteurs

**L'activité locomotrice spontanée** a été évaluée à l'aide du test en champ ouvert plus connu sous son nom anglais d'open field. Les souris ont été placées au centre d'une arène carrée en polychlorure de vinyle (PVC) blanc (50 cm de long x 50 cm de large x 45 cm de haut) et se

sont déplacées librement pendant 15 min en étant filmées par une caméra fixée au plafond. Des zones virtuelles ont été tracées dans l'arène, dont un carré central de 30 cm de long et une zone périphérique, et les déplacements ont été suivis grâce au logiciel de suivi des déplacements (VideoTrack, Viewpoint, Lyon, France). La distance totale parcourue et le temps passé dans la zone centrale pendant 15 min ont été déterminés à l'aide du même logiciel.

**La coordination motrice** a été déterminée en utilisant le test du rotarod (TSE, Hombourg Allemagne). Nous avons utilisé les modes opératoires normalisés décrits par le groupe EUMORPHIA (Mandillo *et al.*, 2008). Brièvement, après une phase d'apprentissage et d'habituation permettant d'identifier les souris capables de rester pendant 60 s sur un cylindre tournant à une vitesse de 4 rpm, la phase de test a été réalisée. Elle consistait en 4 essais (T1-T4, espacés de 15 min) au cours desquels les souris étaient placées sur un cylindre tournant à 4 rpm. Le programme de rotation était alors déclenché provoquant une accélération progressive du cylindre de 4 à 40 rpm sur une période de 300 s. Pour chaque souris, la latence de chute du cylindre a été déterminée automatiquement. Cependant, le chronomètre pouvait être arrêté manuellement si une souris s'accrochait au cylindre en effectuant une rotation complète (« rotation passive ») pour éviter de tomber.

### 3. Evaluation des troubles cognitifs

**La mémoire de travail** a été évaluée lors du test du labyrinthe en Y selon la procédure opératoire standard décrite par le groupe EUMORPHIA (Mandillo *et al.*, 2008). L'appareil est composé de 3 bras égaux (40 cm de long x 10 cm de large x 16 cm de haut) en chlorure de polyvinyle (PVC) noir rayonnant à 120° l'un de l'autre en forme d'Y. Les souris ont été placées à l'extrémité d'un bras, face à la paroi fermée du bras, et se sont déplacées librement dans le labyrinthe pendant 10 min. La latence nécessaire pour sortir du premier bras, le nombre total et la séquence des entrées dans chaque bras ont été notés pour chaque souris. Une entrée dans un bras a été comptabilisée lorsque la souris mettait les quatre pattes à l'intérieur du bras. Toutes les souris ayant réalisé moins de 8 entrées dans des bras au cours des 10 min de test ont été exclues des résultats. Une alternance a été définie comme la séquence d'entrées dans les 3 différents bras sur 3 entrées consécutives. Le score d'alternance (%) représente un indice de mémoire de travail et a été calculé comme suit :

$$\% \text{ Alternance} = 100 \times [\text{Nombre d'alternances} / (\text{Total des entrées de bras} - 2)]$$

**L'anxiété** a été évaluée à l'aide du labyrinthe en croix surélevé (EPM) qui évalue le conflit naturel entre la tendance des souris à explorer un nouvel environnement et celle à éviter une

zone ouverte, surélevée et bien éclairée dite anxiogène (**Rodgers and Dalvi, 1997**). L'EPM comprend 2 bras ouverts et 2 bras fermés (37 cm de long x 6 cm de large) qui partent d'une plate-forme centrale en forme de croix (6 cm x 6 cm). L'appareil est construit en plexiglas noir (sol et murs) et est surélevé à 50 cm du sol. Les souris ont été placées au niveau de la plateforme centrale, face à l'un des bras fermés, et ont exploré le labyrinthe pendant 10 min. Le nombre d'entrées dans les bras ouverts, le temps passé dans les différentes parties du labyrinthe (bras ouverts *vs* bras fermés et plateforme centrale) et le nombre total d'entrées ont été déterminés grâce au logiciel de suivi des déplacements (VideoTrack, Viewpoint, Lyon, France). Toutes les souris ayant réalisées moins de 8 entrées dans des bras au cours des 10 min de test ont été exclues des résultats.

#### **IV. Etude biochimique**

##### **1. Prélèvement des tissus, extraction et dosage des protéines totales**

En utilisant deux cohortes différentes, les souris ont été sacrifiées à J20 (pendant le pic des symptômes) et à J30 (durant la phase chronique) ; les encéphales et les moelles épinières ont été rapidement prélevées et congelées dans de l'azote liquide puis conservées à -80°C. Lors de l'étude biochimique, pour chaque groupe, 6 échantillons de cerveau (télencéphale et diencéphale) et de moelle épinière ont été homogénéisés dans du tampon PBS à 4°C contenant un cocktail d'inhibiteurs des protéases (cOmplete Protease Inhibitor Cocktail tablets Roche) à l'aide d'un sonicateur à piston avec une en utilisant une fréquence de 20 kHz et à une amplitude optimale (Modèle Fisher brand™ 505, ThermoFisher Scientific, États-Unis). Chaque échantillon a reçu 3 cycles de sonication de 30 s séparés par un arrêt de 10 s afin d'éviter l'échauffement des tissus. Les homogénats obtenus ont été ensuite centrifugés 15 min, à 13 000 rpm, à 4°C et le surnageant obtenu a été divisé en aliquots et stocké à -80°C jusqu'à analyse.

La concentration en protéines des surnageants de cerveau et de moelle épinière a été déterminée selon le mode opératoire décrit par le fabricant du kit de dosage de protéines BCA (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, Massachusetts, USA), compatible avec les détergents qui est à base d'acide bicinchoninique. Ce dosage repose sur la formation d'un complexe protéique  $\text{Cu}^{2+}$  dans des conditions alcalines, suivie de la réduction du  $\text{Cu}^{2+}$  en Cu. L'acide bicinchoninique est un réactif colorigène hautement spécifique pour le Cu formant un complexe pourpre et ayant une absorption optique maximale à 562 nm. L'absorbance est proportionnelle à la concentration de protéines dans l'échantillon. La quantité de protéines

contenues dans chaque échantillon a été directement déterminée à partir d'une courbe d'étalonnage de la BSA.

## 2. Dosage des indicateurs du stress oxydant et des activités antioxydantes

### 2.1. Indicateurs du stress oxydant

#### 2.1.1. Lipoperoxydation des lipides par dosage du malondialdéhyde

La peroxydation lipidique a été évaluée par mesure du malondialdéhyde (MDA) basée sur la réaction de ce dernier avec l'acide thiobarbiturique (TBA) selon la méthode de **Draper *et al.*, 1990** avec quelques modifications. Brièvement, 137,5 µL d'homogénat tissulaire d'encéphale ou de moelle épinière, avec une concentration en protéines ajustée à 0,05 mg/mL, ont été mélangés directement dans une plaque 96 puits (Nunc-Immuno MicroWell) avec 8,3 µL de BHT 3,5 mM, 62,5 µL de la solution 50% TCA et 41,5 µL 1,25% (m/v) de TBA. La microplaque a été incubée à 60°C pendant 60 min, puis une fois la réaction arrêtée (5 min dans de la glace), l'absorbance du chromophore rose formé a été déterminée à 532 nm en utilisant un spectrophotomètre à microplaque UV-Visible (Epoch BioTek instruments, Agilent Technologies, États-Unis). Le 1, 3, 3-tétraméthoxypropane (TMP) (Sigma Aldrich, Darmstadt, Germany) a été utilisé comme standard pour la préparation de la gamme étalonnage (0 à 6 µM). Les concentrations en MDA ont été calculées et exprimées en nM/mg de protéines. Les essais pour chaque échantillon ont été réalisés 3 fois par le même expérimentateur et dans des conditions similaires.

#### 2.1.2. Carbonylation des protéines

L'oxydation des protéines a été évaluée en quantifiant la carbonylation des protéines dans le cerveau et la moelle épinière selon la méthode de **Levine *et al.*, 1990** avec quelques modifications. La teneur totale en protéines carbonylées a été déterminée en dérivant les adduits de protéines carbonylées avec du 2,4-dinitrophénylhydrazine (DNPH), qui forme un produit dinitrophénylhydrazine stable. Brièvement, 100 µL d'homogénat d'encéphale ou de moelle épinière (0,6 mg/mL de protéines) ont été mélangés avec 400 µL de solution de DNPH (10 mM dans 2,5 M HCl) pendant 1 h à 37°C dans l'obscurité sous agitation toutes les 10 min. Par la suite, les protéines ont été précipitées avec 250 µL de 30% de TCA. Le mélange a été centrifugé à 11.000 rpm, 5 min, à 4°C et le surnageant obtenu a été éliminé. L'excès de DNPH a été éliminé par 3 lavages successifs du culot en utilisant 500 µL d'une solution d'acétate d'éthyle/éthanol (1:1, v/v) et 3 centrifugations réalisées à 11.000 rpm, pendant 5 min, à 4°C. Le culot obtenu a été dissous dans 600 µL du phosphate de potassium 20 mM (pH 2,3) contenant 6 M de chlorure guanidine et l'absorbance a été déterminée à 375 nm en utilisant

unspectrophotomètre à microplaque UV-Visible (Epoch BioTek instruments, Agilent Technologies, États-Unis). La concentration a été déduite en utilisant le coefficient d'extinction molaire de  $22.000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  et les résultats ont été exprimés en nanomoles de résidus carbonylés par milligramme de protéine (nmol/mg de protéine). Les essais pour chaque échantillon ont été réalisés 3 fois par le même expérimentateur et dans des conditions similaires.

## **2.2. Activités des principales enzymes antioxydantes**

### **2.2.1. Activité de la superoxyde dismutase**

L'activité de la superoxyde dismutase (SOD, E.C.1.15.1.1) a été déterminée dans les surnageants d'homogénats d'encéphale ou de moelle épinière en utilisant le kit Sigma Aldrich (19160-1KT-F Sigma Aldrich, Darmstadt, Allemagne) selon les instructions du fabricant. Le sel de tétrazolium (WST-1) produit un colorant formazan soluble dans l'eau lors de la réduction avec l'anion superoxyde. Le taux de réduction avec un anion superoxyde est linéairement lié à l'activité de la xanthine oxydase (XO) et il est inhibé par la SOD. Par conséquent, l'activité d'inhibition de la SOD peut être déterminée par une méthode colorimétrique. Ainsi, le dosage de l'activité SOD a été réalisé dans une plaque à 96 puits (Nunc-Immuno MicroWell) et l'absorbance a été déterminée à 440 nm en utilisant un spectrophotomètre à microplaque UV-Visible (Epoch Bio-Tek instruments, Agilent Technologies, États-Unis). L'activité SOD a été exprimée en % d'inhibition. La SOD commerciale (Sigma Aldrich, Darmstadt, Germany) a été utilisée comme standard pour faire la courbe d'étalonnage (0 à 200 U/mL). Les essais pour chaque échantillon ont été réalisés 3 fois par le même expérimentateur et dans des conditions similaires.

### **2.2.2. Activité de la catalase**

L'activité catalase (CAT, E.C.1.11.1.6.) a été déterminée en mesurant la cinétique de disparition du  $\text{H}_2\text{O}_2$  à 240 nm à l'aide d'un spectrophotomètre JENWAY 7305 (Bibby Scientific, Cole Parmer Ltd, UK) pendant 3 mins (Aebi, 1984). Brièvement, 10  $\mu\text{L}$  de 1,25 mg/mL de protéine ont été mélangés avec 990  $\mu\text{L}$  de 33 mM de  $\text{H}_2\text{O}_2$  dans 50 mM de tampon phosphate pH 7 directement dans la cuve en quartz. La catalase commerciale (Sigma Aldrich, Darmstadt, Germany) a été utilisée comme standard pour la courbe d'étalonnage (0 à 600 U/mL). L'activité de la catalase est proportionnelle à la diminution de la densité optique (DO) à 240 nm. Les résultats ont été exprimés en mmol d' $\text{H}_2\text{O}_2$  consommé par min par mg de protéine (mmol  $\text{H}_2\text{O}_2$ /min/mg protéine). Les essais pour chaque échantillon ont été réalisés 3 fois par le même expérimentateur et dans des conditions similaires.

### 2.2.3. Activité de la glutathion peroxydase

L'activité glutathion peroxydase (GPx, EC.1.11.1.9) a été déterminée en mesurant la consommation de NADPH à 340 nm à l'aide d'un spectrophotomètre JENWAY 7305 (Bibby Scientific, Cole Parmer Ltd, UK) pendant 3 min selon la méthode de **Wendel, 1981** avec quelques modifications. Brièvement, 20 µL d'homogénat avec une concentration protéique ajustée à 1,25 mg/mL ont été mélangés avec du tampon de potassium 50 mM à pH=7 contenant 2,5 mM de NaN<sub>3</sub>, 2,5 mM d'EDTA, 2,5 mM de NADPH, 10 mM de GSH et 6 µU/mL de glutathion réductase. Après 1h d'incubation à 37°C, la réaction a été démarrée par l'ajout de 100 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,33 mM. La GPx commerciale (Sigma Aldrich, Darmstadt, Germany) a été utilisée comme standard pour faire la courbe d'étalonnage (0 à 0,25 U/mL). Les résultats ont été exprimés en mmol/min/mg protéine. Les essais pour chaque échantillon ont été réalisés 3 fois par le même expérimentateur et dans des conditions similaires.

## IV. Etudes protéiques

Les mêmes surnageants d'échantillons d'encéphale et de moelle épinière utilisés pour l'analyse biochimique du stress oxydant ont été utilisés pour déterminer l'expression protéique par western blot.

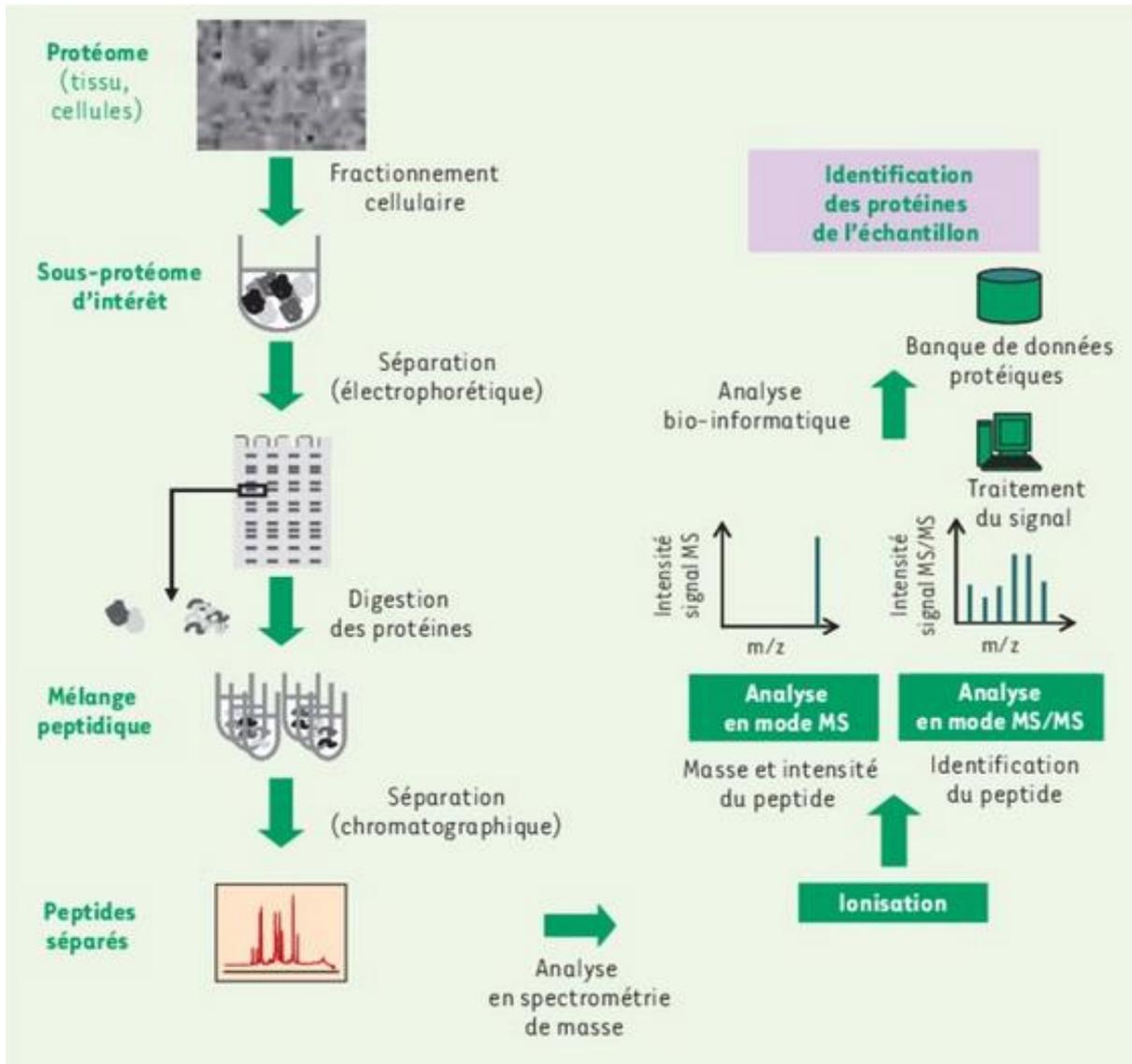
### 1. Western blot

Après 5 min de dénaturation des protéines dans du bleu de bromophénol/mercaptoéthanol à 95°C, 10 ou 30 µg de protéines de chaque échantillon (encéphale et moelle épinière) ont été soumis à une séparation SDS-PAGE sur des gels d'acrylamide à 10% (Bio-Rad, Laboratoires, Inc., Hercules, California, USA) puis transférés sur des membranes de nitrocellulose à l'aide d'un Trans-Blot Turbo transfer system (Bio-Rad, Laboratoires, Inc., Hercules, California, USA). Les membranes ont ensuite été bloquées dans une solution TBS avec 0,1% de Tween (TBS-T0,1 %) et 5 % (m/v) de lait écrémé en poudre ou 5% (m/v) d'albumine sérique bovine (BSA) pendant 1h30 min à température ambiante. Après cette étape qui permet de limiter les interactions non spécifiques entre les anticorps et la membrane, les membranes ont été incubées avec les anticorps primaires pendant une nuit à 4°C. Les anticorps primaires utilisés dans notre étude sont les suivants : anti-SOD1 (Thermo Fisher Scientific, MA1-105, 1/1000) ; anti-SOD2 (Systèmes R&D, MAB 3419, 1/3000) ; anti-CAT (Cell signalisation Technology, D5N7V, 1/1000) ; anti-GPX1 (Invitrogen, PA5-30593, 1/1000) ; anti-protéine acide fibrillaire gliale (GFAP) (Millipore, ab5804, 1/1000) ; anti-molécule adaptatrice de liaison au calcium ionisé 1 (Iba1) (Invitrogen, PA5-27436, 1/1000) ; anti-MBP (Millipore, MAB 384 , 1/500) ;

anti-CNPase (Millipore, MAB 326, 1/1000) ; anti-sirtuine 1 (SIRT1) (Ozyme Cell Signaling, 9475S, 1/500) ; anti-sirtuine 2 (SIRT2 , Ozyme Cell Signaling, 12650, 1/1000) ; anti-glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) (Sigma Aldrich, CB1001, 1/15000) ; anti- $\beta$ -tubuline (Cell Signaling Technology, 86298S, 1/1000) ; anti- $\alpha$ -tubuline (Cell Signaling Technology, 2144, 1/1000) et anti- $\beta$ -actine (Sigma Aldrich, A5441, 1/5000). Les membranes sont par la suite lavées 3 fois avec du TBS-T 0,1% puis incubées avec les anticorps secondaires conjugués à la peroxydase de raifort (« Horseradish Peroxydase » : HRP) de type anti-souris IgG (DAKO, P0447, Santa Clara, Californie, États-Unis, 1/5000) ou anti-lapin IgG (Cell Signaling Technology, 7074S, Danvers, Massachusetts, USA, 1/3000) pendant 90 min à température ambiante. Après 3 lavages de 10 min chacun avec du TBS-T 0,1%, les membranes ont été révélées en utilisant un substrat de chimiluminescence (Pico ou Clarity Western ECL Substrate, Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, Californie, USA). Les immunoblots ont été quantifiés à l'aide du système d'imagerie ChemiDoc Touch Gel (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, Californie, États-Unis) et quantifiés à l'aide du logiciel Image Lab (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, Californie, États-Unis). Les niveaux de protéines ont été normalisés par rapport au contrôle interne  $\beta$ -tubuline,  $\alpha$ -tubuline,  $\beta$ -actine ou GAPDH selon les expériences.

## **2. Etude protéomique**

La conception expérimentale des analyses protéomiques est la même que celle adoptée lors des analyses biochimiques et de western-blot. A J30 post-induction, 6 souris par groupe de traitement ont été sacrifiées, puis les encéphales et les moelles épinières ont été rapidement prélevés et congelés dans de l'azote liquide pour être conservés à  $-80^{\circ}\text{C}$  jusqu'à l'analyse. L'analyse protéomique a été réalisée en plusieurs étapes qui sont récapitulées dans la figure suivante (**Figure 36**). Cette analyse débute par l'extraction, la solubilisation et la séparation des protéines contenues dans l'échantillon étudié. Les échantillons étant analysés au niveau peptidique, cela nécessite une étape de digestion enzymatique préalable du mélange protéique. Après séparation des peptides par des méthodes électrophorétiques ou chromatographiques, ceux-ci sont identifiés après analyse par spectrométrie de masse. L'exploitation des résultats se fait grâce à des outils très spécialisés de bioinformatique.



**Figure 36 : Les différentes étapes expérimentales de l'étude protéomique**  
 Extrait d'Emadalli and Gallagher-Gambarelli (2009)

### 2.1. Extraction des protéines

Six échantillons de cerveau (télencéphale et diencéphale) et de moelles épinières ont été utilisés pour chaque groupe : CTL + véhicule, EAE + véhicule, CTL + GSE, EAE + GSE. Les protéines ont été extraites à l'aide d'un tampon de solubilisation contenant 7 M d'urée, 2 M de thiourée, 20 mM de DTT (Dichloro-diphényle-trichloro-éthane), 2 % de CHAPS (3-((3-Cholamidopropyl) diméthylammonio)-1-propanesulfonate), 0,5 % de (3-(4-heptyl) phenyl-3-hydroxy-propyl-diméthylammonio-propanesulfonate) (C<sub>7</sub>BzO), 2 mM de tributylphosphine. Pour 100 mg de tissus, 400 mL de tampon d'extraction ont été ajoutés. Les tissus ont ensuite été homogénéisés dans de la glace en utilisant le broyeur FastPrep® à une vitesse de 6 m/s pendant 40 s à 3 reprises séparées de 10s. Les mélanges obtenus ont été centrifugés à 10 000

rpm pendant 10 min à 4°C. Les surnageants ont été collectés et conservés à -80°C jusqu'à utilisation.

## **2.2. Détermination de la concentration en protéines**

La méthode de Bradford a été utilisée pour déterminer la concentration en protéines pour chaque échantillon, selon les instructions du fabricant (kit Protein Assay® ; Bio-Rad). Cinq µl d'extrait de cerveau dilué au 1/50 ou de moelle épinière dilué au 1/10 sont ajoutés à 245 µl de la solution de Bradford. Après 30 min d'incubation à l'obscurité, l'absorbance à 595nm est mesurée et la concentration protéique en µg/mL est déterminée en se référant à une courbe d'étalonnage réalisée avec des concentrations connues de BSA. Afin d'avoir une idée préliminaire sur le contenu et la qualité protéiques de nos échantillons, une électrophorèse monodimensionnelle sur gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium (SDS-PAGE) a été réalisée.

## **2.3. Migration des protéines et digestion enzymatique en gel**

Dans le cadre d'une analyse protéomique, l'électrophorèse bidimensionnelle (2-DE) combine deux séparations successives : la première se fait selon le point isoélectrique de la protéine (pI) appelée isoélectrofocalisation tandis que la seconde orthogonale s'effectue en condition SDS-PAGE selon les poids moléculaires des protéines en fonction du champ électrique. Ainsi, dans un mélange protéique complexe, la séparation de protéines aux propriétés proches est possible avec une grande résolution.

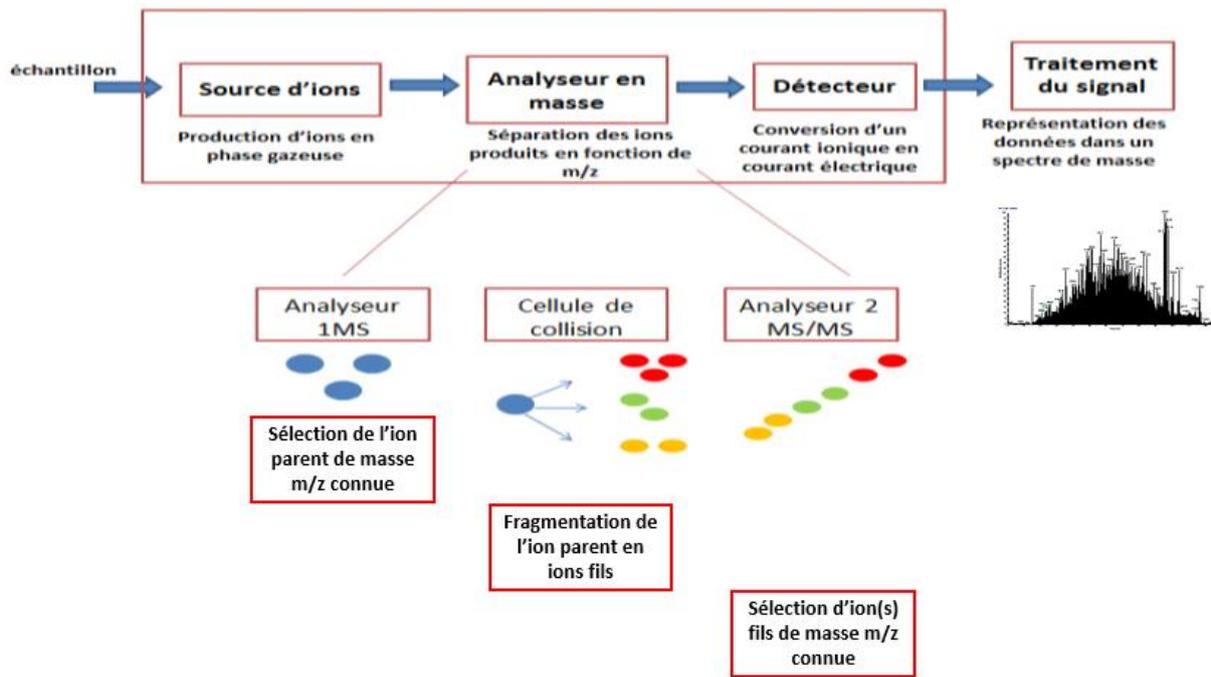
Pour chaque échantillon, 25 µg de protéines ont été chargés dans un gel de polyacrylamide à 7% (Acrylamide/Bis-Acrylamide 30 % [29:1], Sigma-Aldrich). La migration des protéines a été réalisée pendant 90 min, sous un courant de 10 mA pendant 30 min puis 80 mA pendant 1h. Dans cette étude, une coloration du gel au bleu de Coomassie a été réalisée et les bandes protéiques ainsi révélées ont été excisées et coupées en 3 petits morceaux. Les morceaux de gel de chaque échantillon ont été lavés pendant 10 min à 3 reprises avec 100 µL d'eau Milli-Q, puis ont été immergés dans 100 µL de tampon réducteur (5 mM DTT) pendant 10 min sous agitation et, dans un second temps, dans 100 µL de tampon alkylé (20 mM iodoacétamide) pendant 10 min sous agitation. Après 2 étapes de déshydratation des gels avec 100 µL d'acétonitrile (ACN) pendant 10 min sous agitation, les protéines ont été soumises à une digestion trypsique (100 µL contenant 1 µg de trypsine pour 25 µg de protéines dans un tampon carbonate 20 mM, pH 8). Après une nuit d'incubation à 37°C sous agitation, le surnageant de chaque échantillon a été collecté et les peptides ont ensuite été extraits du gel en utilisant d'abord un mélange de tampon phosphate/ACN/acide trifluoroacétique (TFA)

0,1% pendant 10 min, puis deux fois une solution à 100  $\mu$ L d'ACN pendant 10 min sous agitation. Les surnageants contenant les peptides ont été collectés puis séchés à l'aide d'un Speedvac (Thermo Scientific™).

#### 2.4. Label Free

Toutes les analyses ont été réalisées en utilisant le spectromètre de masse Orbitrap Q-exactive Plus (Thermo Scientific) couplé à un système de chromatographie liquide Easy-nLC II (Thermo Scientific). Il s'agit d'un système de nano-chromatographie liquide (LC)-MS/MS répétées 2 fois. Après digestion des protéines en peptides, la complexité de l'échantillon est considérablement augmentée. C'est la raison pour laquelle, lors d'une étape préliminaire, le mélange peptidique est séparé lors d'une LC en phase inverse afin d'obtenir directement les différentes fractions de l'échantillon sous forme liquide avant d'être injectées dans le spectromètre de masse. Cette étape de fractionnement permet de décomplexifier l'échantillon pour couvrir et caractériser au mieux le protéome étudié. La spectrométrie de masse est une méthode analytique qui permet de déterminer la masse moléculaire précise d'un composé chimique ou biologique en mesurant son rapport masse sur charge ( $m/z$ ). Le spectromètre est classiquement composé de trois modules : une source d'ionisation, un analyseur de masse et un détecteur de courant d'ions (**Figure 37**). Les molécules à analyser sont ionisées et amenées en phase gazeuse au niveau de la source. Les ions ainsi formés sont ensuite focalisés et transmis à l'analyseur où ils sont séparés en fonction de leur rapport  $m/z$ , qui leur confère un comportement différent au sein d'un champ électrostatique ou électromagnétique (**Domon *et al.*, 2006**). Ils sont enfin collectés par le détecteur qui quantifie leur intensité et amplifie le signal. Après la détection, un système informatique effectue le traitement des données et génère un spectre de masse qui reflète la variation du courant ionique observé en fonction du rapport  $m/z$  et permet de déterminer la masse moléculaire de chaque espèce ionisée.

Les spectromètres de masse peuvent utiliser un analyseur pour simplement mesurer la masse d'une molécule (MS conventionnelle) mais peuvent également associer deux analyseurs (appareils hybrides) et offrir ainsi la possibilité de réaliser de la MS/MS pour séquencer les molécules analysées (MS en tandem). Dans ce cas, après l'analyse MS par le premier analyseur, des ions spécifiques sont fragmentés dans la cellule de collision, et les masses des fragments résultants sont mesurées par le second analyseur (**Figure 37**).



**Figure 37 : Principe de la spectrométrie de masse en tandem**

Au cours de cette étude, les extraits peptidiques ont été remis en suspension dans 25  $\mu\text{L}$  de TFA à 0,1% puis 2  $\mu\text{L}$  ont été injectés sur une colonne d'enrichissement (C18 PepMap100, Thermo Scientific) ; la séparation a été réalisée avec une colonne capillaire (NTCC-360/100–5-153, NikkyoTechnos, Japon). La phase mobile est composée de  $\text{H}_2\text{O}$ /TFA 0,1% (tampon A) et ACN/TFA 0,1% (tampon B). Les peptides tryptiques ont été élués à un débit de 300 nL/min en utilisant un gradient linéaire en trois étapes : de 2 à 40% de B pendant 75 min, de 40 à 80% de B pendant 4 min et 80% de B pendant 11 min. La MS/MS est réalisée en utilisant un mode d'ionisation positive avec une tension capillaire et une température de source fixées à 1,5 kV et 275°C, respectivement. Pour l'identification des protéines, les peptides ont été analysés par la méthode de dissociation induite par collision (CID). Le premier balayage (spectres MS1) a été enregistré grâce à l'analyseur Orbitrap (résolution  $R = 60\,000$ ) dans une plage de masse  $m/z$  de 400 à 2000. Les 20 ions les plus intenses (ions parents) ont ensuite été sélectionnés pour les expériences MS2 (deuxième balayage) au cours desquelles les espèces à charge unique (ions précurseurs déjà fragmentés) ont été exclues de cette seconde analyse selon les critères suivants d'exclusion dynamique : comptage répété avec une durée de la répétition 30 s et largeur de la masse d'exclusion de  $\pm 5$  ppm (partie par millions). Une fragmentation est réalisée à l'aide de l'analyseur de piégeage à ions linéaire avec une énergie de collision de 35 eV. Une cible de 5000 ions et un temps d'injection maximum de 200 ms ont été utilisés pour les spectres CID MS2 permettant l'étude des ions générés post-fragmentation (ions fils). Toutes les mesures dans l'analyseur Orbitrap ont été effectuées avec un recalibrage interne.

## 2.5. Identification des protéines

Les nouvelles générations de MS/MS comme le LTQ-Orbitrap sont capables de réaliser des analyses à haute résolution pour lesquelles des méthodes d'analyse quantitative alternatives sans utiliser de marquage isotopique appelées « label-free » ont dû être développées. Au cours de ce travail, la méthode dite de « spectral counting » mesurant et comparant les différents spectres MS/MS a été utilisée (Figure 38). Elle est basée sur l'hypothèse que l'échantillonnage MS/MS des peptides d'une protéine, c'est-à-dire la fréquence de fragmentation de ces peptides, est directement lié à l'abondance de la protéine au sein d'un échantillon. Ainsi, une quantification relative peut être effectuée en comparant le nombre de spectres MS/MS acquis pour une protéine donnée entre deux séries d'expériences.

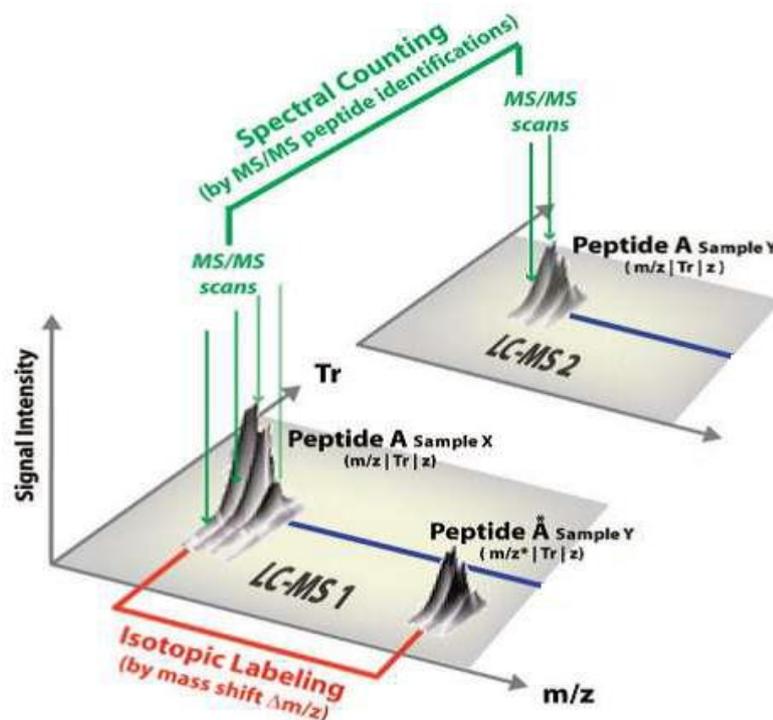


Figure 38 : Approche spectral counting pour la quantification des peptides

L'identification des protéines totales présentes dans chaque échantillon a dans un premier temps été analysée avec la base de données Swiss-Prot pour la taxonomie *Mus musculus* en utilisant le logiciel Proteome Discoverer 1.4.1.14 (Thermo Scientific). Les listes des pics identifiés ont été analysées à l'aide du moteur de recherche Mascot (Matrix Science, version 2.2.04) selon les paramètres suivants : la trypsine a été utilisée comme enzyme requise, deux sites de clivage de manqués de la trypsine ont été autorisés, la carbamidométhylation de la cystéine et l'oxydation sur la méthionine ont été considérées comme des modifications fixes. Par la suite, le logiciel Proteome Discoverer a généré des tableaux sous forme Excel en indiquant le nombre total des protéines dans chaque échantillon et ses caractéristiques en

termes d'identification. Les tolérances des ions parents et fils étaient respectivement de 10 ppm et 0,5 Da. Les résultats ont été filtrés pour un taux maximal de faux positifs de 1% pour les protéines et les peptides. L'identification des protéines a été acceptée si elle était établie par au moins 2 peptides identifiés. A la fin de cette analyse, certains échantillons avaient un nombre de protéines identifiées très inférieur à la moyenne de tous les échantillons et ont été retirés de la suite de l'analyse. Seuls 4 échantillons d'encéphale et 5 échantillons de moelle épinière par groupe de traitement ont été conservés. A partir des données obtenues, un diagramme de Venn a pu être réalisé pour chaque groupe de traitement permettant de visualiser le nombre de protéines en commun dans chacun des échantillons de cerveau ou de moelle épinière. Ceci permet de déterminer les chevauchements entre les répliques biologiques et par conséquent d'évaluer la reproductibilité de la méthode et l'homogénéité des protéines identifiées au sein d'un groupe. Un pourcentage de reproductibilité a ainsi été identifié pour chaque groupe ; il correspond au nombre de protéines identifiées pour chaque échantillon par rapport au nombre totale des protéines élémentaires identifiées au sein du groupe.

## **2.6. Quantification sans étiquette relative à l'aide du logiciel *Progenesis LC-MS***

Pour la quantification des protéines, une quantification sans étiquette a été réalisée à l'aide du logiciel Progenesis LC-MS (Nonlinear Dynamics version 1.0.01, Newcastle, Royaume-Uni). Les données brutes ont été chargées dans le logiciel et la détection des pics de MS a permis de générer une carte peptidique massique semblable à une carte 2-DE séparant les rapports m/z en fonction des temps de rétention. L'étape suivante a consisté en la collecte des pics (ou « pick peaking » en anglais) permettant de cartographier l'ensemble des pics, en leur attribuant une position et une abondance. Pour améliorer cette analyse, les pics pouvaient être visualisés dans différents repères (à une, deux ou trois dimensions).

Dans un premier temps, une analyse quantitative globale a été réalisée afin de déterminer les protéines variant en fonction des groupes d'étude, permettant d'avoir une idée générale du nombre total de protéines dérégulées. Dans un second temps, une analyse a été réalisée en comparant les groupes deux à deux. Les approches protéomiques permettant de quantifier l'expression de plusieurs milliers de protéines, les listes de protéines dérégulées sont fastidieuses à traiter et à analyser de manière manuelle. Il existe plusieurs outils permettant de synthétiser et d'intégrer ces résultats afin de les interpréter. Parmi ces outils, figure le projet « Gene Ontology » qui est une initiative communautaire majeure de bioinformatique ayant

pour but de standardiser la représentation de gènes et produits de gènes à travers les espèces et les bases de données (**Gene Ontology Consortium et al., 2013**). Une ontologie représente formellement la connaissance comme un ensemble de concepts dans un domaine ainsi que les relations entre ces concepts.

L'Ontologie des gènes (GO) fournit un système de classification hiérarchique des gènes ou des produits de gènes (dans ce travail les protéines) en termes organisés dans une structure graphique (ou une ontologie). Cette ontologie est le fruit de la standardisation des nomenclatures des produits de gènes dans le but de rendre accessible la description des fonctions biologiques qui sont associées aux gènes des eucaryotes *via* un vocabulaire structuré. La GO se compose d'environ 30 000 termes décrivant les trois aspects majeurs (ou catégories) des annotations fonctionnelles de gènes :

- les processus biologiques (BP pour *Biological Process*), décrivant le rôle cellulaire ou physiologique le plus important joué par le gène, coordonné avec d'autres gènes ;
- les fonctions moléculaires, décrivant l'activité moléculaire d'un gène ou d'une protéine ;
- les composantes cellulaires, décrivant l'emplacement dans la cellule où le produit génétique exécute sa fonction.

Pour chacune de ces catégories, chaque gène ou protéine peut être décrit avec plusieurs termes.

En plus des 3 catégories principales de GO, les protéines dérégulées seront également étudiées dans ce travail en fonction des voies métaboliques et/ou de signalisation cellulaire impliquées décrivant l'ensemble des réactions chimiques permettant de produire des nouvelles molécules et /ou la transmission d'un message à l'intérieur d'une cellule afin de comprendre les événements biologiques. Quelle que soit la catégorie étudiée, les résultats seront présentés en pourcentage du nombre de protéines dérégulées impliquées dans chaque processus par rapport au nombre total des protéines identifiées.

## V. Analyse des données

La caractérisation biochimique du GSE, les extractions au solvant et les dosages ont été effectués 3 fois. Les données ont été exprimées en moyenne  $\pm$  erreur standard à la moyenne (SEM). L'analyse de la variance et de la signification entre les moyennes a été testée par ANOVA à un facteur à l'aide du logiciel GraphPad Prism 5 (GraphPad Inc., San Diego, USA). Le test de corrélation de Pearson a été utilisé pour la corrélation entre les moyennes.

Dans le cas de l'étude comportementale, toutes les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel GraphPad Prism 6 (GraphPad Inc., San Diego, USA). Avant chaque analyse, l'égalité de variance et la distribution normale des échantillons ont été évaluées et des analyses paramétriques ou non paramétriques ont été réalisées en fonction des résultats observés. Pour le suivi longitudinal du poids corporel et du score EAE, toutes les données ont été analysées à l'aide d'une analyse de variance (ANOVA) à deux facteurs avec les groupes (CTL + vehicle, EAE + Vehicle, CTL + GSE, EAE + GSE) et le jour post-induction (DPI 0 à 30) comme principaux facteurs. Des comparaisons post-hoc ont été faites avec un test de Sidak pour des comparaisons multiples entre les groupes pour chaque DPI. Pour les tests comportementaux moteurs, sensitifs et cognitifs, les données ont été analysées en utilisant une ANOVA deux voies avec le groupe (CTL + vehicle, EAE + Vehicle, CTL + GSE, EAE + GSE) et les DPI comme facteurs principaux. Des comparaisons post-hoc ont été faites avec un test de Sidak pour des comparaisons multiples entre les groupes pour chaque DPI. Les résultats ont été présentés sous forme de moyenne  $\pm$  SEM.

Pour l'analyse biochimique et par western blot, les analyses ont également été effectuées en utilisant le logiciel GraphPad Prism 6 (GraphPad Inc., San Diego, USA). L'analyse statistique a été effectuée par analyse de la variance ANOVA à un facteur suivi du test de comparaison de Tukey. Les résultats ont été présentés sous forme de moyenne  $\pm$  SEM. Pour l'ensemble de ces études, les différences ont été considérées statistiquement significatives pour une valeur de  $p < 0,05$ .

Pour l'analyse protéomique, après alignement et normalisation des données, l'analyse statistique a été effectuée en utilisant l'analyse de la variance ANOVA à un facteur à l'aide du logiciel Progenesis LC-MS (Nonlinear Dynamics version 1.0.01, Newcastle, Royaume-Uni). Lors de l'analyse biochimique et des études en western blot, le test Dixon a pu être utilisé pour l'élimination de valeurs aberrantes au sein du groupe.



## *Partie 3 : Résultats*



Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à la caractérisation du GSE d'un point de vue biochimique et moléculaire. Nous avons analysé sa composition globale, sa teneur en polyphénols, en flavonoïdes et en tanins condensés et nous avons déterminé son pouvoir antioxydant *in vitro*.

Par la suite, nous avons analysé l'effet du traitement curatif au GSE sur un modèle animal de SEP, l'EAE induite chez les souris. Nous avons tout d'abord réalisé une étude comportementale puis une étude biochimique, moléculaire et protéomique sur des prélèvements d'encéphale et de moelle épinière afin de caractériser au mieux la physiopathologie du modèle EAE et le mécanisme d'action du GSE.

## I. Caractérisation de l'extrait de pépins de raisin

Afin de caractériser le GSE, nous avons effectué des extractions avec de l'éthanol 10% comme réalisé par la suite au cours du traitement *in vivo*. Nous avons ensuite déterminé les rendements d'extraction, la composition des différentes phases, la teneur en polyphénols ainsi que la capacité antioxydante.

### 1. Rendements d'extraction

L'extraction des composés phénoliques a été faite par extraction solide-liquide dans 10% d'éthanol. La moyenne du rendement massique (R%) des 3 extractions a été calculée après évaporation totale des solvants. Les résultats obtenus sont présentés en moyenne  $\pm$  SEM (Tableau 17).

**Tableau 17 : Moyenne de rendement massique d'extraction de l'extrait de pépins de raisin**

Extrait	R (%)
GSE : Ethanol 10%	2,57 $\pm$ 0,02

Nos résultats montrent que le rendement massique est de  $2,57 \pm 0,02$  %.

### 2. Fractionnement de l'extrait de pépins de raisin

Trois fractions phénolique, lipidique et aqueuse ont été préparées pour le GSE, en utilisant respectivement comme solvant le cyclohexane, l'acétate d'éthyle et l'eau. Les résultats sont consignés dans le **Tableau 18** et sont représentés en fonction de la moyenne de 3 extractions  $\pm$  SEM.

**Tableau 18 : Fraction phénolique, lipidique et aqueuse de l'extrait de pépins de raisin**

Extrait	Fraction (%)		
	Phénolique	Lipidique	Aqueuse
GSE : Ethanol 10%	30,75 $\pm$ 0,07	50,75 $\pm$ 0,03	16,25 $\pm$ 0,07

Les résultats obtenus montrent que la fraction lipidique est la plus importante, suivie par la fraction phénolique et enfin la fraction aqueuse.

### 3. Teneur en polyphénols totaux, flavonoïdes totaux et tanins condensés

La teneur en polyphénols totaux est exprimée en milligramme d'équivalent d'acide gallique par gramme de poudre de pépins de raisin (mg EAG/g poudre). Les flavonoïdes totaux et tanins condensés sont exprimés en milligramme d'équivalent de quercétine par gramme de poudre de pépins de raisin (mg EQ/g poudre) et les résultats sont exprimés dans le **Tableau 19**, en moyenne  $\pm$  SEM.

**Tableau 19 : Teneur en polyphénols totaux, flavonoïdes totaux et tannins condensés de l'extrait de pépins de raisin**

Extrait	Polyphénols totaux (mg EAG/g poudre)	Flavonoïdes totaux (mg EQ/g poudre)	Tannins condensés (mg EQ/g poudre)
<b>GSE : Ethanol 10%</b>	0,71 $\pm$ 0,01	0,19 $\pm$ 0,01	0,06 $\pm$ 0,002

### 4. Activité antioxydante *in vitro* de l'extrait de pépins de raisin

L'évaluation *in vitro* de l'activité antioxydante du GSE a été réalisée selon 4 méthodes : l'activité antioxydante totale, l'activité anti-radicalaire par le test au DPPH, l'activité chélatrice du fer et l'activité réductrice du fer par le test FRAP.

Tous les résultats des dosages de l'activité antioxydante *in vitro* sont représentés dans le tableau ci-dessous.

**Tableau 20 : Activité antioxydante de l'extrait de pépins de raisin selon quatre méthodes**

Extrait	Activité antioxydante totale ( $\mu$ g EAA/mg MS)	Activité anti-radicalaire aux DPPH IC <sub>50</sub> ( $\mu$ g/mL)	Pouvoir chélateur du fer IC <sub>50</sub> ( $\mu$ g/mL)	Pouvoir réducteur du fer EC <sub>50</sub> ( $\mu$ g/mL)
<b>GSE : Ethanol 10%</b>	18,25 $\pm$ 0,01	219,00 $\pm$ 0,01	338,00 $\pm$ 0,01	508,00 $\pm$ 0,04
<b>BHT</b>		105,69 $\pm$ 0,01		
<b>EDTA</b>			90,00 $\pm$ 0,01	
<b>Acide ascorbique</b>				60,00 $\pm$ 0,01

GSE : Extrait de pépins de raisin ; BHT : Hydroxytoluène butylé ; EDTA : Acide éthylènediaminetétraacétique.

Les résultats obtenus montrent que l'activité antioxydante totale du GSE est égale à 18,25 µg EAA/mg MS. De même, il présente une activité anti-radicalaire aux DPPH avec une IC<sub>50</sub> égale à 219,00 µg/µL, le double de l'IC<sub>50</sub> du BHT qui est utilisé dans ce cas, comme standard. Par ailleurs, notre extrait a montré un pouvoir chélateur du fer avec une IC<sub>50</sub> égale à 338,00 µg/mL qui est trois fois supérieure à l'IC<sub>50</sub> de l'EDTA utilisé comme standard. Le GSE a également montré un pouvoir réducteur du fer avec une EC<sub>50</sub> égale à 508 µg/mL, qui est 9 fois supérieure à l'EC<sub>50</sub> de l'acide ascorbique utilisé comme standard pour ce test.

### 5. Identification des composés de l'extrait de pépins de raisin par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse

Une fois chaque fraction séparée, les composés constitutifs de chaque fraction ont été caractérisés afin d'avoir une idée de la nature des principes actifs putatifs du GSE. Ainsi, les composés des fractions phénolique, lipidique et aqueuse avec leurs abondances respectives sont résumés respectivement dans les **Tableaux 21, 22 et 23**.

**Tableau 21 : Composés phénoliques identifiés par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse au niveau de l'extrait de pépins de raisin**

Composés	Abondance Relative (%)
Epicatechine	35,21
Catéchine	34,41
Acide gallique	12,84
Dérivatives de la quercétine	5,73
Flavan-3-ol	2,25
Acide protocatéchique	2,20
Ester éthylique de l'acide gallique	1,73
Tyrosol	1,03
Quercétine	1,01
Acide p-Coumarique	0,54
Acide ferulique	0,27
Syringaldéhyde	0,23
Acide vanillique	0,14

Les résultats d'identification des composés de la fraction phénolique montrent une large diversité avec les composés les plus abondants que sont l'épicatechine et la catéchine avec une abondance presque égale (35,21% et 34,41% respectivement), l'acide gallique (12,84%) et des dérivés de la quercétine (5,73%). Il convient de signaler également la présence d'autres composés comme le flavan-3-ol et d'autres composés minoritaires.

**Tableau 22 : Composés lipidiques identifiés par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse au niveau de l'extrait de pépins de raisin**

Composés	Abondance Relative (%)
Monostéarate de glycérol	68,95
2-Monostéarine	15,48
Glycine, N-méthyle-n-propoxycarbonyl, ester hexadécylique	9,74
$\alpha$ -Monopalmitine	2,57
Squalène	1,34
Acid hexadécanoïque, 4- [(triméthylsilyl) oxy] butyl ester	0,68
Cyclogallipharol	0,64
Silane, diméthyle (2-méthylbutoxy) hexadécyloxy	0,60

Le tableau ci-dessus représente les composés identifiés au niveau de la fraction lipidique et leur abondance relative. Huit composés lipidiques ont été identifiés et sont majoritairement représentés par le monostéarate de glycérol (68,95%), le 2-monostéarine (15,48%) et l'ensemble glycine, N-méthyle-n-propoxycarbonyl, ester hexadécylique (9,74%).

**Tableau 23 : Composés hydrosolubles identifiés par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse au niveau de l'extrait de pépins de raisin**

Composés	Abondance Relative (%)
Glucopyranoside	26,42
Fructofuranose isomère 1	17,31
Saccharose	11,78
$\beta$ -D-Glucopyranose	7,30
Sorbitol	6,76
Polysaccharides inconnus	6,39
Mannose isomère 1	3,86
Myo-Inositol	3,40
Fructofuranose isomère 2	2,23
Tréhalose	1,99
D-Psicose	1,64
Gulose	1,51
D-Allofuranose	1,00

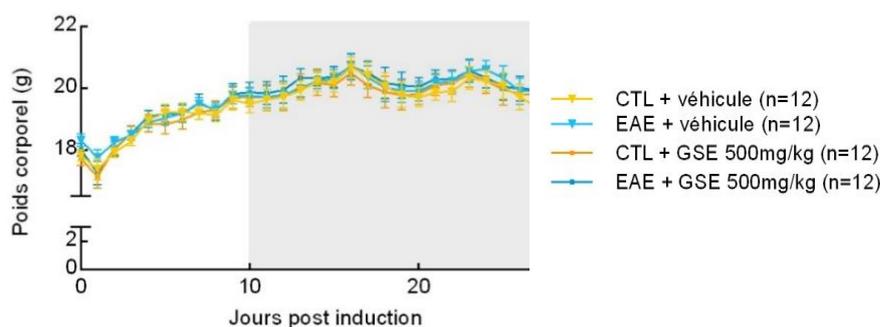
Dans la fraction aqueuse du GSE, plus de 30 composés ont été identifiés, dont le tableau suivant on a mis que les composés dont l'abondance est supérieure à 1%. Dans cette fraction, les composés les plus abondants sont le glucopyranoside (26,42%), l'isomère 1 de la fructofuranose (17,31%), le saccharose (11,78%), le  $\beta$ -D-glucopyranose (7,30%) et le sorbitol (6,76%).

## II. Evaluation de l'effet du traitement curatif à l'extrait de pépins de raisin sur le modèle d'encéphalomyélite auto-immune expérimentale

### 1. Analyse comportementale

#### 1.1. Effet du traitement curatif à l'extrait de pépins de raisin sur le poids corporel et le développement des signes cliniques chez les souris EAE

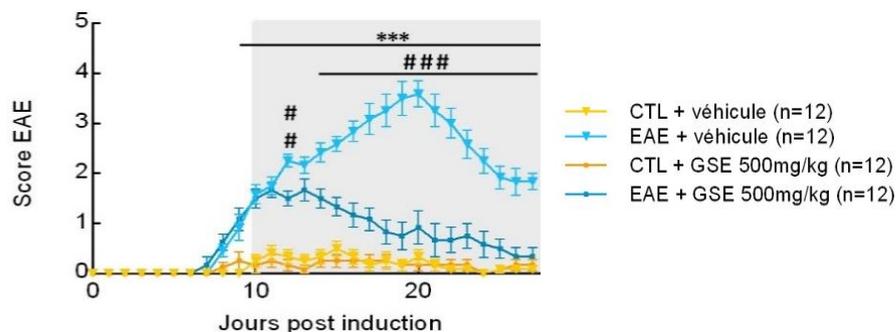
Le poids corporel a été évalué quotidiennement, à partir du jour de l'immunisation jusqu'au jour du sacrifice. Les résultats de l'évolution du poids en fonction du temps sont représentés dans la **Figure 39**.



**Figure 39 : Evolution du poids corporel**

L'analyse statistique n'a révélé aucune différence statistique entre les groupes, suggérant que ni l'EAE ni le GSE n'ont d'effet sur les poids corporels (test de Tukey, J0 à J28  $p > 0,05$ ).

De même, le score EAE a été évalué quotidiennement en ayant recours à l'échelle de point suivante : 0 : souris normale ; 1 : queue flasque ; 2 : légère faiblesse des membres postérieurs avec réflexe de redressement rapide ; 3 : faiblesse sévère des membres postérieurs avec réflexe de redressement lent ; 4 : paralysie de l'un ou des deux membres. Les résultats obtenus sont représentés dans la **Figure 40**.



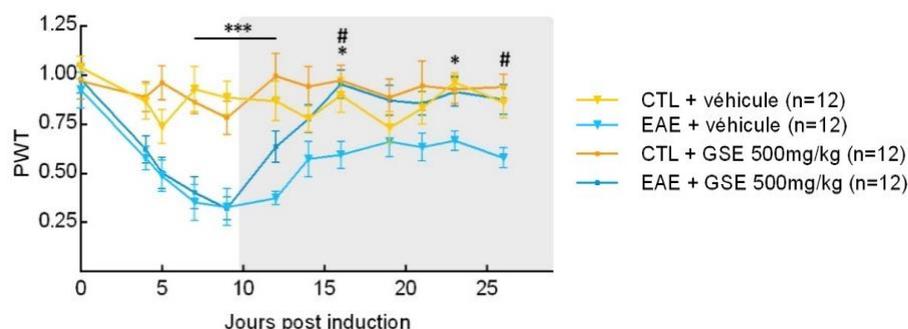
**Figure 40 : Evolution du score clinique chez les souris EAE et leurs contrôles après le traitement curatif à l'extrait de pépins de raisin**

Les résultats obtenus ont montré une augmentation significative du score EAE chez les souris EAE + véhicule par rapport aux souris CTL+ véhicule de J9 à J27 (test de Tukey,  $p < 0,001$ ).

de J9 à J27). Le traitement curatif au GSE a corrigé cette évolution clinique ; en effet, une diminution du score est observée chez les souris EAE + GSE par rapport aux souris EAE + véhicule à partir de J12 (test de Tukey,  $p < 0,01$ ) et plus significativement à partir de J14 (test de Tukey,  $p < 0,001$ ). De J25 au sacrifice, plus aucune différence statistique n'a été observée entre les souris EAE + GSE par rapport aux souris CTL + véhicule ou CTL + GSE (test de Tukey,  $p > 0,05$  non représenté sur la figure). Ces données suggèrent que le traitement curatif au GSE corrige le développement de signes clinique chez les souris EAE.

### 1.2. Effet du traitement curatif à l'extrait de pépins de raisin l'hypersensibilité mécanique, la sensibilité à la chaleur et l'allodynie au froid chez les souris EAE

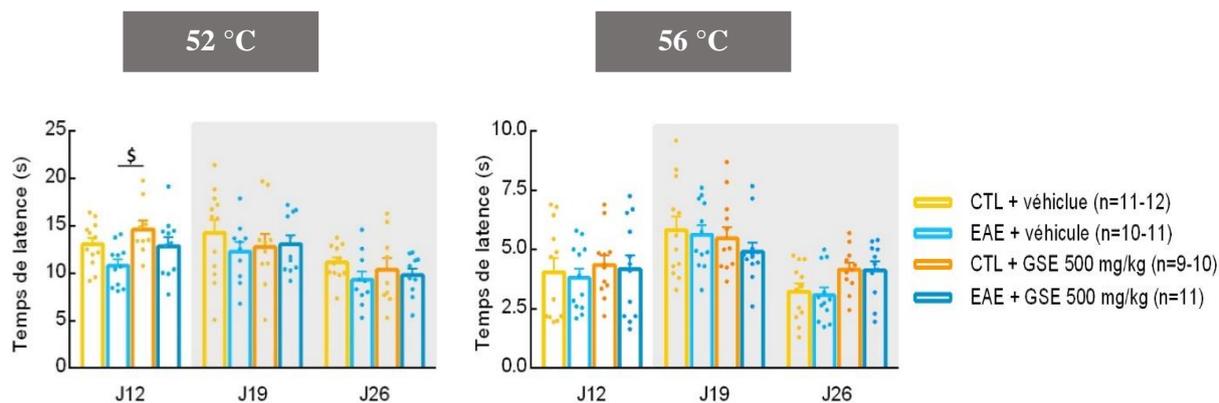
L'hypersensibilité mécanique a été évaluée tous les 2 à 4 jours de J0 à J28 post-induction et les résultats sont représentés dans la **Figure 41**.



**Figure 41 : Evolution de l'allodynie mécanique par le test de von Frey chez les souris EAE et leurs contrôles après le traitement curatif à l'extrait de pépins de raisin**

L'analyse statistique des résultats a montré une diminution significative du PWT chez les souris EAE + véhicule par rapport aux souris CTL + véhicule de J7 à J12 (test de Tukey,  $p < 0,001$ ) et à J16 et J23 (test Tukey,  $p < 0,05$ ). Le traitement curatif au GSE a corrigé cette hypersensibilité par une augmentation du PWT chez les souris EAE + GSE par rapport aux souris EAE + véhicule à J16 (durant le pic des symptômes) et à J26 (durant la phase chronique) (test de Tukey,  $p < 0,01$ ), tandis que de J5 à J12 les souris EAE + GSE et EAE + véhicule ont présenté une PWT faible par rapport aux souris CTL + GSE (test de Tukey,  $p < 0,001$  à  $p < 0,01$ ).

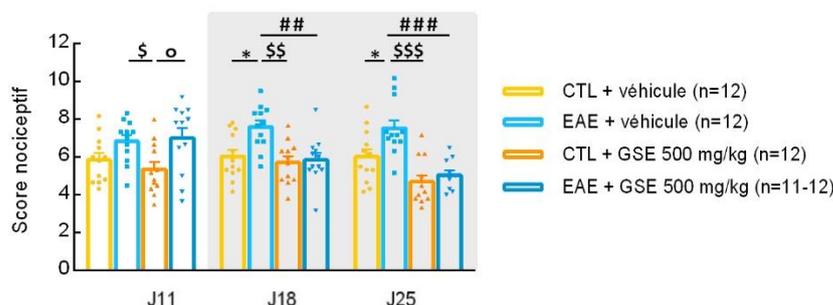
Par ailleurs, nous avons évalué la sensibilité thermique à la chaleur à 52°C et 56°C en utilisant le test de la plaque chaude et les résultats sont exprimés par la latence d'apparition d'une réponse nociceptive et sont représentés dans la **Figure 42**.



**Figure 42 : Evaluation de la sensibilité à la chaleur par le test de la plaque chaude chez les souris EAE et leurs contrôles après le traitement curatif à l'extrait de pépins de raisin**

L'analyse statistique n'a révélé aucune différence entre les groupes pour les deux températures, ce qui suggère que les souris EAE ne développent pas de trouble de la sensibilité thermique à la chaleur et que le GSE n'a pas d'effet notable pour ce paramètre (test de Tukey,  $p > 0,05$ ).

Enfin, l'allydonie au froid a été évaluée à l'aide du test de l'acétone appliquée sur la patte et les résultats sont exprimés en fonction de la moyenne de l'intensité des réponses nociceptives observées et sont représentés dans la **Figure 43**.



**Figure 43 : Evaluation de l'allydonie au froid par le test de l'acétone sur la patte chez les souris EAE et leurs contrôles après un traitement curatif à l'extrait de pépins de raisin**

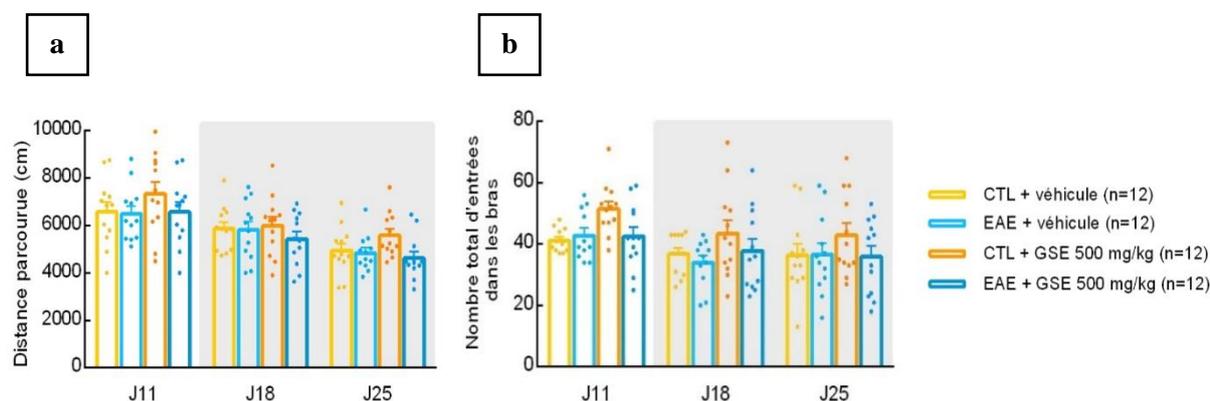
Les résultats obtenus montrent une augmentation significative du score nociceptif chez les souris EAE + véhicule par rapport aux souris CTL + véhicule à J18 (durant le pic des symptômes) et à J25 (durant la phase chronique) (test de Tukey,  $p < 0,05$ ) alors qu'aucune différence significative n'a été observée entre les souris EAE + GSE par rapport aux souris CTL + véhicule ou CTL + GSE (test de Tukey,  $p > 0,05$ ).

L'ensemble des résultats obtenus pour les 3 tests ont montré que le traitement curatif au GSE corrige le développement de l'hypersensibilité mécanique et évite le développement de

l'allydonie au froid chez les souris EAE, alors que notre modèle EAE ne développe pas de trouble de la sensibilité à la chaleur et que le GSE n'a pas d'effet notable dans ce cas.

### 1.3. Effet du traitement curatif à l'extrait de pépins de raisin sur l'activité locomotrice spontanée et la coordination motrice

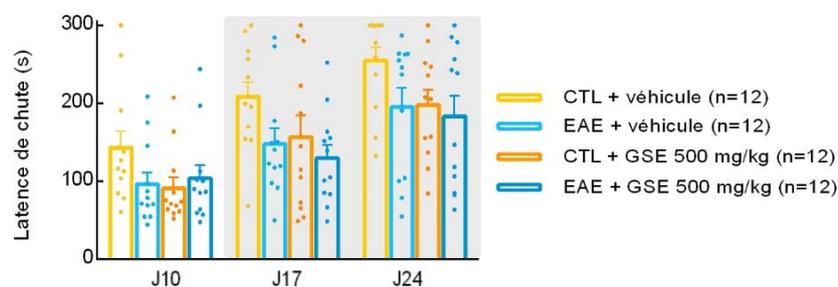
L'activité locomotrice spontanée a été évaluée par le test de l'open field et est exprimée en fonction de la distance totale parcourue pendant une session de 15 min. Elle est également déterminée lors du test du labyrinthe en Y lors de l'évaluation du nombre total d'entrées dans les bras pendant une session de 10 min. Les résultats obtenus pour l'ensemble de ces tests sont représentés dans la **Figure 44**.



**Figure 44 : Evaluation de l'activité locomotrice spontanée par le test de l'open field (a) et par le test du labyrinthe en Y (b) chez les souris EAE et leurs contrôles après un traitement curatif à l'extrait de pépins de raisin**

Pour les 2 tests, les résultats obtenus ont montré qu'il n'y a pas de différence significative entre les groupes quel que soit le jour de l'évaluation de l'activité locomotrice spontanée (test de Tukey,  $p > 0,05$ ).

Par ailleurs, la coordination motrice a été évaluée par le test de rotarod et les résultats sont exprimés en moyenne de la latence de chute du rotarod et sont représentés dans la **Figure 45**.



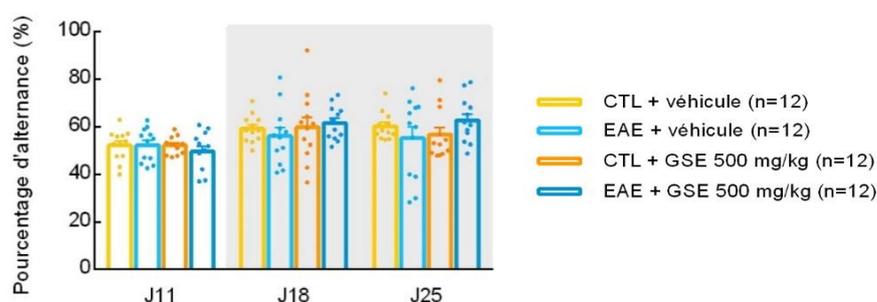
**Figure 45 : Evaluation de la coordination motrice par le test de rotarod chez les souris EAE et leurs contrôles après un traitement curatif au à l'extrait de pépins de raisin**

Les résultats obtenus n'ont montré aucune différence significative entre les groupes quel que soit le jour de l'évaluation (test de Tukey,  $p > 0,05$ ).

L'ensemble des données suggèrent que notre modèle EAE ne développe pas de troubles moteurs (altération de l'activité locomotrice spontanée et coordination motrice) et que le GSE n'a pas d'effet sur ces paramètres.

#### 1.4. Effet du traitement curatif à l'extrait de pépins de raisin sur la mémoire du travail et les comportements liés à l'anxiété

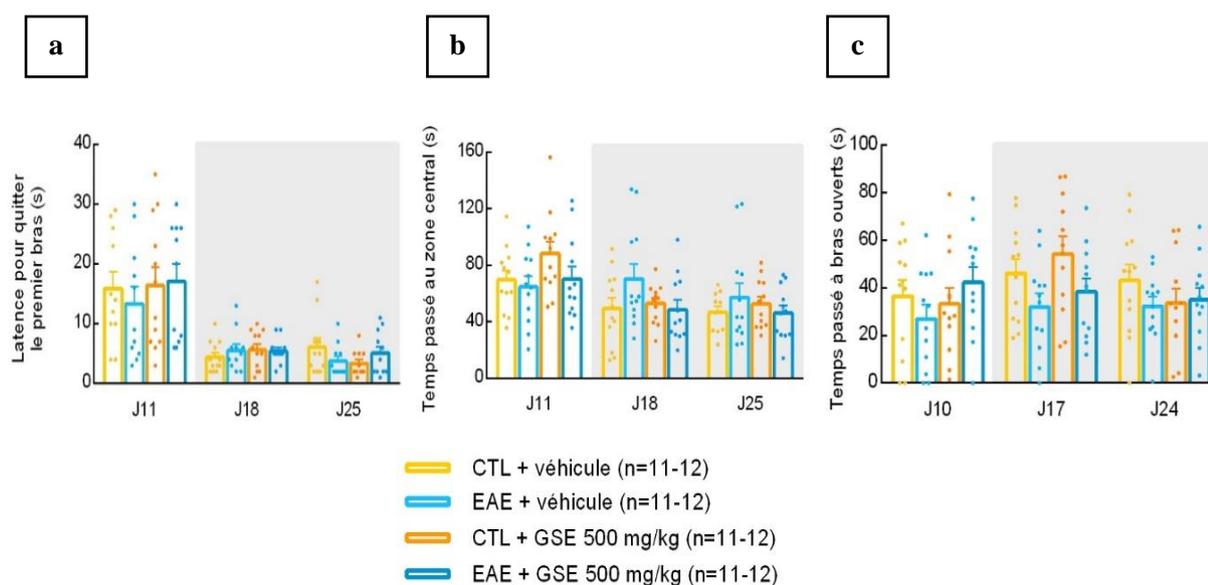
La mémoire de travail a été évaluée à l'aide du test du labyrinthe en Y et a été exprimée en fonction du pourcentage d'alternance entre les différents bras du labyrinthe. Les résultats obtenus sont représentés dans la **Figure 46**.



**Figure 46 : Evaluation de la mémoire du travail par le test du labyrinthe en Y chez les souris EAE et leurs contrôles après un traitement curatif à l'extrait de pépins de raisin**

L'analyse statistique du pourcentage d'alternance n'a révélé aucune différence significative entre les groupes quel que soit le jour d'évaluation (test de Tukey,  $p > 0,05$ ).

Les comportements liés à l'anxiété ont été évalués par : 1) le temps d'entrée dans le premier nouveau bras lors du test du labyrinthe en Y, 2) le temps passé dans la zone centrale lors du test de l'open field et enfin, 3) le temps passé dans les bras ouverts lors du test du labyrinthe en croix surélevé. Les résultats obtenus sont représentés dans la **Figure 47**.



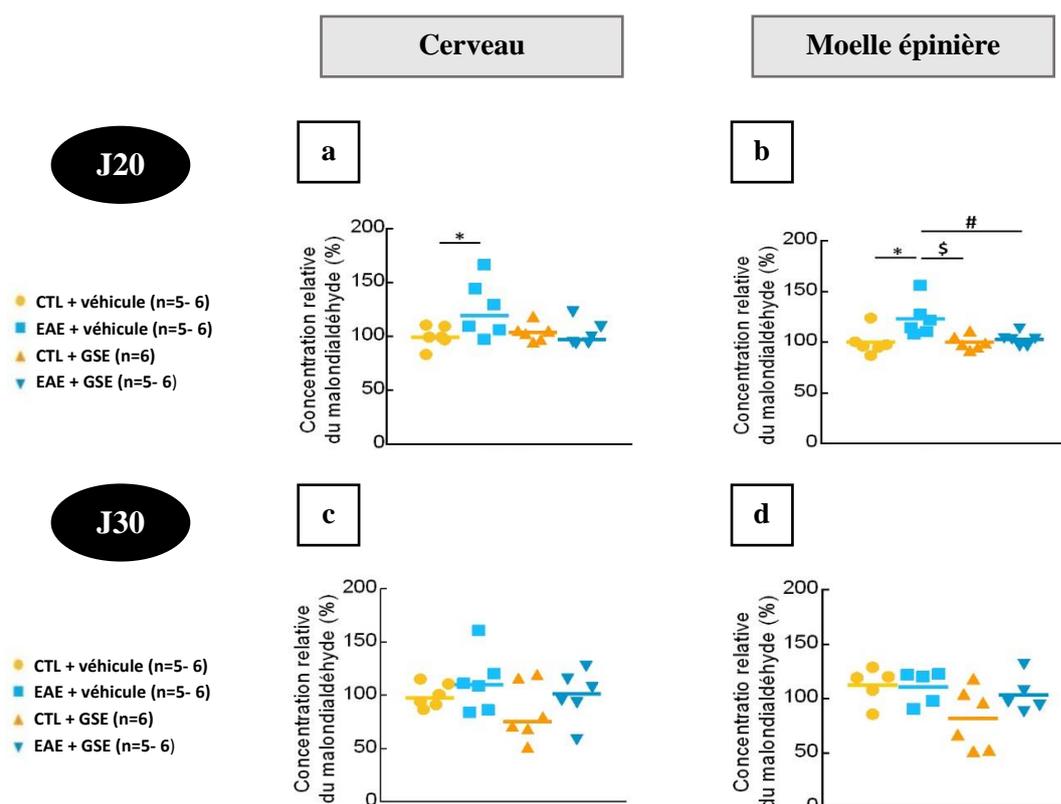
**Figure 47 : Evaluation des comportements liés à l'anxiété lors du test du labyrinthe en Y (a), du test de l'open field (b) et du test du labyrinthe en croix surélevé chez les souris EAE et leurs contrôles après un traitement curatif à l'extrait de pépins de raisin**

Dans les trois tests, l'analyse statistique n'a révélé aucune différence significative quels que soient les groupes ou les jours d'évaluation considérés (test de Tukey,  $p > 0,05$ ). Ceci suggère que notre modèle ne développe pas des comportements liés à l'anxiété et que le GSE est sans effet sur ce paramètre.

## 2. Evaluation biochimique sur le stress oxydant

### 2.1. Effet du traitement curatif à l'extrait de pépins de raisin sur la peroxydation lipidique au niveau du cerveau et de la moelle épinière chez les souris EAE

Le malondialdéhyde (MDA) est le produit terminal de la peroxydation des acides gras polyinsaturés ; son taux témoigne donc du niveau de la peroxydation des lipides. Au cours de ce travail, nous avons évalué la peroxydation lipidique au niveau du cerveau et de la moelle épinière à J20 et J30 post-induction. Celle-ci est exprimée en concentration relative de MDA (%) par rapport au groupe CTL + véhicule pour les différentes conditions. Les résultats sont représentés dans la **Figure 48**.



**Figure 48 : Evaluation de la peroxydation des lipides au niveau du cerveau et de la moelle épinière à J20 et J30 post-induction chez les souris EAE et leurs contrôles après un traitement curatif à l'extrait de pépins de raisin**

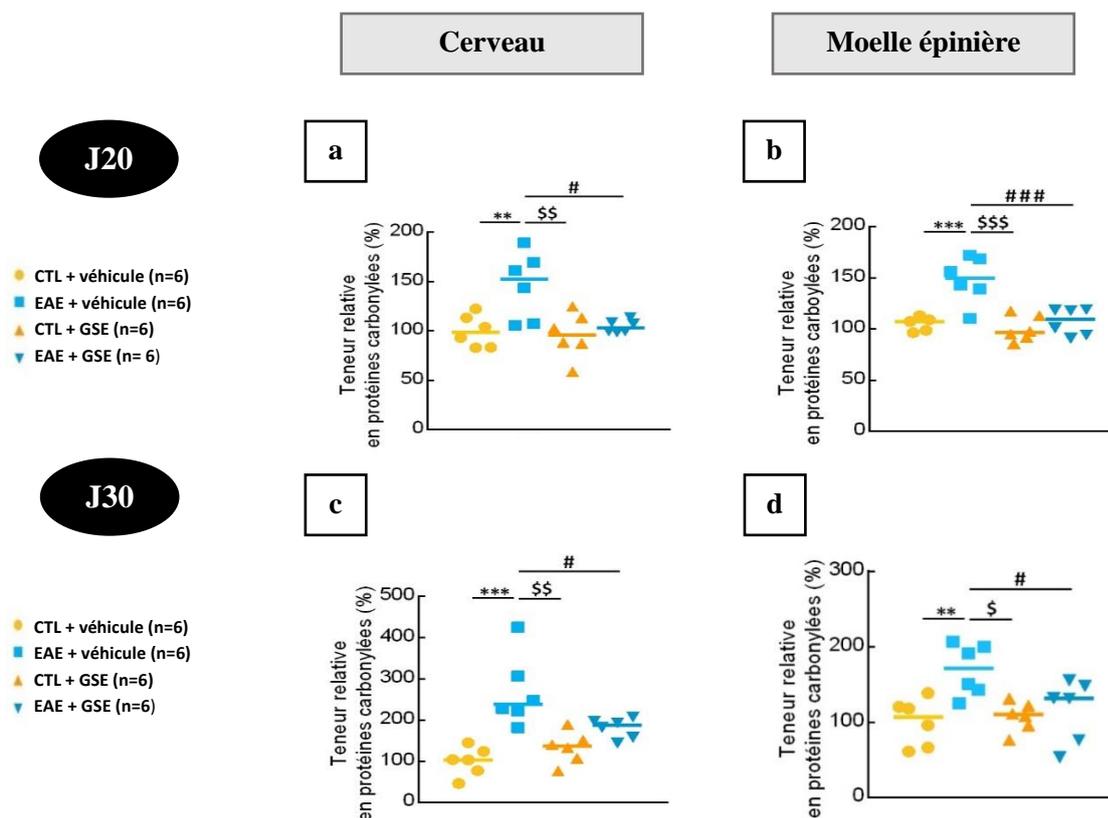
Dans le cerveau, à J20 post-induction, une augmentation de 26% de la concentration du MDA a été observée dans le groupe EAE + véhicule (test de Tukey,  $p < 0,05$ ) par rapport au groupe CTL + véhicule tandis que chez les souris EAE + GSE, la concentration du MDA est similaire à celle du groupe CTL + véhicule (**Figure 48a**). À J30 post-induction, pendant la phase chronique, l'analyse statistique n'a montré aucune différence significative de la concentration en MDA entre les groupes (**Figure 48c**).

Dans la moelle épinière, à J20 post-induction, une augmentation de 23% de la concentration en MDA a été observée dans le groupe EAE + véhicule (test de Tukey,  $p < 0,05$ ) et a été corrigée par le traitement curatif au GSE (test de Tukey,  $p < 0,05$ , groupe EAE + GSE vs groupe EAE + véhicule) (**Figure 48b**). À J30 post-induction, pendant la phase chronique, aucune différence significative dans les concentrations de MDA n'a été notée entre les groupes (**Figure 48d**).

Ces données suggèrent que, dans le cerveau et la moelle épinière, l'augmentation de la peroxydation lipidique n'est observée que de manière transitoire (pendant le pic des symptômes) chez les souris EAE et qu'elle est corrigée par le traitement curatif au GSE dès 10 jours de traitement.

## 2.2. Effet du traitement curatif à l'extrait de pépins de raisin sur la carbonylation des protéines au niveau du cerveau et de la moelle épinière chez les souris EAE

L'oxydation des protéines a été évaluée au niveau du cerveau et de la moelle épinière à J20 et J30 post-induction et est exprimée en teneur relative en protéines carbonylées (%) par rapport au groupe CTL + véhicule (**Figure 49**).



**Figure 49 : Evaluation de la carbonylation des protéines au niveau du cerveau et de la moelle épinière à J20 et J30 post-induction chez les souris EAE et leurs contrôles après un traitement curatif à l'extrait de pépins de raisin**

Dans le cerveau, à J20 post-induction, une augmentation de 46% de la teneur en protéines carbonylées a été observée dans le groupe EAE + véhicule par rapport au groupe CTL + véhicule (test de Tukey,  $p < 0,01$ ). Le traitement curatif au GSE a permis de corriger cette augmentation dans le groupe EAE + GSE par rapport au groupe EAE + véhicule (test de Tukey,  $p < 0,05$ ) (**Figure 49a**). A J30 post-induction, une augmentation de 149% de la teneur en protéines carbonylées a été observée chez les souris EAE + véhicule par rapport aux souris CTL + véhicule (test de Tukey,  $p < 0,001$ ) et cette teneur a été corrigée par le traitement au GSE (test de Tukey,  $p < 0,05$ , EAE + GSE vs EAE + véhicule) (**Figure 49c**).

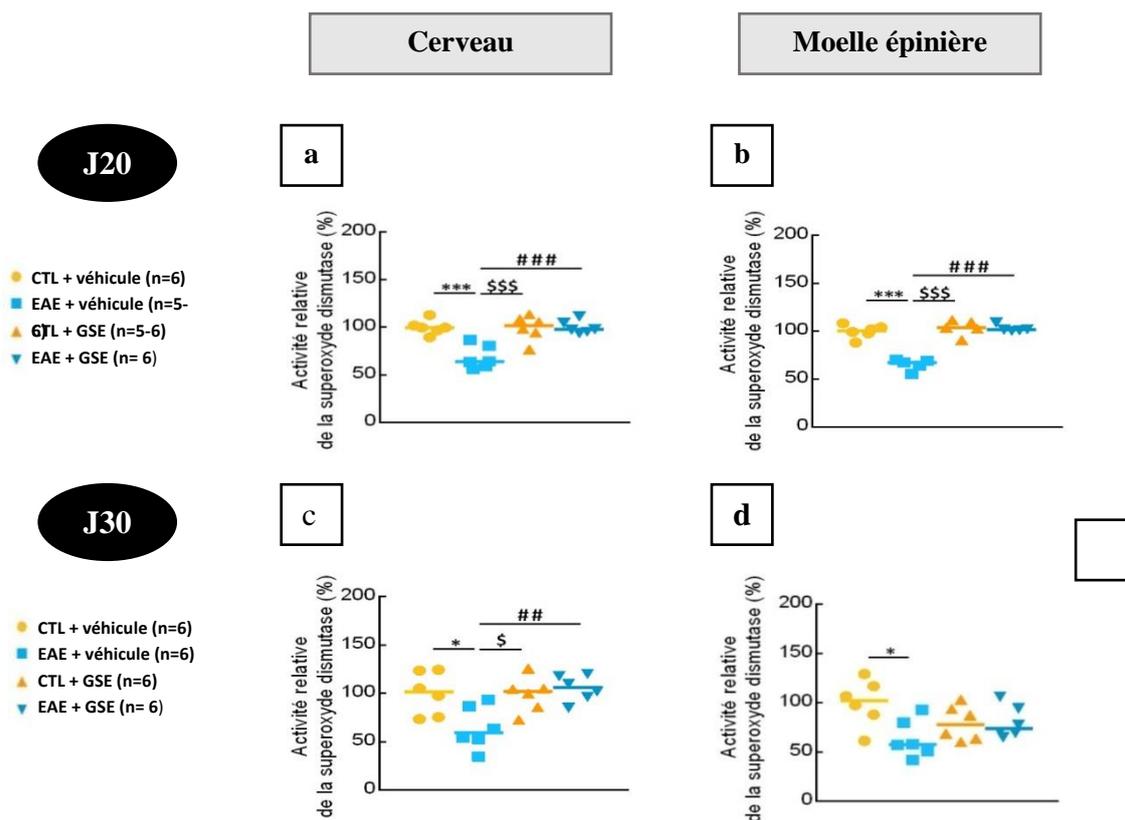
Dans la moelle épinière, à J20 post-induction, la teneur en protéines carbonylées a été augmentée de 69% dans le groupe EAE + véhicule (test de Tukey,  $p < 0,001$ ). Le traitement curatif au GSE a corrigé cette augmentation ( $p < 0,001$ , EAE + GSE vs EAE + véhicule) (**Figure 49b**). A J30 post-induction, une augmentation de 48% de la teneur en protéines carbonylées a été observée dans le groupe des souris EAE + véhicule (test de Tukey,  $p < 0,01$ ) et le traitement au GSE a corrigé cette augmentation chez les souris EAE + GSE (test de Tukey,  $p < 0,05$ ) (**Figure 49d**).

Ces données suggèrent que, contrairement à la peroxydation lipidique, l'oxydation des protéines est augmentée chez les souris EAE au pic des symptômes mais également lors de la phase chronique dans le cerveau et la moelle épinière et que cette augmentation est corrigée par le traitement curatif au GSE.

### **3. Effet du traitement curatif à l'extrait de pépins de raisins sur les activités des enzymes antioxydantes et leurs expressions protéiques au niveau du cerveau et de la moelle épinière chez les souris EAE**

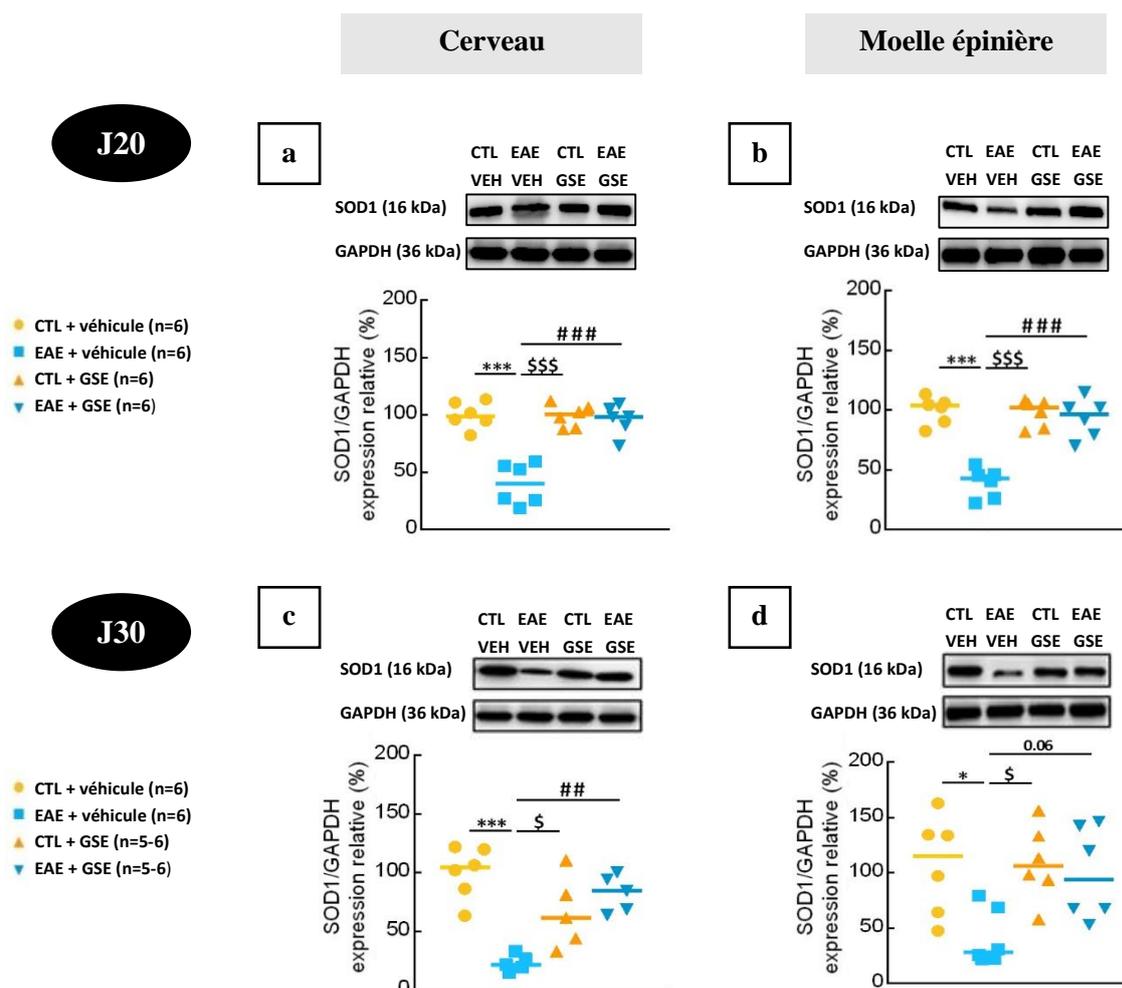
#### **3.1. Effet sur l'activité de la superoxyde dismutase et l'expression protéique de ses isoformes**

Dans un premier temps, nous avons évalué l'activité d'inhibition à 50% de la SOD par la méthode de la diminution du spectre d'absorption du formazan WST-1 à 440 nm. Les résultats sont exprimés en pourcentage relatif d'inhibition de la SOD (%) par rapport au groupe CTL + véhicule et sont représentés dans la **Figure 50**.



**Figure 50 : Evaluation de l'activité superoxyde dismutase au niveau du cerveau et de la moelle épinière à J20 et J30 post-induction chez les souris EAE et leurs contrôles après un traitement curatif à l'extrait de pépins de raisin**

Les résultats obtenus montrent qu'au niveau du cerveau, l'activité SOD est diminuée chez les souris EAE + véhicule (32%, test de Tukey,  $p < 0,001$  à J20 et 36%,  $p < 0,05$  à J30) par rapport aux souris CTL + véhicule. Le traitement curatif au GSE a permis de corriger cette diminution dans le groupe EAE + GSE (test de Tukey,  $p < 0,001$  à J20 et  $p < 0,01$  à J30) (**Figures 50a et 50c**). Des résultats similaires sont obtenus au niveau de la moelle épinière où l'activité SOD a été aussi diminuée chez les souris EAE + véhicule par rapport aux souris CTL + véhicule (test de Tukey, 29%,  $p < 0,001$  à J20 et 36%,  $p < 0,05$  à J30). Le traitement au GSE a induit une correction significative de cette altération chez les souris EAE + GSE (test de Tukey,  $p < 0,001$ ) uniquement à J20 (**Figures 50b et 50d**). Ces données suggèrent une diminution de l'activité SOD dans le cerveau et la moelle épinière des souris EAE du pic des symptômes jusqu'à la phase, et cette diminution est corrigée par le traitement curatif au GSE. Afin de déterminer si la diminution de l'activité mitochondriale est associée à une modification de l'expression protéique, l'abondance relative de la SOD1 cytosolique (Cu-Zn) et de la SOD2 mitochondriale (Mn-SOD) a été évaluée dans le cerveau et la moelle épinière. Les résultats sont représentés dans la **Figure 51**.

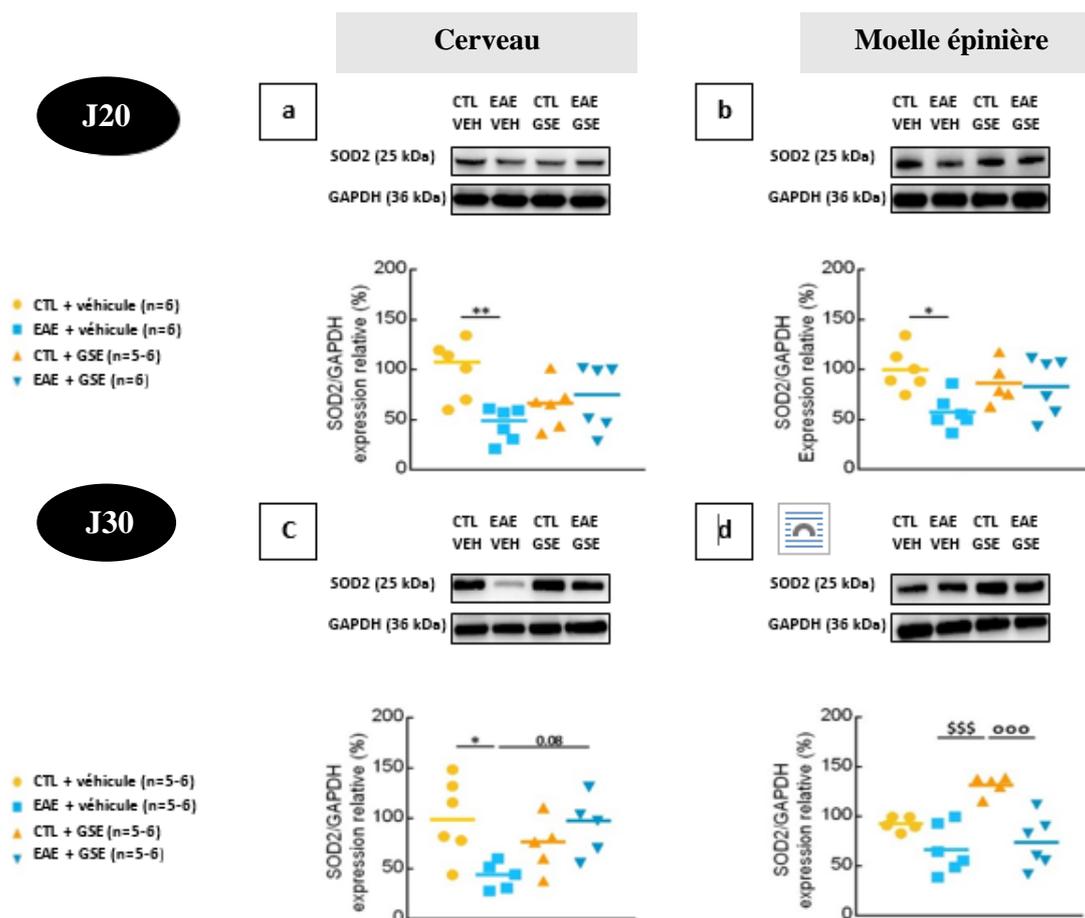


**Figure 51 : Evaluation de l'expression de SOD1 au niveau du cerveau et de la moelle épinière à J20 et J30 post-induction chez les souris EAE et leurs contrôles après un traitement curatif à l'extrait de pépins de raisin**

Les résultats montrent au niveau du cerveau une diminution de l'expression de la protéine cytosolique SOD1 dans le groupe EAE + véhicule par rapport au groupe CTL + véhicule (test de Tukey, 61%,  $p < 0,001$  à J20 et 69% à J30,  $p < 0,001$ ). Un effet significatif du traitement au GSE a été observé sur l'expression protéique de SOD1 à J20 (test de Tukey,  $p < 0,001$ ) et à J30 (test de Tukey,  $p < 0,01$ ) (**Figures 51a** et **51c**).

Dans la moelle épinière, l'expression de la SOD1 a été diminuée chez les souris EAE + véhicule par rapport aux souris CTL + véhicule (test de Tukey, 68%,  $p < 0,001$  à J20 et 59%,  $p < 0,05$  à J30) et le traitement curatif au GSE a permis de corriger cette diminution à un niveau basal, uniquement à J20 (test de Tukey,  $p < 0,001$ ) (**Figures 51b** et **51d**).

Les résultats concernant l'expression de SOD2 sont représentés dans la **Figure 52**.



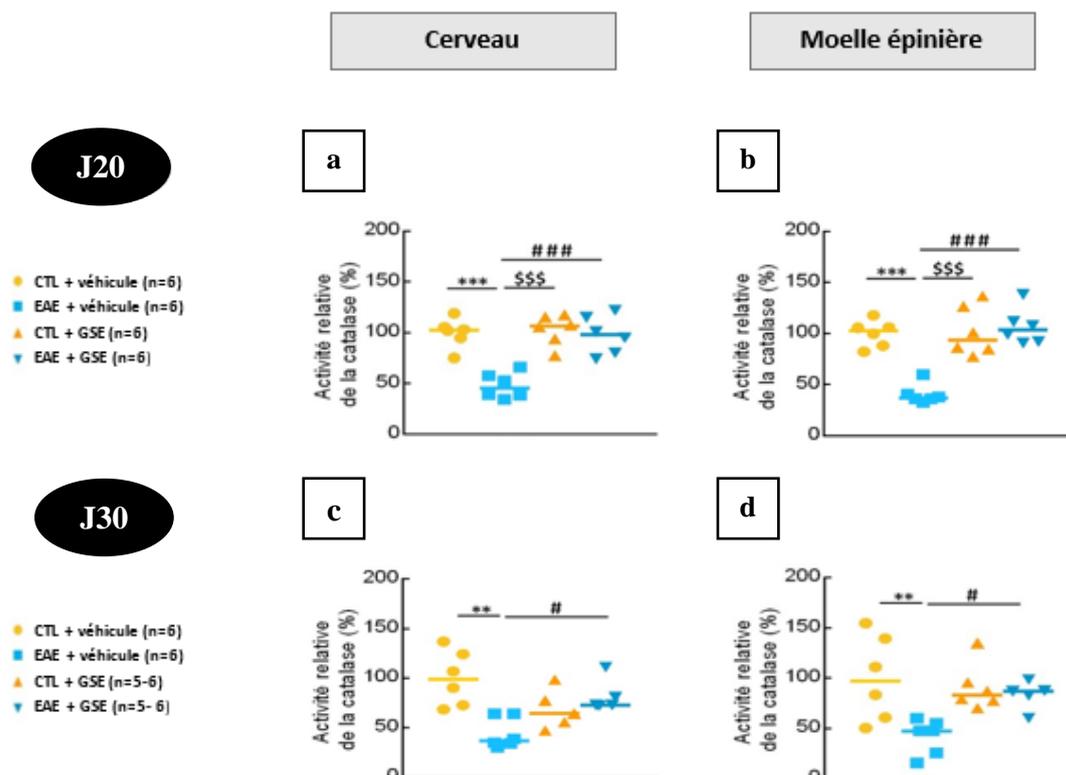
**Figure 52 : Evaluation de l'expression de SOD2 au niveau du cerveau et de la moelle épinière à J20 et J30 post-induction chez les souris EAE et leurs contrôles après un traitement curatif à l'extrait de pépins de raisin**

Les résultats obtenus pour SOD2 au niveau du cerveau montrent une diminution significative de son expression dans le groupe EAE + véhicule par rapport aux groupes CTL + véhicule (test de Tukey, 55%,  $p < 0,01$  à J20 et 24%,  $p < 0,05$  à J30). Le traitement curatif au GSE tend à augmenter cette expression mais sans différence significative. Aucune différence d'expression n'est observée entre le groupe EAE + GSE et le groupe CTL + véhicule à J20 et J30 (**Figures 52a et 52c**). De même, l'expression de SOD2 est diminuée au niveau de la moelle épinière des souris EAE + véhicule par rapport aux souris CTL + véhicule avec une différence significative seulement à J20 (test de Tukey, 33%,  $p < 0,05$ ) et le GSE n'a pas d'effet significatif sur l'expression de cette isoforme (**Figures 52c et 52d**).

Les données obtenues dans le cerveau et la moelle épinière suggèrent que : 1) la diminution de l'activité SOD dans les deux tissus est corrélée à une diminution de l'expression de SOD1 et dans une moindre mesure de l'isoforme SOD2 ; 2) l'effet bénéfique du GSE sur l'activité SOD est lié presque uniquement à l'augmentation du niveau de SOD1.

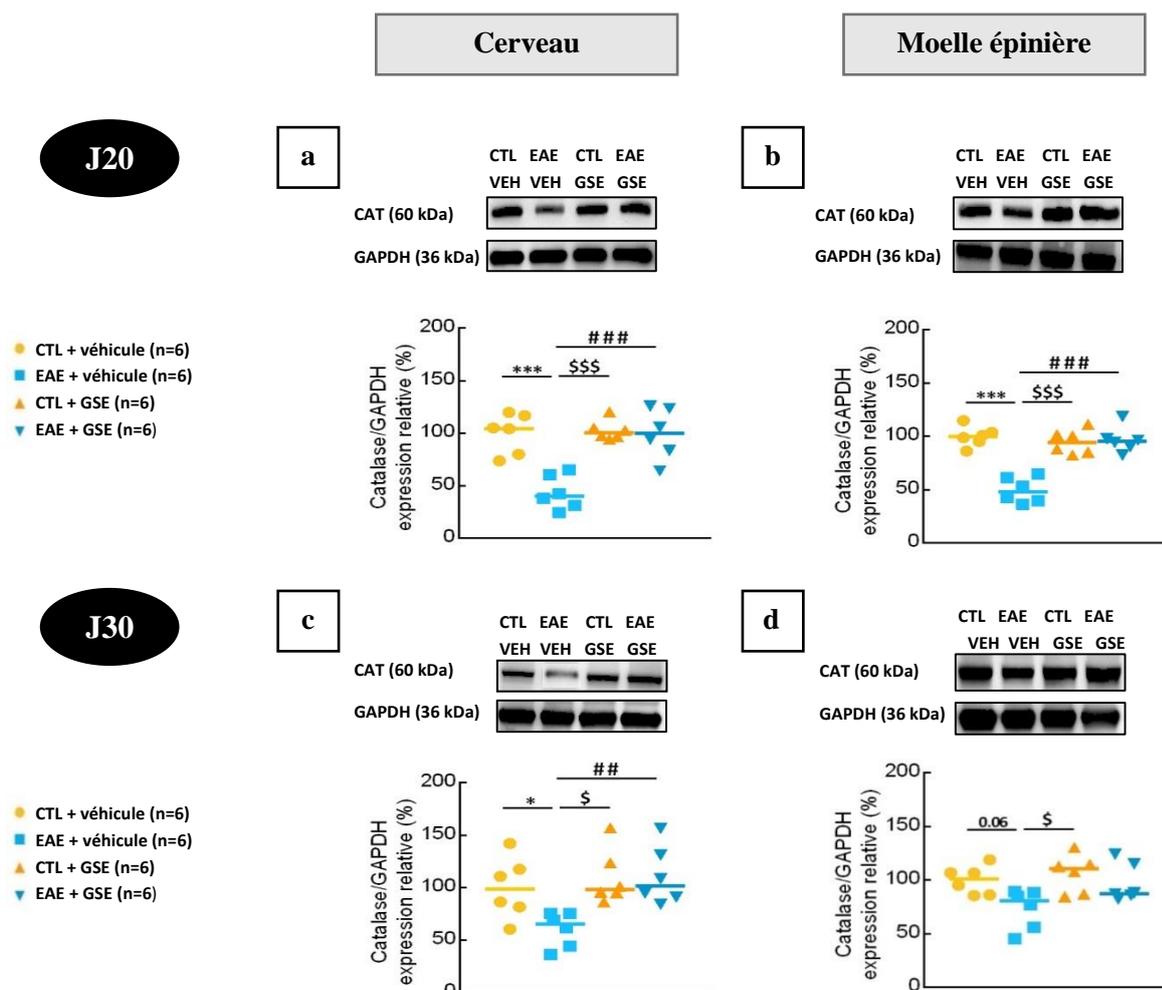
### 3.2. Effet sur l'activité de la catalase et sur son expression protéique

L'activité de la CAT a également été détectée par spectrophotométrie (mmol/mg de protéine/min) et les résultats sont exprimés en % de l'activité relative de la CAT, comparativement au groupe CTL + véhicule. Ils sont illustrés dans la **Figure 53**.



**Figure 53 : Evaluation de l'activité catalase au niveau du cerveau et de la moelle épinière à J20 et J30 post-induction chez les souris EAE et leurs contrôles après un traitement curatif à l'extrait de pépins de raisin**

Dans le cerveau, l'activité CAT est diminuée pour le groupe EAE + véhicule (test de Tukey, 53%,  $p < 0,001$  à J20 et 56%,  $p < 0,01$  à J30) par rapport au groupe CTL + véhicule. Le traitement curatif au GSE a permis de corriger de manière significative cette altération chez les souris EAE + GSE (test de Tukey,  $p < 0,001$  à J20 et  $p < 0,05$  à J30) (**Figures 53a** et **53c**). Des résultats similaires ont été observés dans la moelle épinière où l'activité CAT est diminuée dans le groupe EAE + véhicule par rapport au groupe CTL + véhicule (test de Tukey, 59%,  $p < 0,001$  à J20 et 58%,  $p < 0,01$  à J30). Le GSE corrige significativement cette altération chez les souris EAE + GSE (test de Tukey,  $p < 0,001$  à J20 et  $p < 0,05$  à J30) (**Figures 53b** et **53d**). Ces données suggèrent une diminution de l'activité CAT dans le cerveau et la moelle épinière des souris EAE au pic des symptômes et à la phase chronique, qui est corrigée par le GSE. Par la suite, nous avons déterminé l'expression de cette protéine au niveau du cerveau et de la moelle épinière ; les résultats obtenus sont représentés dans la **Figure 54**.



**Figure 54 : Evaluation de l'expression de la catalase au niveau du cerveau et de la moelle épinière à J20 et J30 post-induction chez les souris EAE et leurs contrôles après un traitement curatif chronique à l'extrait de pépins de raisin**

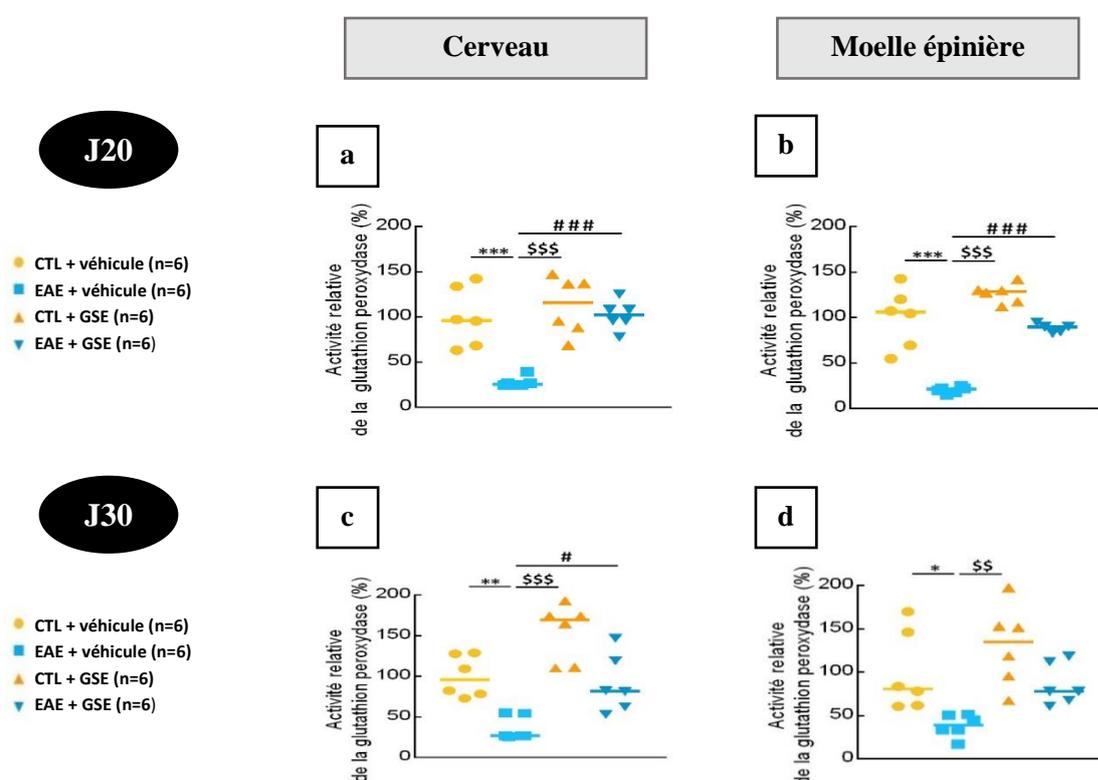
Dans le cerveau, une diminution de l'expression de la catalase a été observée dans le groupe EAE + véhicule par rapport au groupe CTL + véhicule (test de Tukey, 56%,  $p < 0,001$  à J20 et 41%,  $p < 0,05$  à J30). Un effet significatif corrigeant cette diminution a été observé suite autraitement curatif au GSE chez les souris EAE + GSE (test de Tukey,  $p < 0,001$  à J20 et  $p < 0,01$  à J30) (**Figures 54a** et **54c**).

Dans la moelle épinière, l'expression de la catalase a été significativement diminuée dans le groupe EAE + véhicule par rapport au groupe CTL + véhicule à J20 (test de Tukey, 50 %,  $p < 0,001$ ), avec une légère diminution non significative à J30 (test de Tukey, 26%,  $p = 0,06$ ). Le traitement curatif au GSE a permis de corriger de manière significative cette diminution à J20 (test de Tukey,  $p < 0,001$ ) (**Figures 54b** et **54d**).

Ces données suggèrent une diminution de l'expression de la CAT au pic des symptômes et à la phase chronique dans le cerveau et la moelle épinière des souris EAE avec un effet correcteur du GSE, même si les données obtenues dans le cerveau sont plus significatives que celles de moelle épinière, notamment à J30 durant la phase chronique.

### 3.3. Effet sur l'activité de la glutathion peroxydase et sur son expression protéique

Enfin, l'activité GPx a été évaluée par spectrophotométrie (mmol/mg de protéine/min) et les résultats sont exprimés en % d'activité relative de GPx en comparaison au groupe CTL + véhicule. Les résultats obtenus sont représentés dans la **Figure 55**.



**Figure 55 : Evaluation de l'activité glutathion peroxydase au niveau du cerveau et de la moelle épinière à J20 et J30 post-induction chez les souris EAE et leurs contrôles après un traitement curatif à l'extrait de pépins de raisin**

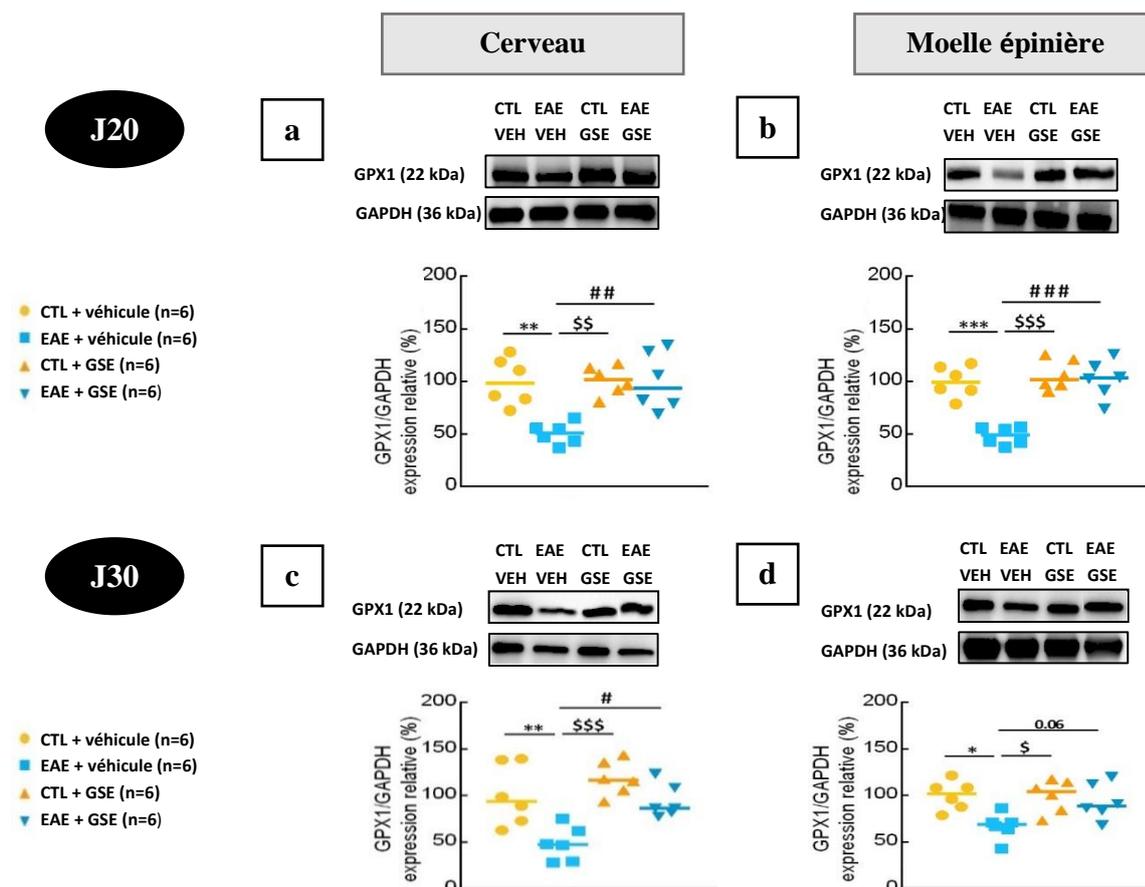
Dans le cerveau, l'activité GPx est diminuée dans le groupe EAE + véhicule (test de Tukey, 72%,  $p < 0,001$  à J20 et 70%,  $p < 0,01$  à J30) par rapport au groupe CTL + véhicule. Le traitement au GSE a permis de corriger de manière significative cette altération chez les souris EAE + GSE (test de Tukey,  $p < 0,001$  à J20 et  $p < 0,05$  à J30) (**Figures 55a et 55c**).

Des résultats similaires ont été obtenus dans la moelle épinière où l'activité GPx est diminuée dans le groupe EAE + véhicule par rapport au groupe CTL + véhicule (test de Tukey, 80%,

$p < 0,001$  à J20 et 62%,  $p < 0,05$  à J30). Le GSE corrige significativement cette altération chez les souris EAE + GSE (test de Tukey,  $p < 0,001$ ) à J20 (**Figures 55b et 55d**).

Ces données suggèrent une diminution de l'activité GPx au niveau du cerveau et la moelle épinière des souris EAE au pic des symptômes et à la phase chronique, qui est corrigé après traitement curatif au GSE principalement au pic des symptômes.

Par la suite, l'expression de l'isoforme GPX1 a été déterminée au niveau du cerveau et de la moelle épinière et les résultats obtenus sont illustrés dans la **Figure 56**.



**Figure 56 : Evaluation de l'expression de la GPX1 au niveau du cerveau et de la moelle épinière à J20 et J30 post-induction chez les souris EAE et leurs contrôles après un traitement curatif à l'extrait de pépins de raisin**

Au niveau du cerveau, une diminution de l'expression de GPX1 a été observée dans le groupe EAE + véhicule par rapport au groupe CTL + véhicule (test de Tukey, 49%,  $p < 0,01$  à J20 et 52%,  $p < 0,01$  à J30). Un effet significatif du traitement au GSE a été noté chez les souris EAE + GSE (test de Tukey,  $p < 0,01$  à J20 et  $p < 0,05$  à J30) (**Figures 56a et 56c**).

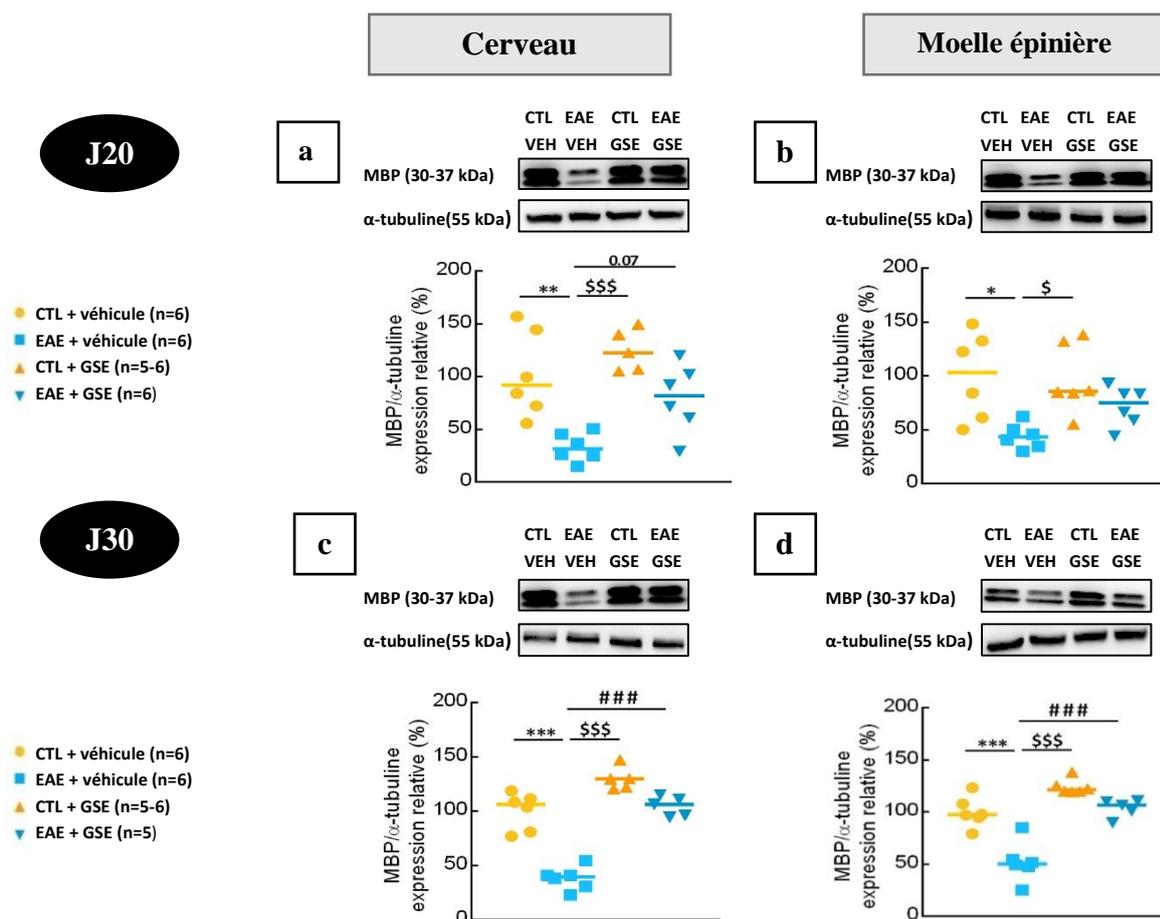
Dans la moelle épinière, une diminution de l'expression du GPX1 a été observée dans le groupe EAE + véhicule par rapport au groupe CTL + véhicule (test de Tukey, 52%,  $p < 0,001$  à

J20 et 33%,  $p < 0,05$  à J30). Le traitement curatif au GSE a restauré un niveau basal de GPX1 dans la moelle épinière des souris EAE + GSE de manière significative uniquement à J20 (test de Tukey,  $p < 0,001$ ), avec une légère diminution non significative à J30 (**Figures 56b et 56d**). Ces données suggèrent une diminution de l'expression du GPX1 au pic des symptômes et à la phase chronique au niveau du cerveau et de la moelle épinière des souris EAE avec un effet correcteur du GSE, même si les données obtenues dans le cerveau sont plus significatives que celles de la moelle épinière, notamment à J30.

#### **4. Evaluation protéique sur les marqueurs physiopathologiques de l'encéphalomyélite auto-immune expérimentale**

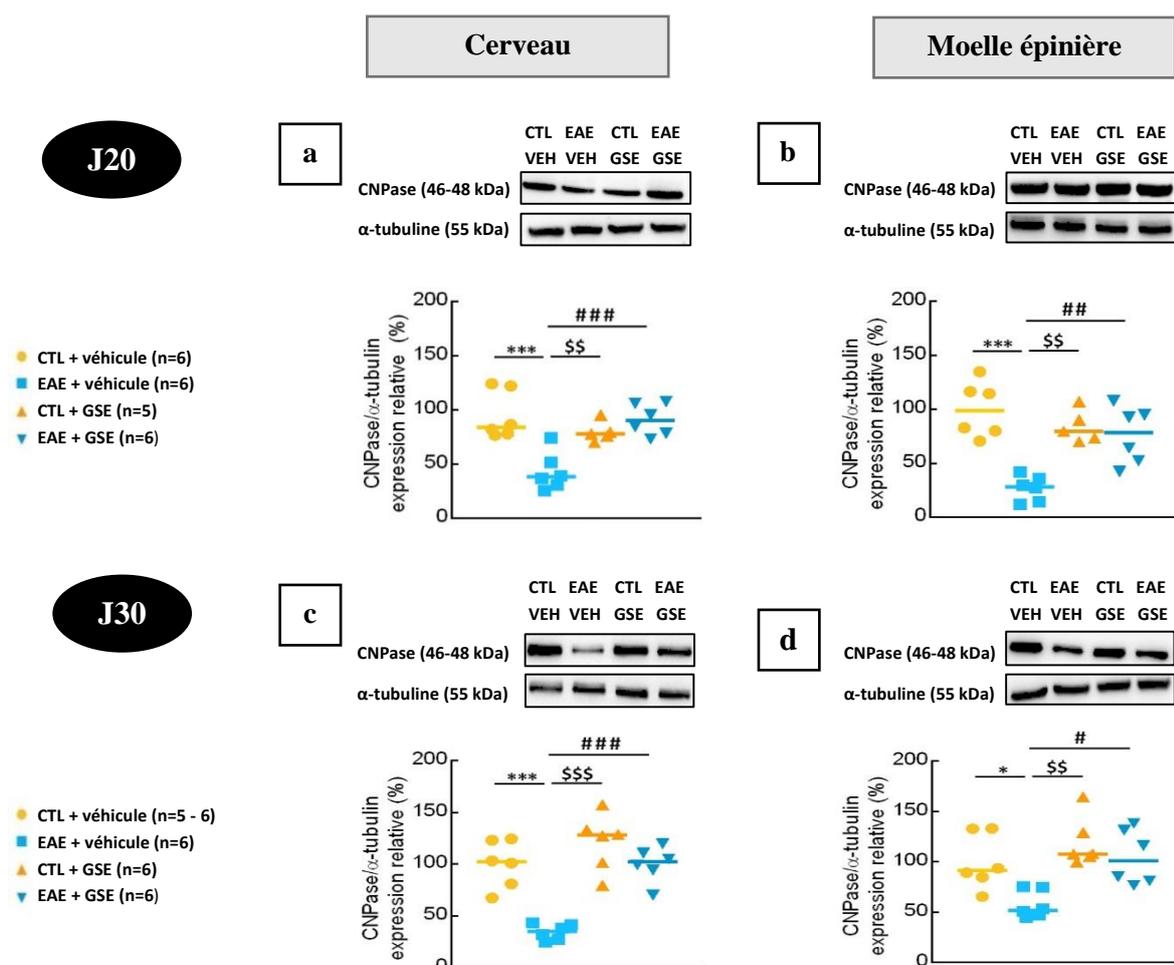
##### **4.1. Effet sur l'expression des protéines de myéline**

Dans le cerveau, l'expression de la MBP est diminuée dans le groupe EAE + véhicule par rapport au groupe CTL + véhicule (test de Tukey, 67%,  $p < 0,01$  à J20 et 62%,  $p < 0,001$  à J30) et le traitement curatif au GSE a significativement corrigé cette diminution dans le groupe EAE + GSE uniquement à J30 (test de Tukey,  $p < 0,001$ ) (**Figures 57a et 57c**). De même, dans la moelle épinière, l'expression de la MBP est diminuée dans le groupe EAE + véhicule par rapport au groupe CTL + véhicule (test de Tukey, 52%,  $p < 0,05$  à J20 et 48%,  $p < 0,001$  à J30) et le traitement au GSE a corrigé significativement cette altération dans le groupe EAE + GSE uniquement à J30 (test de Tukey,  $p < 0,001$ ) (**Figures 57b et 57d**).



**Figure 57 : Evaluation de l'expression de la protéine basique de la myéline au niveau du cerveau et de la moelle épinière à J20 et J30 post-induction chez les souris EAE et leurs contrôles après un traitement curatif à l'extrait de pépins de raisin**

Concernant l'expression de la CNPase, elle est diminuée dans le cerveau chez les souris EAE + véhicule (test de Tukey, 57%,  $p < 0,001$  à J20 et 66%,  $p < 0,001$  à J30) par rapport aux souris CTL + véhicule et le traitement au GSE a significativement corrigé cette altération chez les souris EAE + GSE souris aux J20 et J30 (test de Tukey,  $p < 0,001$ ) (**Figures 57a et 57c**). De même, au niveau de la moelle épinière, l'expression de la CNPase est diminuée chez les souris EAE + véhicule par rapport aux souris CTL + véhicule (test de Tukey, 73%,  $p < 0,001$  à J20 et 42%,  $p < 0,05$  à J30) et le traitement curatif au GSE a significativement corrigé ces altérations dans le groupe des souris EAE + GSE (test de Tukey,  $p < 0,01$  à J20 et  $p < 0,05$  à J30) (**Figures 57b et 57d**).



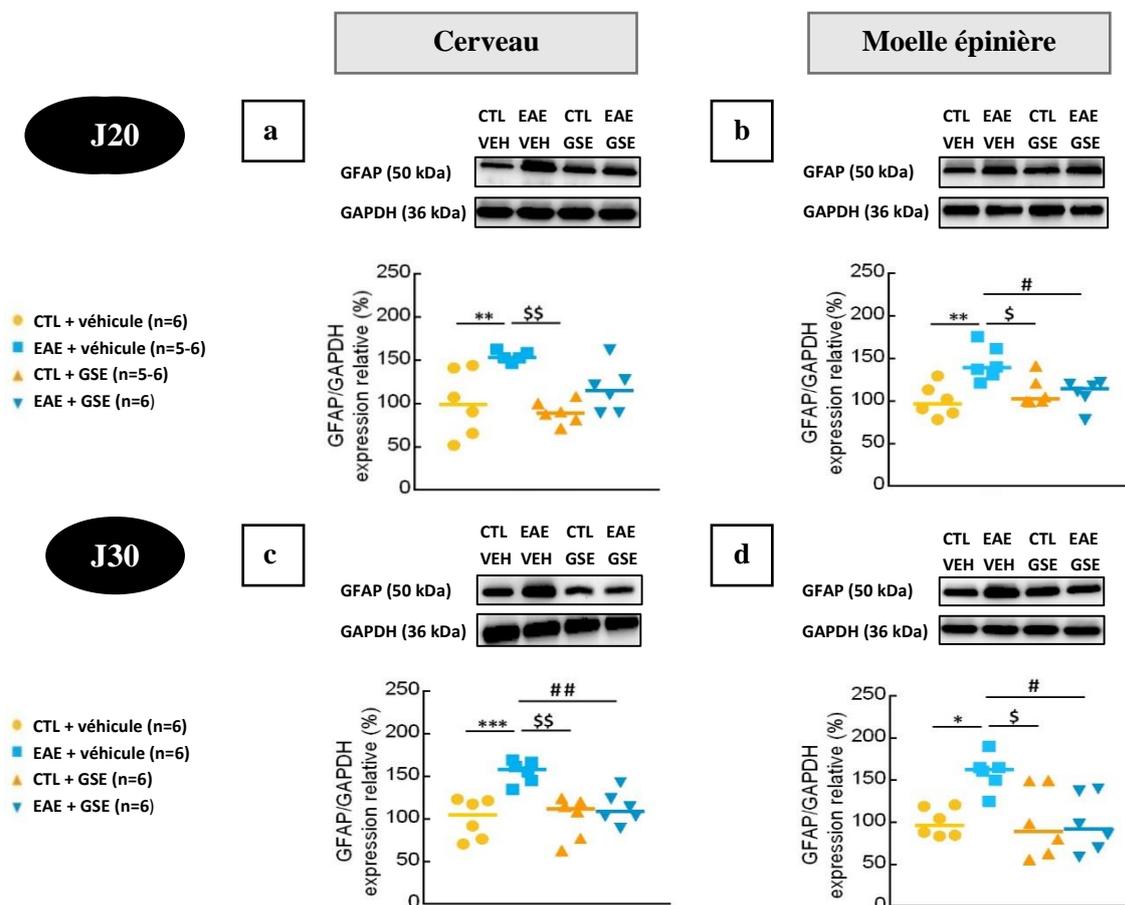
**Figure 58 : Evaluation de l'expression de la 2',3'-nucléotide cyclique 3'-phosphodiesterase au niveau du cerveau et de la moelle épinière à J20 et J30 post-induction chez les souris EAE et leurs contrôles après un traitement curatif à l'extrait de pépins de raisin**

Ces données montrent une diminution de l'expression de la MBP et de la CNPase dans le cerveau et la moelle épinière des souris EAE au pic des symptômes et à la phase chronique. Cette diminution est corrigée par le traitement curatif au GSE dès le pic des symptômes pour la CNPase et à partir de la phase chronique pour la MBP.

#### 4.2. Effet sur l'activation astrocytaire et microgliale

L'étude de l'activation astrocytaire a été réalisée par l'évaluation des niveaux d'expression de la protéine GFAP. Dans le cerveau, l'expression de GFAP est augmentée dans le groupe EAE + véhicule par rapport au groupe CTL + véhicule (test de Tukey, 47%,  $p < 0,01$  à J20 et 55%,  $p < 0,001$  à J30) et le traitement curatif au GSE a significativement corrigé cette altération chez les souris EAE + GSE uniquement à J30 (test de Tukey,  $p < 0,01$ ) (Figures 59a et 59c). Au niveau de la moelle épinière, l'expression de la GFAP est également augmentée dans le

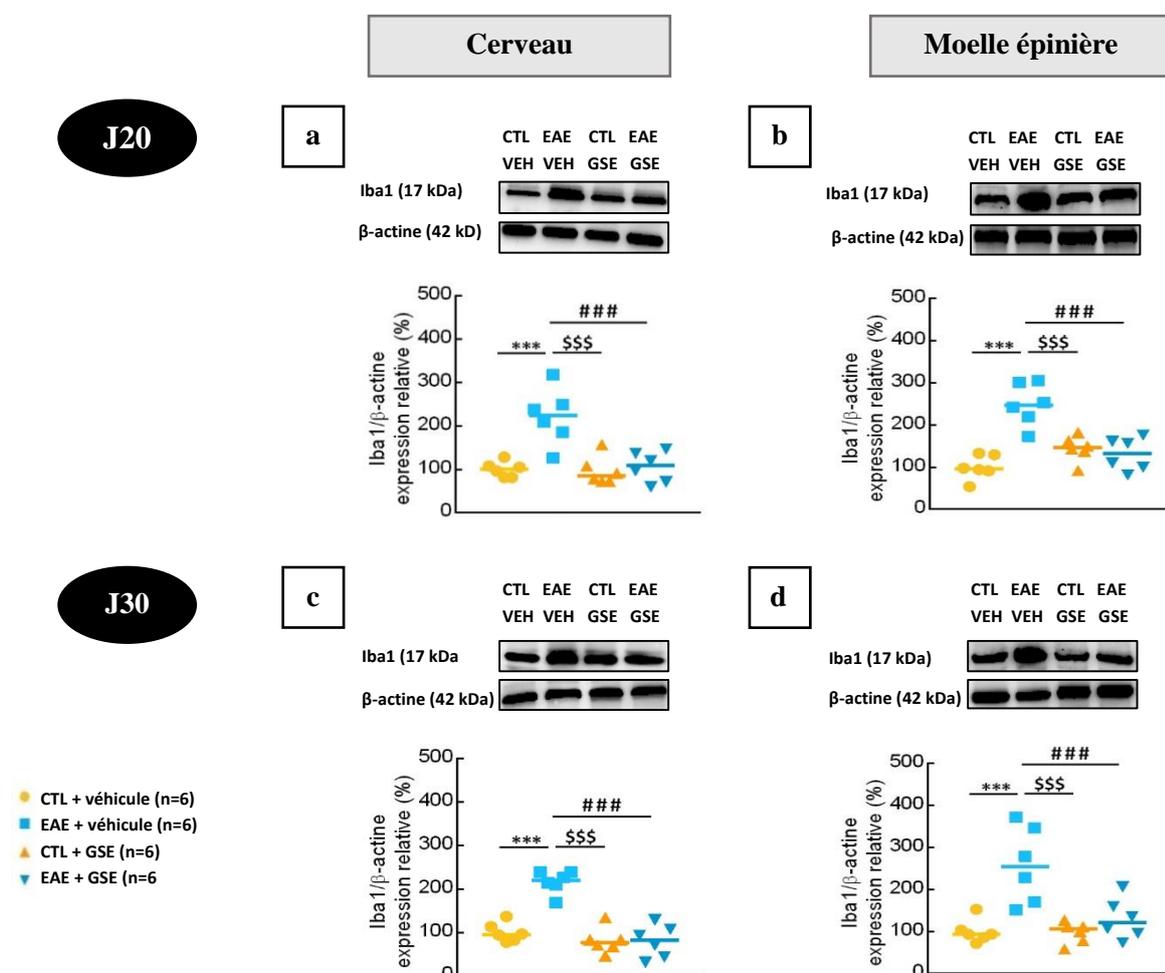
groupe EAE + véhicule par rapport au groupe CTL + véhicule (test de Tukey, 49%,  $p < 0,01$  à J20 et 59%,  $p < 0,05$  à J30) et le traitement curatif au GSE a significativement corrigé cette altération à J20 et J30 (test de Tukey,  $p < 0,05$ ) (**Figure 59b** et **59d**).



**Figure 59 : Evaluation de l'expression de la protéine acide fibrillaire gliale au niveau du cerveau et de la moelle épinière à J20 et J30 post-induction chez les souris EAE et leurs contrôles après un traitement curatif à l'extrait de pépins de raisin**

L'étude de l'activation microgliale a été réalisée par l'évaluation des niveaux d'expression de la protéine Iba1. Dans le cerveau, l'expression d'Iba1 est significativement augmentée dans le groupe EAE + véhicule par rapport au groupe CTL + véhicule (test de Tukey, 121%,  $p < 0,001$  à J20 et 116%,  $p < 0,001$  à J30) et le traitement GSE a significativement corrigé ces augmentations (test de Tukey,  $p < 0,001$  à J20 et J30) (**Figures 60a** et **60c**). Dans la moelle épinière, l'expression de l'Iba1 est également augmentée dans le groupe EAE + véhicule par rapport au groupe CTL + véhicule (test de Tukey, 149 %,  $p < 0,001$  à J20 et 158 %,  $p < 0,001$  à J30) et le traitement curatif au GSE a corrigé de manière significative ces altérations aux J20 et J30 (test de Tukey,  $p < 0,001$ ) (**Figures 60b** et **60d**).

Ces données suggèrent une augmentation de l'expression des protéines astrogliales et microgliales dans le cerveau et la moelle épinière des souris EAE au pic des symptômes et à la phase chronique. Cette augmentation est corrigée après traitement curatif au GSE dès la phase précoce et jusqu'à la phase chronique tardive pour la protéine microgliale (Iba1) et lors de la phase chronique pour la protéine astrogliale (GFAP).

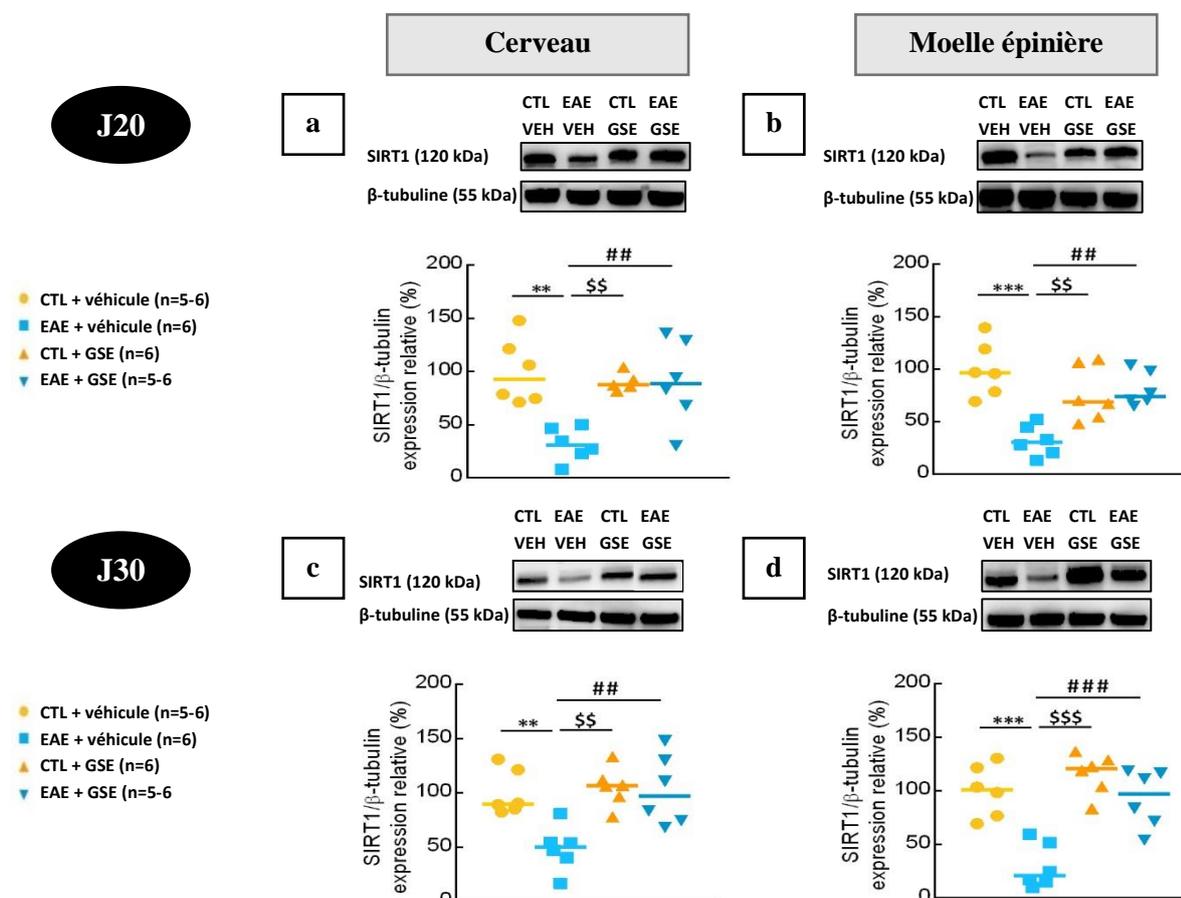


**Figure 60 : Evaluation de l'expression de la molécule adaptatrice de liaison au calcium ionisé 1 au niveau du cerveau et de la moelle épinière aux J20 et J30 post-induction chez les souris EAE et leurs contrôles après un traitement curatif à l'extrait de pépins de raisin**

#### 4.3. Effet sur l'expression des sirtuines

Dans le cerveau, l'expression de SIRT1 est significativement diminuée chez les souris EAE + véhicule par rapport aux souris CTL + véhicule (test de Tukey, 68%,  $p < 0,01$  à J20 et 69%,  $p < 0,01$  à J30) et le GSE a permis de corriger significativement ces altérations chez les souris EAE + GSE (test de Tukey,  $p < 0,01$  à J20 et J30) (**Figures 61a et 61d**). Dans la moelle épinière, l'expression de SIRT1 est diminuée chez les souris EAE + véhicule par rapport aux souris CTL + véhicule (test de Tukey, 68%,  $p < 0,001$  à J20 et 70%,  $p < 0,001$  à J30) et le GSE a

permissederétablir significativement ces altérations chez les souris EAE + GSE (test de Tukey,  $p < 0,01$  à J20 et  $0,001$  à J30) (**Figures 61b et 61d**).

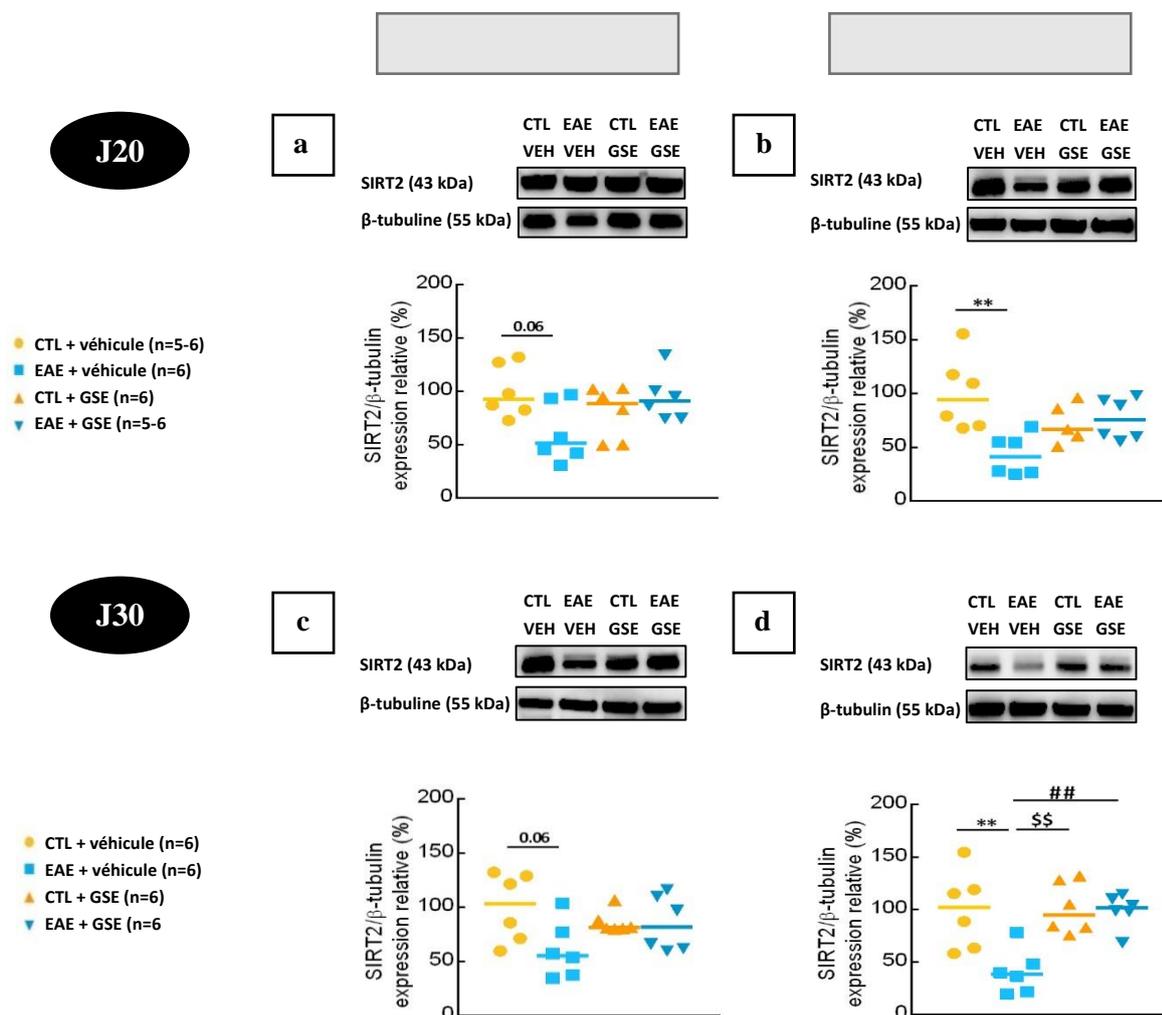


**Figure 61** : Evaluation de l'expression de la sirtuine 1 au niveau du cerveau et de la moelle épinière aux J20 et J30 post-induction chez les souris EAE et leurs contrôles après un traitement curatif à l'extrait de pépins de raisin

Dans le cerveau, aucune différence statistique des niveaux d'expression de SIRT2 n'a été observée entre les groupes au pic des symptômes (J20) et lors de la phase chronique (J30) (**Figures 62a et 62c**). Au contraire, dans la moelle épinière, une diminution de l'expression de SIRT2 a été observée chez les souris EAE + véhicule par rapport aux souris CTL + véhicule (test de Tukey, 56%,  $p < 0,01$  à J20 et 59%,  $p < 0,01$  à J30). Le traitement curatif au GSE a permis de corriger de manière significative cette altération chez les souris EAE + GSE à J30 uniquement ( $p < 0,01$ ) (**Figures 62b et 62d**).

Ces données montrent clairement un effet différentiel du GSE sur les deux isoformes SIRT1 et SIRT2 en fonction du stade de la pathologie. En effet, une diminution de l'expression de la protéine SIRT1 est observée au niveau du cerveau et de la moelle épinière chez les souris EAE au pic des symptômes et à la phase chronique et a été corrigée par le GSE alors qu'une diminution de l'expression de SIRT2 a été observée uniquement au niveau de la moelle

épinière chez les souris EAE + CTL depuis le pic des symptômes jusqu'à la phase chronique avec un effet correctif du GSE uniquement lors de la phase chronique.



**Figure 62 : Evaluation de l'expression de la sirtuine 2 au niveau du cerveau et de la moelle épinière aux J20 et J30 post-induction chez les souris EAE et leurs contrôles après un traitement curatif à l'extrait de pépins de raisin**

## 5. Etude protéomique

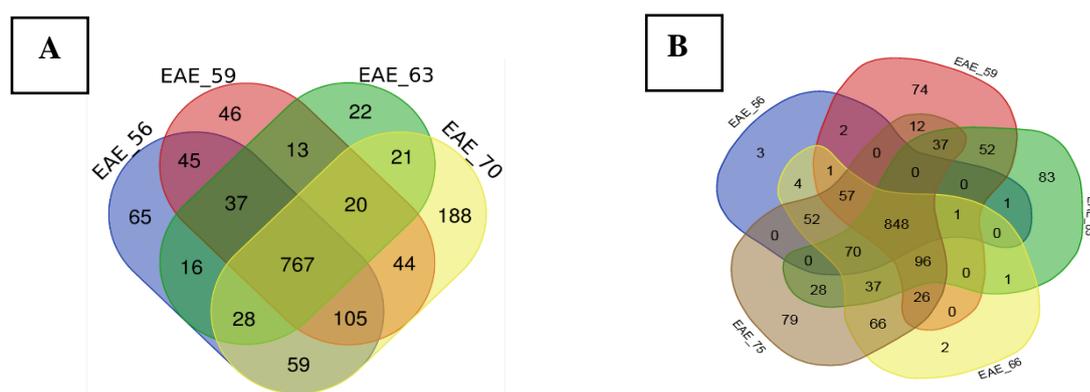
### 5.1. Identification des protéines

Le nombre de protéines identifiées dans chaque groupe ainsi que le pourcentage de reproductibilité au sein du même groupe sont représentés dans le tableau suivant (**Tableau 24**).

**Tableau 24 : Nombre de protéines identifiées et pourcentage de reproductibilité au niveau du cerveau et de la moelle épinière**

	Groupe	Cerveau (n=4)	Moelle épinière (n=5)
<b>Nombre des protéines totales identifiées</b>	<b>CTL + véhicule</b>	1377	1635
	<b>EAE + véhicule</b>	1486	1632
	<b>CTL + GSE</b>	1351	1830
	<b>EAE + GSE</b>	1442	1742
<b>Reproductibilité R (%)</b>	<b>CTL + véhicule</b>	72	68
	<b>EAE + véhicule</b>	70	69
	<b>CTL + GSE</b>	71	70
	<b>EAE + GSE</b>	70	68

Les résultats d'identification des protéines totales dans chaque échantillon ne montrent pas de différence significative concernant le nombre de protéines identifiées entre les différents groupes d'études, à savoir le cerveau ou la moelle épinière. De même, les pourcentages de reproductibilité sont très proches entre les groupes. Ainsi, les protéines identifiées dans chaque groupe et dans chaque échantillon sont représentées dans les diagrammes de Venn (**Figure 63**).



**Figure 63 : Diagramme de Venn de l'intersection des protéines identifiées dans le cerveau (A) et la moelle épinière (B) des souris EAE + véhicule**

Chaque souris est représentée par une couleur (exemple : en bleu, souris EAE\_56) ; les intersections entre souris représentent les protéines communément exprimées (exemple : 767 est le nombre de protéines exprimées en commun dans tous les échantillons de moelle EAE + véhicule).

Ces diagrammes représentent un exemple de propagation des protéines au sein du groupe EAE au niveau du cerveau (**Figure 63A**) et de la moelle épinière (**Figure 63B**).

Le nombre de protéines retrouvées exprimées en commun dans toutes :

- les souris CTL + véhicule est de 556 au niveau Du cerveau et de 799 au niveau de la moelle épinière ;
- les souris EAE + véhicule est de 767 au niveau du cerveau et de 848 au niveau de la moelle épinière ;
- les souris CTL + GSE est de 728 au niveau du cerveau et de 849 au niveau de la moelle épinière ;
- les souris EAE + GSE est de 514 au niveau du cerveau et de 751 au niveau de la moelle épinière.

### 5.2. Analyse quantitative globale et ciblée

Les résultats de l'analyse quantitative montrent que le nombre de protéines dérégulées entre les quatre groupes est plus important au niveau du cerveau qu'au niveau de la moelle épinière mais avec des facteurs multiplicateurs (fold changes) d'amplitude équivalente (**Tableau 25**).

**Tableau 25 : Nombre de protéines dont l'abondance a été affectée au niveau du cerveau et de la moelle épinière**

	Cerveau (n=16)	Moelle épinière (n=20)
<b>Nombre total de protéines identifiées</b>	1493	1720
<b>Nombres de protéines dérégulées (p-value &lt; 0,05 et peptide &gt; 1)</b>	105	41
<b>Facteur multiplicateur</b>	Entre 1,3 et 5,6	Entre 1,2 et 5,8

Dans ce travail, ne seront présentées que : 1) les comparaisons entre les souris CTL + véhicule et EAE + véhicule afin d'identifier les protéines dont l'abondance a été affectée par l'EAE, considérées comme le pool 1 ;2) les comparaisons entre les souris EAE + VEH et EAE + GSE afin d'identifier les protéines dont l'abondance a été affectée par le traitement curatif au GSE, considérées comme le pool 2.

Le nombre des protéines dérégulées sont représentées dans le tableau suivant (**Tableau 26**).

**Tableau 26 : Nombre de protéines dérégulées au niveau du cerveau et de la moelle épinière en comparant les groupes deux à deux**

	Cerveau (n=8)		Moelle épinière (n=10)	
	Nombres de protéines dérégulées (p-value < 0,05 et peptide > 1)	Facteur multiplicateur	Nombres de protéines dérégulées (p-value < 0,05 et peptide > 1)	Facteur multiplicateur
<b>CTL + véhicule vs EAE + véhicule</b>	89	Entre 1,3 et 8,8	12	Entre 1,2 et 3,3
<b>EAE + véhicule vs EAE + GSE</b>	29	Entre 1,1 et 2,4	54	Entre 1,1 et 1,6

Au niveau du cerveau, la comparaison entre le groupe CTL + véhicule et le groupe EAE + véhicule montre que 64 protéines sont sous-exprimées et que 25 protéines sont sur-exprimées (**Tableau 27**). Parmi les protéines sous-exprimées, la desmoplakine (DESP), la protéine régulatrice de la calmoduline PCP4 (PCP4), la sous-unité epsilon de l'ATP synthase (ATP5E) et la neurogranine sont celles pour lesquelles le facteur multiplicateur est le plus élevé. Parmi les protéines sur-exprimées, l'hème oxygénase 2 (HMOX2), le domaine PI-PLCX contenant la protéine 3 (PLCX3), la protéine de liaison au sous-composant Q du composant 1 du complément (C1QBP) et la protéine similaire à la méthyltransférase 26 (MTL26) sont celles pour lesquelles le facteur multiplicateur est le plus élevé (**Tableau 27**).

La comparaison entre le groupe EAE + véhicule et le groupe EAE + GSE montre que 8 protéines sont sous-exprimées et que 21 protéines sont sur-exprimées (**Tableau 28**). Parmi les protéines sous-exprimées, la synapsine 2 (SYN2), la coronine 1A (COR1A), la succinate-semialdéhyde déshydrogénase (SSDH) et de la chaîne légère des neurofilaments (NFL) sont celles pour lesquelles le facteur multiplicateur est le plus élevé. Parmi les protéines sur-exprimées, la DESP, la protéine 1 à quatre domaines LIM et demi, la monoacylglycérol lipase (ABHD6) et la NADH-cytochrome b5 réductase 1 sont celles pour lesquelles le facteur multiplicateur est le plus élevé (**Tableau 28**).

Au niveau de la moelle épinière, la comparaison entre le groupe CTL + véhicule et le groupe EAE + véhicule montre que 11 protéines sont sous-exprimées et que 1 protéine est sur-exprimée (**Tableau 29**). Parmi les protéines sous-exprimées, la kératine kinase type M (KCRM), l'anhydrase carbonique 3 (CAH3), la bléomycine hydrolase (BLMH) et l'homologue de DnaJ de sous-famille A (DNJA1) sont celles pour lesquelles le facteur

multiplicateur est le plus élevé. Alors que la matrine-3 (MATR3) est la seule protéine sur-exprimée (**Tableau 29**).

La comparaison entre le groupe EAE + véhicule et le groupe EAE + GSE montre que 19 protéines sont sous-exprimées et que 35 protéines sont sur-exprimées (**Tableau 30**). Parmi les protéines sous-exprimées, la sous-unité Tim 29 de la membrane interne de la translocase (TIM29), la protéine Rab-6B liée à Ras (RAB6B), la céramidase (ASAH1) et l'homologue B du tri des protéines vacuolaires 26 (VP26B) sont celles pour lesquelles le facteur multiplicateur est le plus élevé. Parmi les protéines sur-exprimées, la transportine- 2 (TNPO), le peptidyl-prolyl cis-trans isomérase (FKBP2), la protéine 4 liée à la dihydropyrimidinase(DPYL4) et la protéine à motif tripartite 2 (TRIM2) sont celles pour lesquelles le facteur multiplicateur est le plus élevé (**Tableau 30**).

**Tableau 27: Protéines dont les niveaux d'expressions sont modifiés au niveau du cerveau des souris EAE + véhicule en comparaison aux souris CTL + véhicule**

Sont représentés dans des lignes bleues les protéines sous-exprimées chez les souris EAE + véhicule et dans les lignes saumon, les protéines sur-exprimées.

Accession	Uniprot ID	Description	CTL + véhicule	EAE + véhicule	Fonction moléculaire	Anova valeur de p	Facteur multipli-cateur
DESP	E9Q557	Desmoplakin	9,70E+04±1,48E+04	1,10E+04±4,16E+03	Growth factor a	3,34E-02	8,82
PCP4	P63054	Calmodulin regulator protein PCP4	2,78E+06±2,00E+06	9,01E+05±1,26E+06	Binding	2,14E-02	3,08
ATP5E	P56382	ATP synthase subunit epsilon, mitochondrial	1,71E+06±8,47E+04	6,02E+05±1,57E+04	Hydrolase	4,21E-03	2,83
NDUA2	Q9CQ75	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 2	1,26E+06±3,20E+05	4,83E+05±1,48E+05	Accessory	3,64E-02	2,61
NEUG	P60761	Neurogranin	2,42E+05±6,41E+04	9,45E+04±1,69E+03	Calmodulin-binding	3,02E-02	2,56
COX6C	Q9CPQ1	Cytochrome c oxidase subunit 6C	4,00E+06±9,82E+05	1,66E+06±2,63E+05	Phosphorylation	3,25E-02	2,41
TIM9	Q9WV98	Mitochondrial import inner membrane translocase subunit Tim9	4,75E+05±4,12E+04	2,08E+05±1,96E+04	Binding	3,30E-02	2,29
NTF2	P61971	Nuclear transport factor 2	2,92E+05±5,55E+04	1,32E+05±1,84E+04	BindingTransport	1,72E-02	2,21
ATP5I	Q06185	ATP synthase subunit e, mitochondrial	7,93E+06±1,58E+05	3,58E+06±6,24E+04	Binding	4,62E-02	2,21
ATIF1	O35143	ATPase inhibitor, mitochondrial	8,85E+06±9,48E+04	4,04E+06±3,05E+04	Binding	1,51E-02	2,19
GBG12	Q9DAS9	Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(O) subunit gamma-12	5,40E+05±5,62E+04	2,53E+05±1,93E+04	Binding	1,38E-02	2,13
NDUS6	P52503	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 6, mitochondrial	2,83E+06±8,21E+04	1,35E+06±4,43E+04	Accessory	4,83E-02	2,09

ANXA2	P07356	Annexin A2	2,66E+05±1,54E+04	1,29E+05±1,21E+04	Binding	7,05E-03	2,06
ACO13	Q9CQR4	Acyl-coenzyme A thioesterase 13	2,85E+06±5,61E+03	1,40E+06±2,10E+05	Hydrolase	4,18E-02	2,03
GBG3	P63216	Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(O) subunit gamma-3	4,95E+05±6,56E+04	2,51E+05±2,23E+04	Transducer	2,62E-02	1,97
COX5A	P12787	Cytochrome c oxidase subunit 5A, mitochondrial	1,32E+07±5,04E+04	6,72E+06±2,20E+04	Binding	2,94E-02	1,96
AKA7A	O55074	A-kinase anchor protein 7 isoform alpha	2,96E+05±5,13E+04	1,52E+05±2,66E+04	Binding	4,45E-02	1,94
RS27A	P62983	Ubiquitin-40S ribosomal protein S27a	2,35E+07±2,71E+05	1,23E+07±2,24E+04	Binding	3,28E-02	1,91
TPC6B	O55013	Trafficking protein particle complex subunit 6B	2,21E+05±2,97E+04	1,19E+05±1,65E+04	Transport	2,12E-02	1,85
UBL4A	P21126	Ubiquitin-like protein 4A	3,42E+05±1,74E+05	1,86E+05±6,61E+04	Binding	4,28E-02	1,84
RL14	Q9CR57	60S ribosomal protein L14	3,80E+05±8,02E+04	2,09E+05±2,89E+04	Structural	4,08E-02	1,81
RS14	P62264	40S ribosomal protein S14	2,25E+06±2,35E+06	1,25E+05±4,39E+03	BindingStructural	3,51E-02	1,80
NDUA7	Q9Z1P6	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 7	3,38E+06±6,95E+06	1,88E+06±3,72E+06	Structural	2,90E-02	1,79
VTI1A	O89116	Vesicle transport through interaction with t-SNAREs homolog 1A	2,65E+05±4,74E+03	1,48E+05±1,51E+03	Binding	4,49E-02	1,78
SAP	Q61207	Prosaposin	3,80E+05±1,11E+05	2,16E+05±6,48E+04	Development	2,45E-02	1,76
CYB5	P56395	Cytochrome b5	2,23E+06±7,57E+05	1,27E+06±2,19E+05	Binding	2,98E-02	1,76
HBA	P01942	Hemoglobin subunit alpha	3,95E+07±7,33E+05	2,25E+07±1,54E+05	Blood-relatedBinding	4,81E-02	1,76
COTL1	Q9CQI6	Coactosin-like protein	2,46E+06±3,92E+05	1,43E+06±1,50E+05	BindingChaperone	4,76E-03	1,72

MPC1	P63030	Mitochondrial pyruvate carrier 1	3,57E+05±8,47E+04	2,09E+05±8,63E+03	Transport	1,66E-02	1,71
F241B	Q9D882	Uncharacterized protein FAM241B	8,35E+04±1,28E+04	4,92E+04±5,86E+02	Homeostasis	1,40E-02	1,70
RS27L	Q6ZWY3	40S ribosomal protein S27-like	3,99E+05±3,71E+04	2,40E+05±1,75E+04	Binding	4,56E-03	1,66
NLTP	P32020	Sterol carrier protein 2	4,13E+06±6,05E+03	2,51E+06±2,55E+04	Binding	4,46E-02	1,65
GBG2	P63213	Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(O) subunit gamma-2	1,09E+06±3,84E+05	6,57E+05±7,16E+04	Binding	3,32E-02	1,65
RIDA	P52760	2-iminobutanoate/2-iminopropanoate deaminase	1,97E+06±4,49E+04	1,19E+06±1,81E+04	Hydrolase	5,23E-03	1,65
RM22	Q8BU88	39S ribosomal protein L22, mitochondrial	6,59E+04±1,11E+04	4,01E+04±1,80E+03	Structural	3,08E-02	1,64
NDUV3	Q8BK30	NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 3, mitochondrial	2,11E+06±5,92E+04	1,29E+06±2,07E+03	Transport	2,93E-02	1,64
RS18	P62270	40S ribosomal protein S18	9,48E+05±1,63E+05	5,89E+05±7,08E+04	Binding	7,50E-03	1,61
PGAM5	Q8BX10	Serine/threonine-protein phosphatase PGAM5, mitochondrial	1,52E+06±3,81E+05	9,51E+05±2,88E+03	Hydrolase	1,54E-02	1,59
CH10	Q64433	10 kDa heat shock protein, mitochondrial	4,43E+06±2,61E+06	2,81E+06±7,24E+05	BindingChaperone	2,40E-02	1,58
H4	P62806	Histone H4	1,11E+07±8,21E+04	7,06E+06±4,41E+04	Binding	2,82E-03	1,57
LSM8	Q6ZWM4	U6 snRNA-associated Sm-like protein LSm8	2,72E+05±6,36E+04	1,76E+05±3,04E+04	Binding	3,13E-02	1,55
VPS29	Q9QZ88	Vacuolar protein sorting-associated protein	1,15E+06±3,21E+05	7,42E+05±5,22E+04	Binding	4,25E-02	1,55
H3C	P02301	Histone H3.3C	6,96E+06±1,40E+05	4,48E+06±1,40E+04	Binding	2,14E-03	1,55
NDUA5	Q9CPP6	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 5	1,34E+06±1,94E+05	8,84E+05±8,32E+04	Transport	1,14E-02	1,52

CYC	Q9D0M3	Cytochrome c, somatic	6,65E+06±7,67E+05	4,36E+06±4,03E+05	BindingTranslocase	4,37E-02	1,52
H2A1B	C0HKE1	Histone H2A type 1-B	1,90E+07±1,30E+05	1,26E+07±8,29E+04	Binding	3,01E-02	1,51
UB2D3	P61079	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 D3	1,05E+06±1,77E+05	6,98E+05±3,38E+04	Binding	2,51E-02	1,50
LSM3	P62311	U6 snRNA-associated Sm-like protein LSm3	2,59E+05±2,19E+04	1,76E+05±1,60E+04	Binding	2,52E-02	1,47
FGOP2	Q9CRA9	FGFR1 oncogene partner 2 homolog	7,84E+04±9,98E+03	5,33E+04±4,64E+03	Binding	4,27E-02	1,47
C1QC	Q02105	Complement C1q subcomponent subunit C	6,27E+05±1,21E+05	4,25E+05±2,44E+04	Immunity response	2,42E-02	1,47
FUND2	Q9D6K8	FUN14 domain-containing protein 2	3,14E+05±2,95E+04	2,16E+05±1,30E+04	Binding	1,82E-02	1,45
GHC2	Q9DB41	Mitochondrial glutamate carrier 2	6,14E+05±4,25E+06	4,22E+05±1,14E+06	Transport	3,30E-02	1,45
KCC2A	P11798	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II subunit alpha	1,36E+06±6,29E+04	9,41E+05±3,60E+04	BindingKinaseTran sferase	3,99E-02	1,45
RAC1	P63001	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1	7,74E+06±5,63E+05	5,46E+06±1,62E+05	BindingHydrolase	2,87E-02	1,42
NDUF3	Q9JKL4	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex assembly factor 3	2,42E+05±1,86E+04	1,71E+05±9,78E+03	Assembly	1,12E-02	1,41
RL34	Q9D1R9	60S ribosomal protein L34	2,31E+05±1,04E+05	1,66E+05±9,23E+04	Structural	7,99E-03	1,39
QCR1	Q9CZ13	Cytochrome b-c1 complex subunit 1 mitochondrial	2,13E+05±1,73E+04	1,56E+05±5,62E+03	Binding	1,49E-02	1,37
PPAC	Q9D358	Low molecular weight phosphotyrosine protein phosphatase	8,36E+05±1,00E+05	6,18E+05±7,11E+04	Protein phosphatase	2,61E-02	1,35
PP2BA	P63328	Serine/threonine-protein phosphatase 2B catalytic subunit alpha isoform	5,24E+05±6,35E+04	3,90E+05±1,79E+04	BindingHydrolaseP rotein phosphatase	4,69E-02	1,35
RB11B	Q15907	Ras-related protein Rab-11B	3,28E+06±8,14E+05	2,47E+06±3,42E+05	BindingHydrolase	3,95E-02	1,33

ACYP1	P56376	Acylphosphatase-1	5,91E+05±9,48E+03	4,47E+05±1,23E+04	Hydrolase	2,05E-02	1,32
ALR	P56213	FAD-linked sulfhydryl oxidase ALR	1,78E+05±3,33E+04	1,36E+06±1,43E+04	Oxidase	2,11E-02	1,31
ODPA	P35486	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha, somatic form, mitochondrial	2,26E+05±3,51E+04	1,74E+05±1,23E+04	Oxidoreductase	3,34E-02	1,30
CRK	Q64010	Adapter molecule crk	1,15E+06±8,97E+05	8,84E+05±1,75E+05	Binding	2,47E-02	1,30
HMOX2	O70252	Heme oxygenase 2	1,89E+04±3,83E+03	1,07E+05±3,36E+03	Hydrolase	6,43E-03	5,63
PLCX3	Q8BLJ3	PI-PLC X domain-containing protein 3	7,33E+04±6,40E+03	1,89E+05±6,42E+03	Hydrolase Transducer	2,21E-02	2,58
C1QBP	O35658	Complement component 1 Q subcomponent-binding protein, mitochondrial	2,49E+05±3,13E+04	5,79E+05±2,66E+04	Binding	5,46E-03	2,33
MTL26	Q9DCS2	Methyltransferase-like 26	1,11E+05±9,09E+03	2,47E+05±1,28E+04	Unknown	1,55E-04	2,22
RM04	Q9DCU6	39S ribosomal protein L4, mitochondrial	3,01E+04±1,51E+02	6,56E+04±7,24E+03	Structural	2,04E-02	2,18
ARMC1	Q9D7A8	Armadillo repeat-containing protein 1	4,91E+04±8,85E+03	1,04E+05±6,67E+03	Binding	4,34E-02	2,13
KCIP4	Q6PHZ8	Kv channel-interacting protein 4	5,96E+04±1,10E+03	1,22E+05±5,33E+03	Ion channel	2,04E-02	2,04
LRC59	Q922Q8	Leucine-rich repeat-containing protein	1,06E+05±4,59E+03	2,10E+05±3,30E+04	Oxidoreductase	2,75E-04	1,98
PDZ11	Q9CZG9	PDZ domain-containing protein 11	5,49E+04±1,25E+03	1,08E+05±9,12E+03	Binding	2,22E-02	1,97
NDUB9	Q9CQJ8	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 9	8,45E+05±1,20E+03	1,66E+06±1,35E+05	Accessory	4,10E-02	1,97
TTC19	Q8CC21	Tetratricopeptide repeat protein 19, mitochondrial	4,77E+04±1,19E+03	9,02E+04±7,83E+03	Assembly	1,10E-02	1,89
EFTU	P10126	Elongation factor Tu, mitochondrial	5,18E+04±5,69E+03	9,25E+04±6,09E+03	Elongation factor	2,66E-02	1,78

HDHD2	Q3UGR5	Haloacid dehalogenase-like hydrolase domain-containing protein 2	3,09E+05±2,25E+03	5,20E+05±1,88E+04	Binding	4,99E-02	1,68
ISOC1	Q91V64	Isochorismatase domain-containing protein 1	1,08E+05±3,06E+03	1,80E+05±1,30E+04	Unknown	4,07E-02	1,66
PGK1	P09411	Phosphoglycerate kinase 1	1,51E+05±8,26E+03	2,45E+05±2,46E+04	Kinase Transferase	3,71E-03	1,62
CHP3	Q9JKL5	Calcineurin B homologous protein 3	7,67E+04±1,39E+03	1,22E+05±6,38E+04	Protein kinase inhibitor	3,96E-02	1,59
DRS7B	Q99J47	Dehydrogenase/reductase SDR family member 7B	5,81E+04±1,87E+03	8,84E+04±1,24E+04	Oxidoreductase	1,70E-02	1,52
DNM1L	Q8K1M6	Dynamin-1-like protein	3,19E+04±2,80E+03	4,83E+04±9,44E+03	Hydrolase	1,80E-02	1,51
STX1A	O35526	Syntaxin-1A	2,73E+06±1,24E+05	4,04E+06±4,04E+04	Binding	7,18E-03	1,48
UBE2K	P61087	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 K	4,84E+05±1,12E+04	6,67E+05±1,86E+04	Transferase	1,72E-02	1,38
PDCD6	P12815	Programmed cell death protein 6	3,91E+05±2,40E+03	5,41E+05±9,81E+04	Binding	1,50E-02	1,38
PPTC7	Q6NVE9	Protein phosphatase PTC7 homolog	6,14E+04±5,78E+03	8,42E+04±8,31E+03	Hydrolase Protein phosphatase	3,42E-03	1,37
FA49B	Q921M7	CYFIP-related Rac1 interactor B	1,52E+06±3,41E+04	2,05E+06±2,18E+04	Binding	2,47E-02	1,35
CBR3	Q8K354	Carbonyl reductase [NADPH] 3	3,84E+05±3,41E+04	5,05E+05±2,18E+04	Oxidoreductase	2,51E-02	1,32

**Tableau 28 : Protéines dont les niveaux d'expressions sont modifiés au niveau du cerveau des souris EAE + véhicule en comparaison aux souris EAE + GSE**

Sont représentés dans des lignes bleues les protéines sous-exprimées chez les souris EAE + GSE et dans les lignes saumon, les protéines sur-exprimées.

Accession	Uniprot ID	Description	EAE + véhicule	EAE + GSE	Fonction moléculaire	Anova valeur de p	Facteur multipli-cateur
SYN2	Q64332	Synapsin-2	5,01E+05±2,21E+04	3,42E+05±3,54E+04	Binding	1,13E-02	1,47
COR1A	O89053	Coronin-1A	8,68E+04±7,80E+03	5,97E+04±6,89E+03	Binding	4,31E-02	1,45
SSDH	Q8BWF0	Succinate-semialdehyde dehydrogenase, mitochondrial	1,02E+05±1,18E+04	7,17E+04±4,74E+03	Binding	4,74E-02	1,42
NFL	P08551	Neurofilament light polypeptide	2,32E+05±2,19E+04	1,65E+05±4,44E+03	Binding	2,44E-02	1,40
SMAP2	Q7TN29	Stromal membrane-associated protein 2	8,49E+04±3,02E+03	6,22E+04±3,90E+03	Activator	4,98E-03	1,37
EFTU	P10126	Elongation factor Tu, mitochondrial	9,25E+04±6,67E+03	6,84E+04±4,62E+03	Elongation factor	2,40E-02	1,35
PGK1	P09411	Phosphoglycerate kinase 1	2,45E+05±1,86E+04	1,85E+05±8,91E+03	Kinase	2,03E-02	1,32
CHP3	Q9JKL5	Calcineurin B homologous protein 3	1,22E+05±7,83E+03	9,42E+04±6,37E+03	Kinase inhibitor	3,24E-02	1,30
DESP	E9Q557	Desmoplakin	1,10E+04±2,07E+03	2,66E+04±3,01E+03	Binding	6,53E-03	2,41
FHL1	P97447	Four and a half LIM domains protein 1	2,45E+05±3,90E+04	4,33E+05±4,99E+04	Developmental protein	4,30E-02	1,77
ABHD6	Q8R2Y0	Monoacylglycerol lipase ABHD6	6,89E+04±9,58E+03	1,13E+05±8,74E+03	Hydrolase	2,82E-02	1,64
NB5R1	Q9DB73	NADH-cytochrome b5 reductase 1	2,85E+05±2,41E+04	4,10E+05±1,65E+04	Oxidoreductase	7,99E-03	1,44

BIEA	Q9CY64	Biliverdin reductase A	2,98E+05±2,77E+04	4,22E+05±3,09E+04	Oxidoreductase	1,98E-02	1,42
PSA6	Q9QUM9	Proteasome subunit alpha type-6	8,82E+05±8,59E+04	1,24E+06±1,06E+05	Binding	4,77E-02	1,41
PSA3	O70435	Proteasome subunit alpha type-3	8,53E+05±6,80E+04	1,20E+06±8,99E+04	Proteolytic	1,99E-02	1,40
RS27L	Q6ZWY3	40S ribosomal protein S27-like	2,40E+05±1,75E+04	3,33E+05±1,78E+04	Structural	1,01E-02	1,39
RACK1	P68040	Receptor of activated protein C kinase 1	6,44E+05±7,65E+04	8,88E+05±4,55E+04	Developmental	3,74E-02	1,38
PSA4	Q9R1P0	Proteasome subunit alpha type-4	3,63E+05±2,67E+04	4,88E+05±7,59E+03	Proteolytic	7,81E-03	1,34
MBLC2	Q8BL86	Metallo-beta-lactamase domain-containing protein 2	1,46E+05±1,07E+04	1,90E+05±1,51E+04	Hydrolase	4,54E-02	1,31
VDAC1	Q60932	Voltage-dependent anion-selective channel protein 1	2,05E+07±1,56E+06	2,66E+07±1,15E+06	Porin	2,06E-02	1,30
PRPS1	Q9D7G0	Ribose-phosphate pyrophosphokinase 1	5,20E+05±5,07E+04	6,67E+05±1,85E+04	Kinase	4,61E-02	1,28
GGCT	Q9D7X8	Gamma-glutamylcyclotransferase	2,46E+05±1,02E+04	3,06E+05±1,98E+04	Lyase	3,42E-02	1,24
1433F	P68510	14-3-3 protein eta	6,35E+06±3,69E+05	7,79E+06±3,31E+04	Binding	2,98E-02	1,23
ECHD1	Q9D9V3	Ethylmalonyl-CoA decarboxylase	1,33E+05±8,10E+03	1,60E+05±5,53E+03	Lyase	3,20E-02	1,21
MGLL	O35678	Monoglyceride lipase	4,47E+05±1,77E+04	5,43E+04±1,51E+04	Hydrolase	6,44E-03	1,21
CDK5	P61809	Cyclin-dependent-like kinase 5	6,80E+05±2,95E+04	8,25E+05±2,99E+04	Binding	1,43E-02	1,21
IMPA1	O55023	Inositol monophosphatase 1	1,39E+06±9,33E+04	1,68E+06±4,57E+04	Hydrolase	3,20E-02	1,21
ATPG	Q91VR2	ATP synthase subunit gamma, mitochondrial	5,62E+06±2,91E+05	6,77E+06±2,57E+05	Transport	2,53E-02	1,21
COTL1	Q9CQI6	Coactosin-like protein	1,43E+06±2,24E+04	1,71E+06±1,07E+05	Binding	4,56E-02	1,19

**Tableau 29 : Protéines dont les niveaux d'expression sont modifiés au niveau de la moelle épinière des souris EAE + véhicule en comparaison des souris CTL + véhicule**

Sont représentés dans des lignes bleues les protéines sous-exprimées chez les souris EAE + véhicule et dans les lignes saumon, les protéines sur-exprimées.

Accession	Uniprot ID	Description	CTL + véhicule	EAE + véhicule	Fonction moléculaire	Anova valeur de p	Facteur multipli-cateur
KCRM	P07310	Creatine kinase M-type	8,61E+06±2,00E+06	2,54E+06±5,95E+05	Kinase, Transferase	1,55E-02	3,39
CAH3	P16015	Carbonic anhydrase 3	2,64E+06±3,59E+05	1,17E+06±2,01E+05	Lyase	9,27E-03	2,26
BLMH	Q8R016	Bleomycin hydrolase	3,29E+05±1,88E+04	2,29E+05±2,92E+04	Hydrolase, Protease	2,25E-02	1,44
DNJA1	P63037	DnaJ homolog subfamily A member 1	2,72E+05±9,22E+03	1,91E+05±2,44E+04	Binding,	2,32E-02	1,42
BTBDH	Q9DB72	BTB/POZ domain-containing protein 17	7,06E+05±6,98E+04	5,40E+05±1,50E+04	Adaptor	3,92E-02	1,31
ULA1	Q8VBW6	NEDD8-activating enzyme E1 regulatory subunit	3,65E+05±2,42E+04	2,97E+05±1,72E+04	Binding	4,07E-02	1,23
ROA3	Q8BG05	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3	5,05E+06±1,28E+05	4,21E+06±2,86E+05	Binding	3,31E-02	1,20
PSB3	Q9R1P1	Proteasome subunit beta type-3	2,21E+06±4,51E+04	1,85E+06±1,01E+05	Endopeptidase	1,92E-02	1,19
OAT	P29758	Ornithine aminotransferase, mitochondrial	9,31E+05±3,62E+04	7,82E+05±3,21E+04	Transferase	1,33E-02	1,19
NFM	P08553	Neurofilament medium polypeptide	7,42E+07±3,15E+06	6,24E+07±2,61E+06	Structural	1,84E-02	1,19
RP3A	P47708	Rabphilin-3A	6,14E+06±1,26E+05	5,29E+06±1,02E+05	Binding	7,66E-04	1,16
MATR3	Q8K310	Matrin-3	1,93E+05±9,51E+03	2,44E+05±1,79E+04	Binding	3,40E-02	1,26

**Tableau 30 : Protéines dont les niveaux d'expressions sont modifiés au niveau de la moelle épinière des souris EAE + véhicule en comparaison aux souris EAE + GSE**

Sont représentés dans des lignes bleues les protéines sous-exprimées chez les souris EAE + GSE et dans les lignes saumon, les protéines sur-exprimées.

Accession	Uniprot ID	Description	EAE+ véhicule	EAE + GSE	Fonction moléculaire	Anova valeur de p	Facteur multipli-cateur
TIM29	Q8BGX2	Mitochondrial import inner membrane translocase subunit Tim29	1,88E+05±1,95E+04	1,23E+05±1,37E+04	Transport	2,52E-02	1,53
RAB6B	P61294	Ras-related protein Rab-6B	1,71E+06±1,17E+05	1,21E+06±5,29E+04	Hydrolase	3,05E-03	1,41
ASAH1	Q9WV54	Acid ceramidase	4,07E+05±3,38E+04	3,13E+05±1,03E+04	Hydrolase	2,31E-02	1,30
VP26B	Q8C0E2	Vacuolar protein sorting-associated protein 26B	5,32E+05±1,65E+04	4,26E+05±3,73E+04	Transport	3,61E-02	1,25
GALK1	Q9R0N0	Galactokinase	2,02E+06±1,17E+05	1,63E+06±1,02E+05	Kinase, transferase	3,89E-02	1,24
IGLO5	Q8HW98	IgLON family member 5	5,43E+05±8,04E+03	4,42E+05±2,53E+04	Unknown	7,66E-03	1,23
SPSY	P97355	Spermine synthase	2,67E+05±1,63E+04	2,19E+05±1,04E+04	Transferase	4,09E-02	1,22
AP4A	P56380	Bis (5'-nucleosyl)-tetraphosphatase [asymmetrical]	1,58E+06±1,02E+05	1,30E+06±4,37E+04	Hydrolase	2,70E-02	1,22
FSD1	Q7TPM6	Fibronectin type III	7,39E+05±3,33E+04	6,21E+05±2,45E+04	Binding	2,24E-02	1,19
GSTM7	Q80W21	Glutathione S-transferase Mu 7	9,14E+05±1,77E+04	7,73E+05±4,25E+04	Transferase	1,71E-02	1,18
NDUS8	Q8K3J1	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 8, mitochondrial	1,60E+06±7,62E+04	1,35E+06±6,77E+04	Oxidoreductase Translocase	4,21E-02	1,18
ATPF1	Q811I0	ATP synthase mitochondrial F1 complex	5,93E+05±2,31E+04	5,03E+05±1,88E+04	Assembly	1,75E-02	1,18

HPLN1	Q9QUP5	Hyaluronan and proteoglycan link protein 1	5,49E+06±3,11E+05	4,68E+06±1,55E+05	Binding	4,70E-02	1,17
EFHD2	Q9D8Y0	EF-hand domain-containing protein D2	3,46E+06±1,56E+05	2,97E+06±1,13E+05	Binding	3,16E-02	1,16
LYPA1	P97823	Acyl-protein thioesterase 1	1,26E+06±5,14E+04	1,08E+06±3,59E+04	Hydrolase	1,73E-02	1,17
TPM3	P21107	Tropomyosin alpha-3 chain	3,03E+06±1,44E+05	2,66E+06±8,42E+04	Binding	4,81E-02	1,14
LSAMP	Q8BLK3	Limbic system-associated membrane protein	3,53E+06±9,47E+04	3,07E+06±1,15E+05	Guidance	1,60E-02	1,15
1433T	P68254	14-3-3 protein theta	1,55E+07±6,17E+05	1,37E+07±2,31E+05	Binding	1,78E-02	1,13
AT1B2	P14231	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit beta-2	2,62E+07±5,61E+05	2,36E+07±5,91E+05	Binding	1,22E-02	1,11
TNPO	Q8BFY9	Transportin-2	9,31E+04±3,42E+03	1,52E+05±1,85E+04	Binding	1,51E-02	1,63
FKBP2	P45878	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	3,82E+05±4,89E+04	5,86E+05±1,58E+04	Isomerase,	8,62E-03	1,53
DPYL4	O35098	Dihydropyrimidinase-related protein 4	7,16E+05±3,91E+04	1,04E+06±1,14E+05	Binding	1,36E-02	1,45
TRIM2	Q9ESN6	Tripartite motif-containing protein 2	1,20E+06±3,74E+04	1,72E+06±1,74E+05	Transferase	1,00E-02	1,43
ATP5I	Q06185	ATP synthase subunit e, mitochondrial	6,90E+05±7,18E+04	9,80E+05±4,67E+04	Binding	1,24E-02	1,42
HPCL1	P62748	Hippocalcin-like protein 1	8,47E+05±9,54E+04	1,20E+06±4,07E+04	Binding	1,67E-02	1,42
RTN1	Q8K0T0	Reticulon-1	1,28E+05±1,49E+04	1,78E+05±1,16E+04	Inhibitor	3,75E-02	1,40
ACBP	P31786	Acyl-CoA-binding protein	2,78E+06±3,88E+05	3,84E+06±1,73E+05	Binding	4,49E-02	1,38
CAP2	Q9CYT6	Adenylyl cyclase-associated protein 2	1,89E+05±7,69E+03	2,62E+05±1,86E+04	Binding	3,12E-03	1,38
SV2A	Q9JIS5	Synaptic vesicle glycoprotein 2A	7,76E+05±4,04E+04	5,74E+05±3,02E+04	Receptor	2,96E-03	1,35
CYTB	P00158	Cystatin-B	9,64E+05±9,26E+04	1,27E+06±6,36E+04	Binding	2,42E-02	1,32

PROF1	P62962	Profilin-1	2,52E+06±2,20E+05	3,30E+06±2,56E+05	Binding	4,14E-02	1,31
ACY3	Q91XE4	N-acyl-aromatic-L-amino acid amidohydrolase (carboxylate-forming)	5,76E+05±5,18E+04	7,55E+05±2,87E+04	Hydrolase	1,73E-02	1,31
ARF1	Q9QWY8	ADP-ribosylation factor 1	1,03E+07±9,87E+05	1,32E+07±6,84E+05	Binding	4,06E-02	1,29
ML12	Q3THE2	Myosin regulatory light chain 12B	7,39E+05±6,21E+04	9,47E+05±3,30E+04	Motor protein, binding	2,47E-02	1,28
ACY2	Q8R3P0	Aspartoacylase	1,72E+06±9,51E+04	2,19E+06±1,38E+05	Hydrolase	2,02E-02	1,27
CH10	Q64433	10 kDa heat shock protein, mitochondrial	5,79E+06±5,27E+05	7,35E+06±2,58E+05	Binding, chaperone	3,22E-02	1,27
E41L2	O70318	Band 4.1-like protein 2	1,68E+06±8,99E+04	2,11E+06±6,46E+04	Binding	5,50E-03	1,26
AP2S1	P62743	AP-2 complex subunit sigma	4,50E+05±2,38E+04	5,62E+05±2,54E+04	Adaptor	1,20E-02	1,25
AL1A1	P24549	Aldehyde dehydrogenase 1A1	3,49E+06±2,68E+05	4,29E+06±1,42E+05	Oxidoreductase	3,41E-02	1,23
INPP	Q8K337	Inositol polyphosphate 1-phosphatase	4,65E+05±1,70E+04	5,56E+05±1,75E+04	Hydrolase	5,97E-03	1,20
BCS1	Q9CZP5	Mitochondrial chaperone BCS1	3,72E+05±1,07E+04	4,44E+05±1,90E+04	Chaperone	1,13E-02	1,19
RTCB	Q99LF4	tRNA-splicing ligase RtcB homolog	7,32E+05±3,49E+04	8,71E+05±3,29E+04	Ligase	2,29E-02	1,19
SYS	P26638	Serine--tRNA ligase, cytoplasmic	3,22E+06±1,65E+05	3,83E+06±1,83E+05	Synthetase	3,94E-02	1,19
CNRP1	Q5M8N0	CB1 cannabinoid receptor-interacting protein 1	1,78E+06±7,50E+04	2,12E+06±9,89E+04	Binding	2,30E-02	1,19
GLSK	D3Z7P3	Glutaminase kidney isoform, mitochondrial	2,16E+06±8,65E+04	2,54E+06±8,17E+04	Hydrolase	1,37E-02	1,18
DPYL2	O08553	Dihydropyrimidinase-related protein 2	2,69E+08±1,30E+07	3,14E+08±9,42E+06	Developmental protein	2,50E-02	1,17

TRIM3	Q9R1R2	Tripartite motif-containing protein 3	7,29E+05±4,00E+04	8,56E+05±3,83E+04	Binding, transport	4,83E-02	1,17
DCTN3	Q9Z0Y1	Dynactin subunit 3	7,02E+05±2,98E+04	8,12E+05±2,91E+04	Assembly	3,00E-02	1,16
DPYL3	Q62188	Dihydropyrimidinase-related protein 3	1,30E+07±4,59E+05	1,50E+07±7,25E+05	Binding	4,19E-02	1,16
UGPA	Q91ZJ5	UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase	1,57E+06±2,72E+04	1,83E+06±6,79E+04	Transferase	5,87E-03	1,16
G6PI	P06745	Glucose-6-phosphate isomerase	2,13E+07±1,03E+06	2,48E+07±1,11E+06	Isomerase	4,89E-02	1,16
OAT	P29758	Ornithine aminotransferase, mitochondrial	7,82E+05±3,21E+04	8,96E+05±1,83E+04	Transferase	1,43E-02	1,15
RP3A	P47708	Rabphilin-3A	5,29E+06±1,02E+05	6,07E+06±2,55E+05	Binding	1,78E-02	1,15
SAHH	P50247	Adenosylhomocysteinase	2,22E+06±5,43E+04	2,53E+06±1,18E+05	Hydrolase	4,31E-02	1,14

### 5.3. Analyse d'enrichissement de l'ontologie des gènes

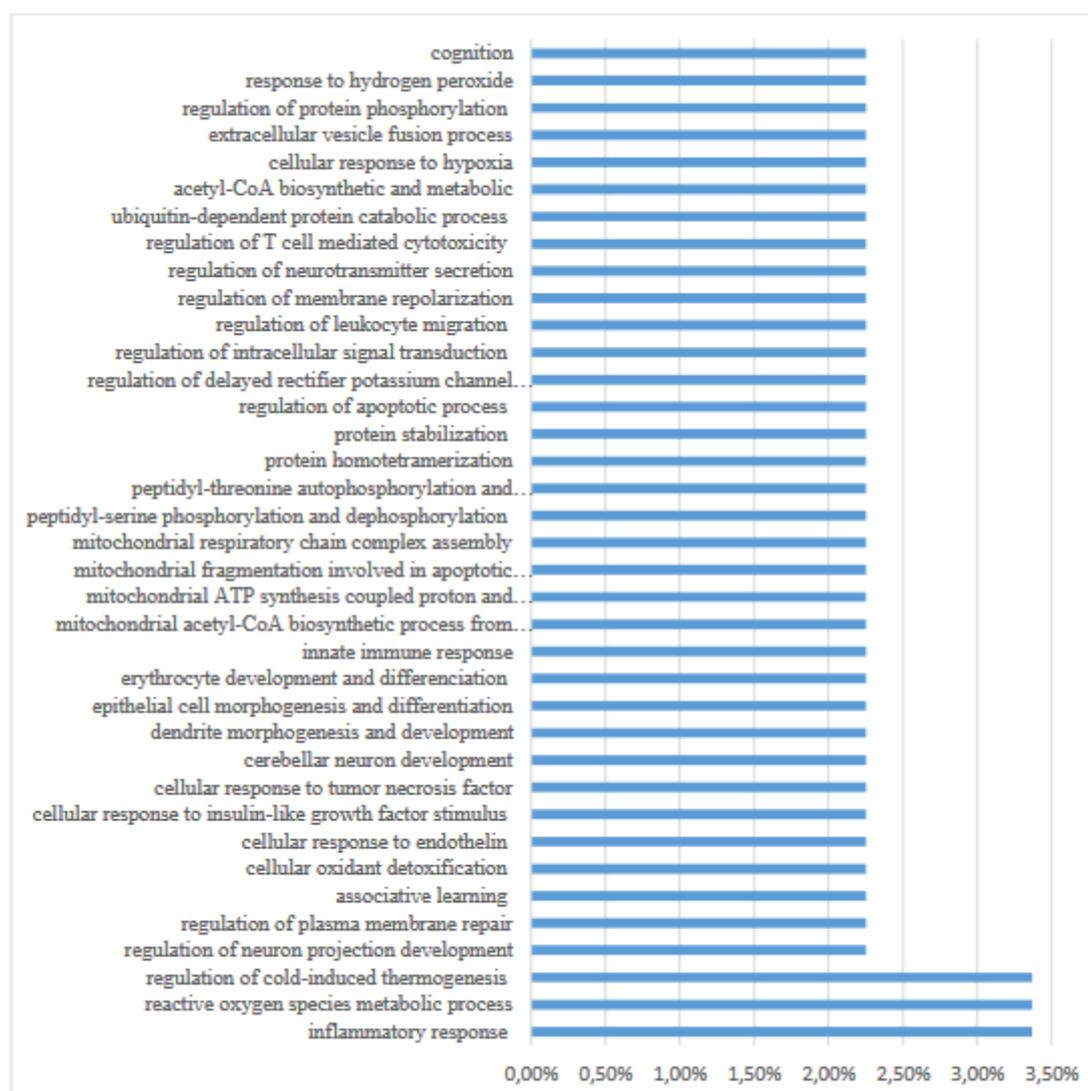
Au cours de ce travail, l'analyse d'enrichissement des termes GO a été réalisée par Gene Ontology afin de déterminer les pourcentages de dérégulation pour chaque ontologie. Toutes les comparaisons deux à deux pour les différents groupes ont été réalisées, mais seules les données concernant les comparaisons CTL + véhicule vs EAE + véhicule et EAE+ véhicule vs EAE + GSE sont présentées et seules les ontologies pour lesquelles les pourcentages de dérégulation sont supérieurs à 2% sont présentées.

#### 5.3.1. Analyse par processus biologiques

##### A. Au niveau du cerveau

Chez les souris EAE, les processus biologiques altérés au niveau du cerveau sont représentés dans la **Figure 64** en comparant les groupes CTL + véhicule vs EAE + véhicule. Ils sont au nombre de 36 dont le pourcentage est supérieur à 2%. Les plus altérés d'entre eux sont cités ci-dessous :

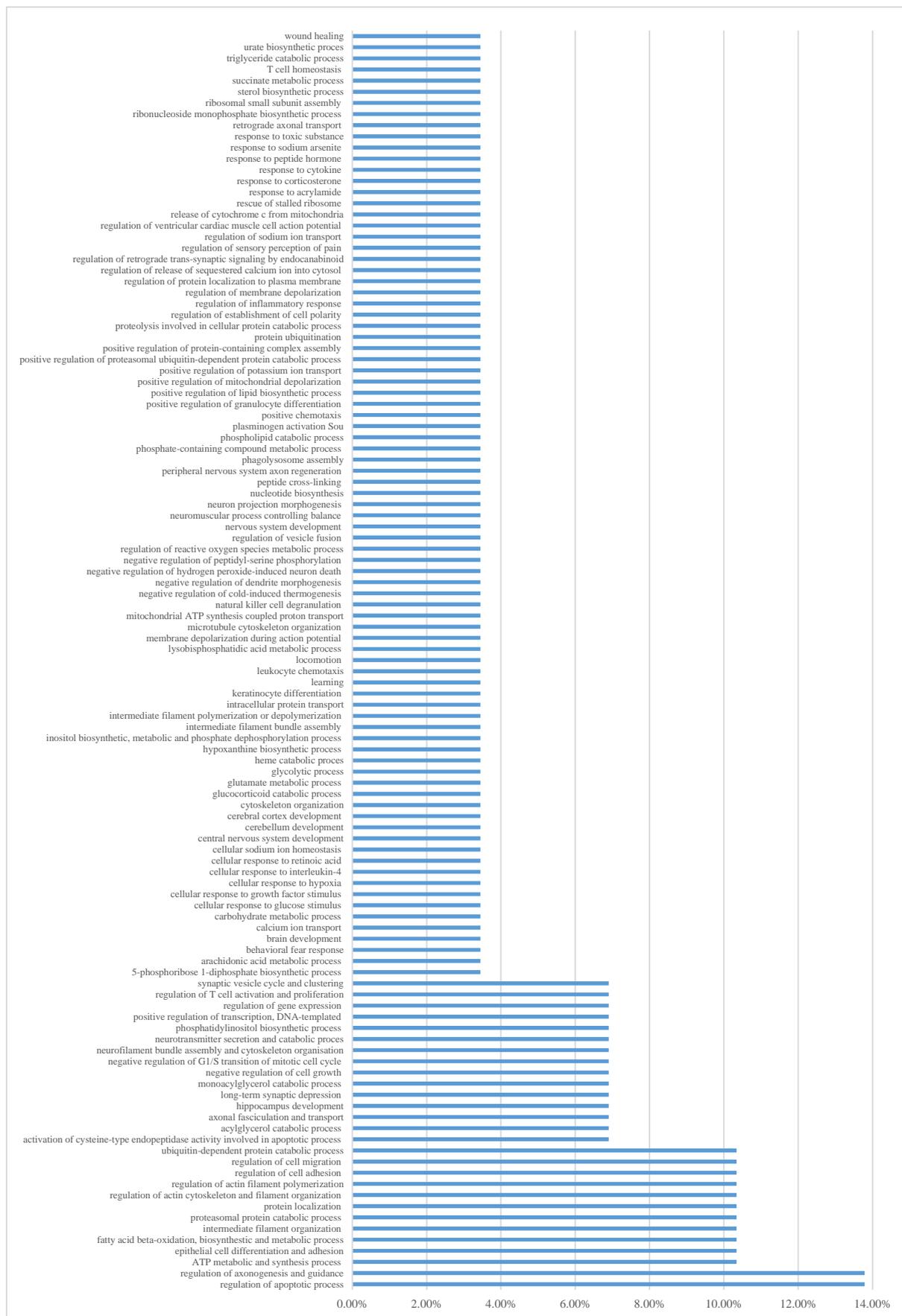
- l'inflammation avec la dérégulation des protéines suivantes : déshydrogénase/réductase (famille SDR) membre 7B (DRS7B), le substrat 1 de la toxine botulique C3 liée à Ras (RAC1) et la molécule adaptatrice crk (CRK) ;
- la production de ROS avec la dérégulation des protéines suivantes : l'inhibiteur mitochondriale de l'ATPase, (ATIF1), le facteur d'élongation mitochondriale Tu (EFTU) ;
- la thermogénèse induite par le froid avec la dérégulation des protéines suivantes : l'acyl-CoA thioestérase 13 (ACO13), la protéine mitochondriale sérine/thréonine phosphatase PGAM5, (PGAM5) et DRS7B.



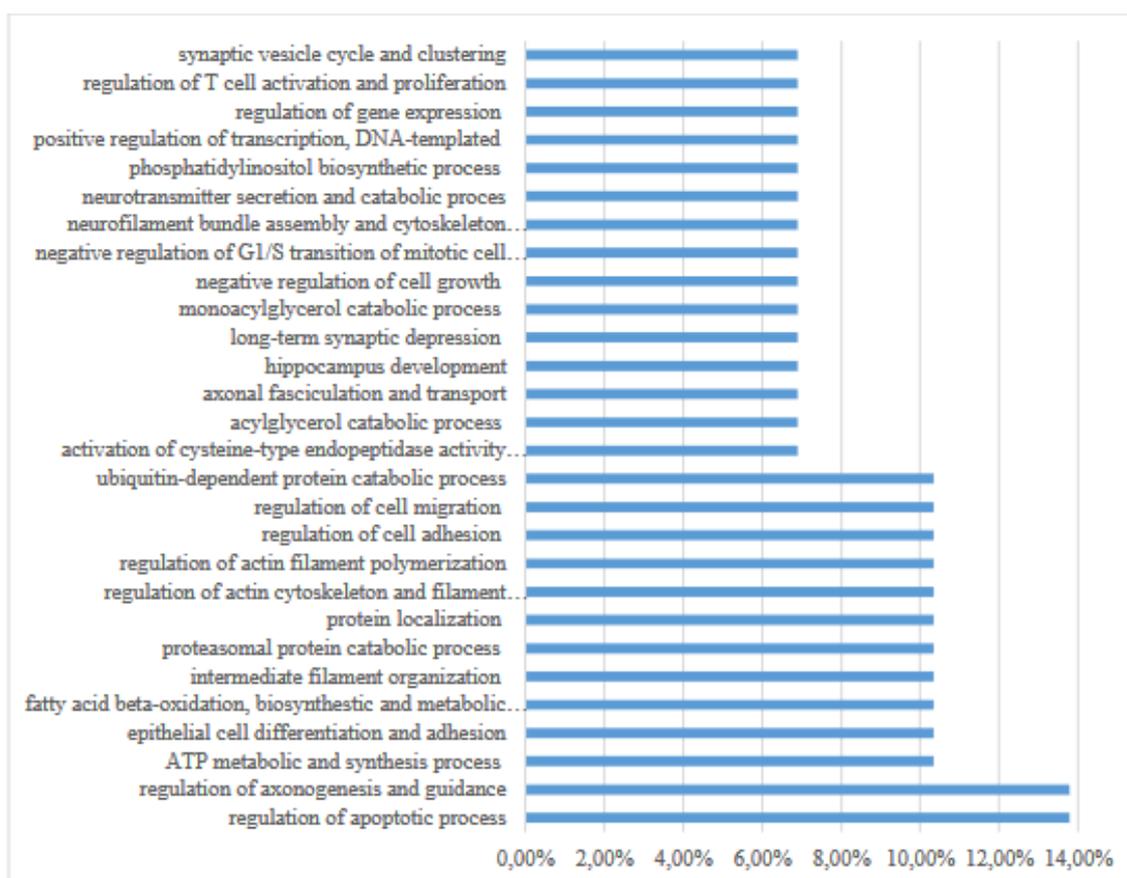
**Figure 64 : Processus biologiques dérégulés au niveau du cerveau des souris EAE + véhicule en comparaison aux souris CTL + véhicule**

La **Figure 65** et **65bis** représente les 113 processus biologiques corrigés par le GSE au niveau du cerveau en comparant les groupes EAE + véhicule vs EAE + GSE. Parmi les processus les plus altérés, peuvent être cités :

- l'apoptose avec la dérégulation des protéines suivantes : le récepteur de la C kinase 1 activée (RACK1), la protéine 14-3-3 thêta (1433F) ;
- l'axonogenèse avec la dérégulation des protéines suivantes : le NFL et la kinase cycline-dépendante 5 (CDK5) ;
- le métabolisme et la synthèse de l'ATP avec la dérégulation de la sous-unité gamma de l'ATP synthase (ATPG) et le NFL.



**Figure 65 : Processus biologiques pour lesquels l'expression des protéines est modifiée au niveau du cerveau des souris EAE + GSE en comparaison des souris EAE + véhicule**

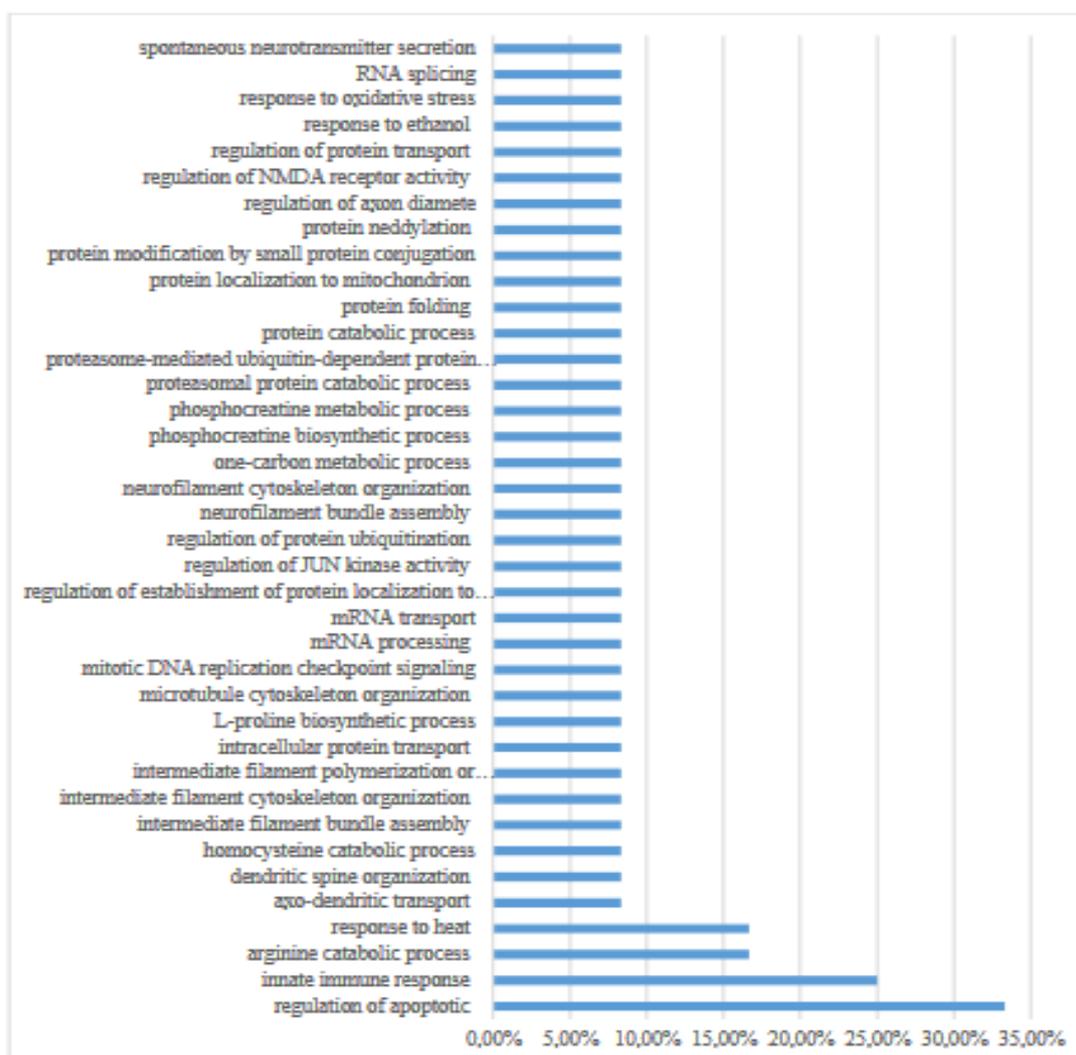


**Figure 65bis : Focus sur les processus biologiques pour lesquels l’expression des protéines est la plus modifiée au niveau du cerveau des souris EAE + GSE en comparaison des souris EAE+ véhicule**

### B. Au niveau de la moelle épinière

Au niveau de la moelle épinière, l’analyse des processus biologiques altérés chez les souris EAE + véhicule en comparaison aux souris CTL + véhicule en dénombre 38 avec un pourcentage supérieur à 2% (**Figure 66**). Les plus significativement dérégulés sont :

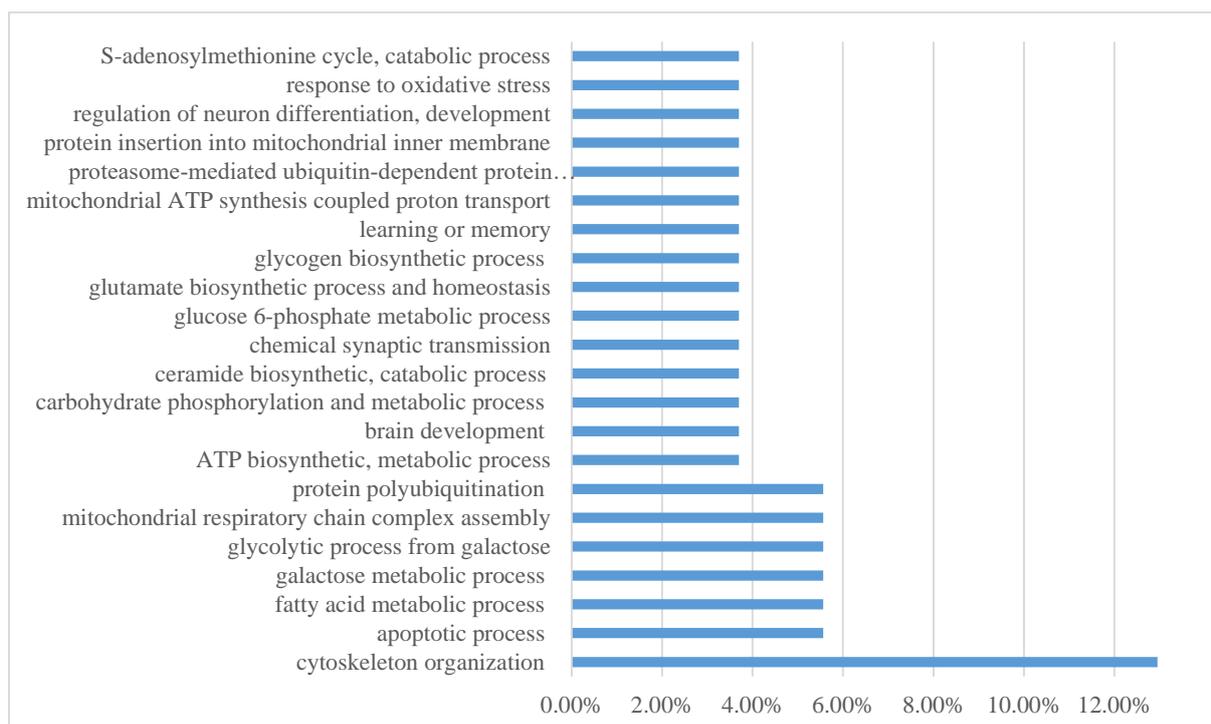
- l’apoptose, qui est le processus le plus dérégulé avec un pourcentage de dérégulation de 33 %, avec l’implication des protéines suivantes : le DNJA1 et la sous -unité régulatrice E1 de l'enzyme d'activation NEDD8 (ULA1) ;
- la réponse immunitaire innée avec l’implication notamment de MATR3 ;
- le catabolisme de l’arginine avec l’implication notamment de l’ornithine aminotransférase mitochondriale (OAT).



**Figure 66 : Processus biologiques dérégulés au niveau de la moelle épinière des souris EAE + véhicule en comparaison aux souris CTL + véhicule**

La **Figure 67** représente les processus biologiques corrigés par le GSE au niveau de la moelle épinière des souris EAE en comparant le groupe EAE + véhicule par rapport au groupe EAE + GSE. Les résultats obtenus montrent la dérégulation de 22 d'entre eux, avec pour principale modification :

- l'organisation du cytosquelette, qui est le processus biologique le plus modifié avec l'implication de la protéine 2 de type bande 4.1 (E41L2) et de la profiline-1 (PROF1) ;
- l'apoptose avec les protéines glucose-6-phosphate isomérase (G6PI) et la bis (5'-nucléosyl)-tétraphosphatase (asymétrique) (AP4A) ;
- le métabolisme des acides gras avec l'implication de la protéine de liaison à l'acyl-CoA (ACBP), le thioestérase acyl-protéique (LYPA1) et l'ASAH1.

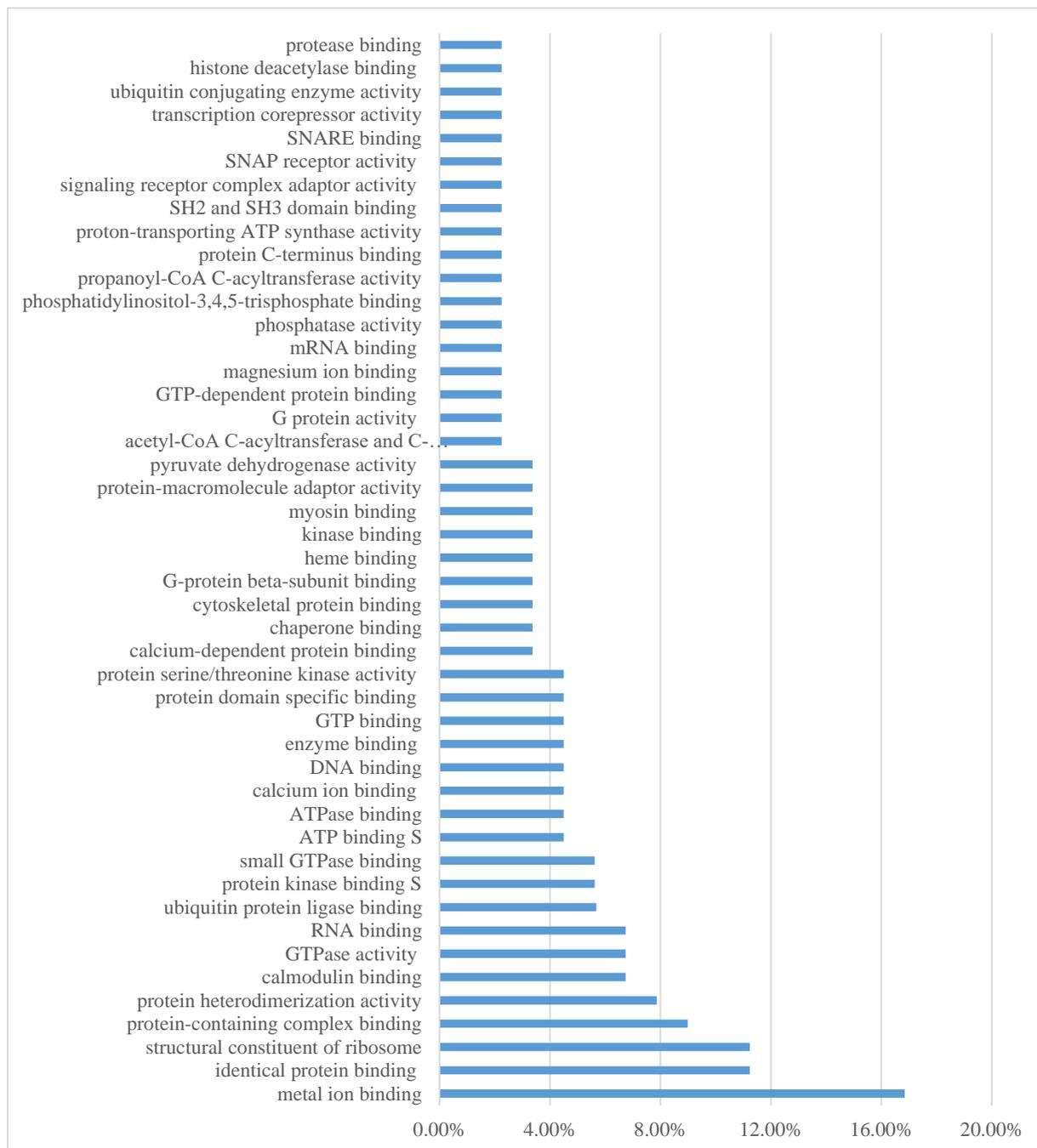


**Figure 67 : Processus biologiques pour lesquels l'expression des protéines est modifiée au niveau de la moelle épinière des souris EAE + GSE en comparaison aux souris EAE + véhicule**

### 5.3.2. Analyse par fonction moléculaire

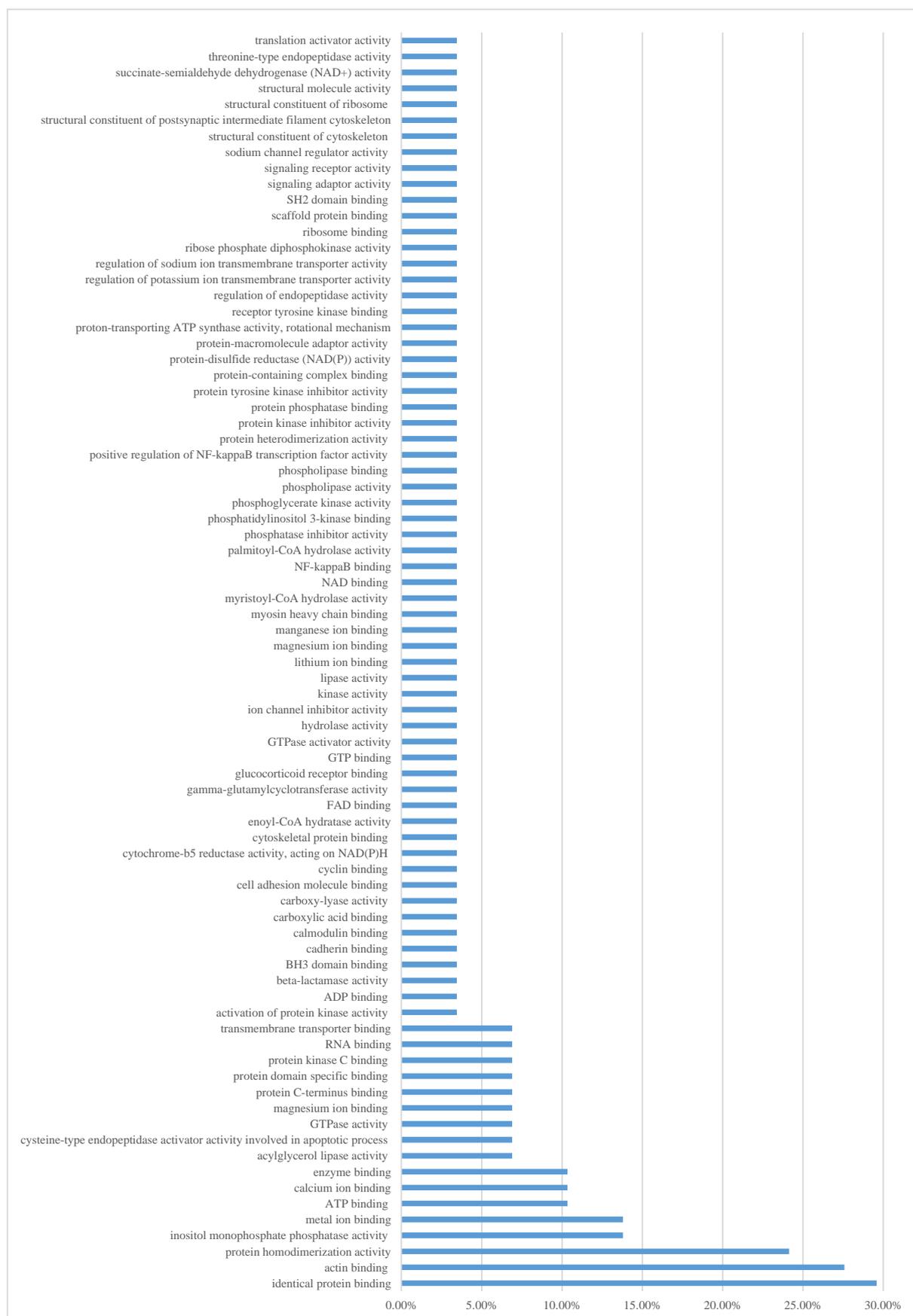
#### A. Au niveau du cerveau

Les fonctions moléculaires altérées au niveau du cerveau des souris EAE + véhicule par rapport aux souris CTL + véhicule sont représentées dans la **Figure 68** et sont au nombre de 46 avec un pourcentage est supérieur à 2%. Parmi les processus les plus altérés, on retrouve lialiaison à des ions métalliques, suivie par la liaison à des protéines identiques et la fonction structurale des ribosomes.

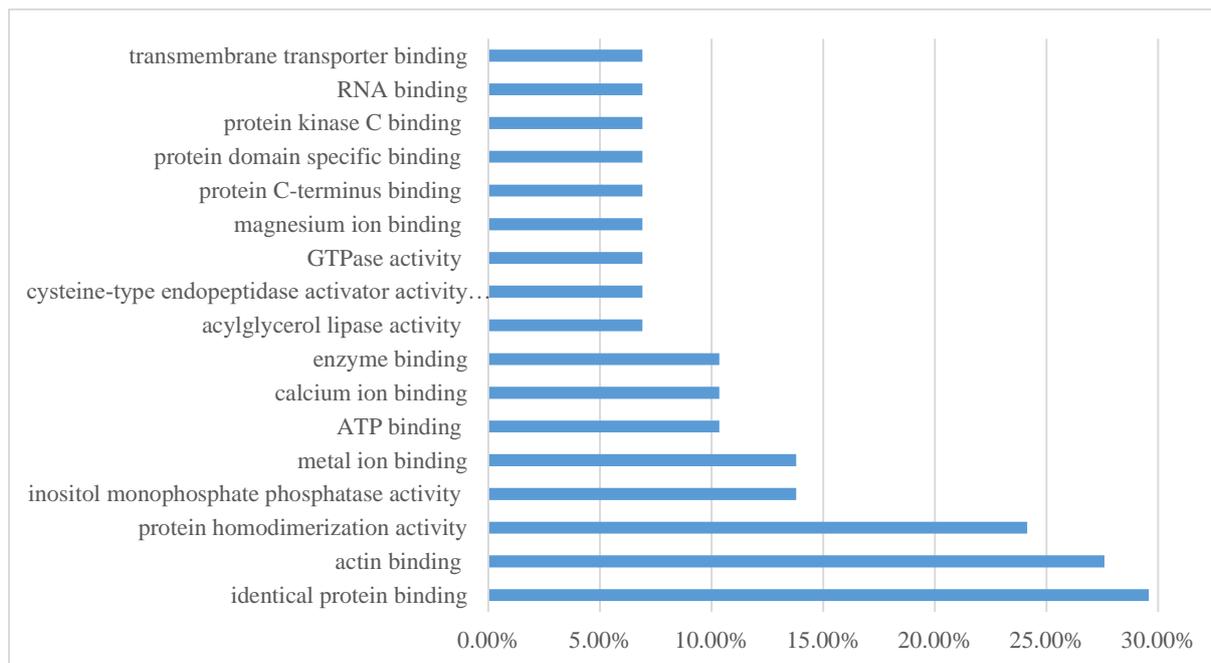


**Figure 68 : Fonctions moléculaires dérégulées au niveau du cerveau des souris EAE + véhicule en comparaison aux souris CTL + véhicule**

La **Figure 69** et **Figure 69bis** représentent les fonctions moléculaires corrigées par le GSE au niveau du cerveau en comparant le groupe EAE + GSE par rapport au groupe EAE + véhicule. Ces fonctions sont au nombre de 80, et comprennent la liaison à des protéines identiques et la liaison à l'actine qui sont les deux fonctions moléculaires les plus corrigées par le GSE, suivies par l'activité d'homodimérisation des protéines.



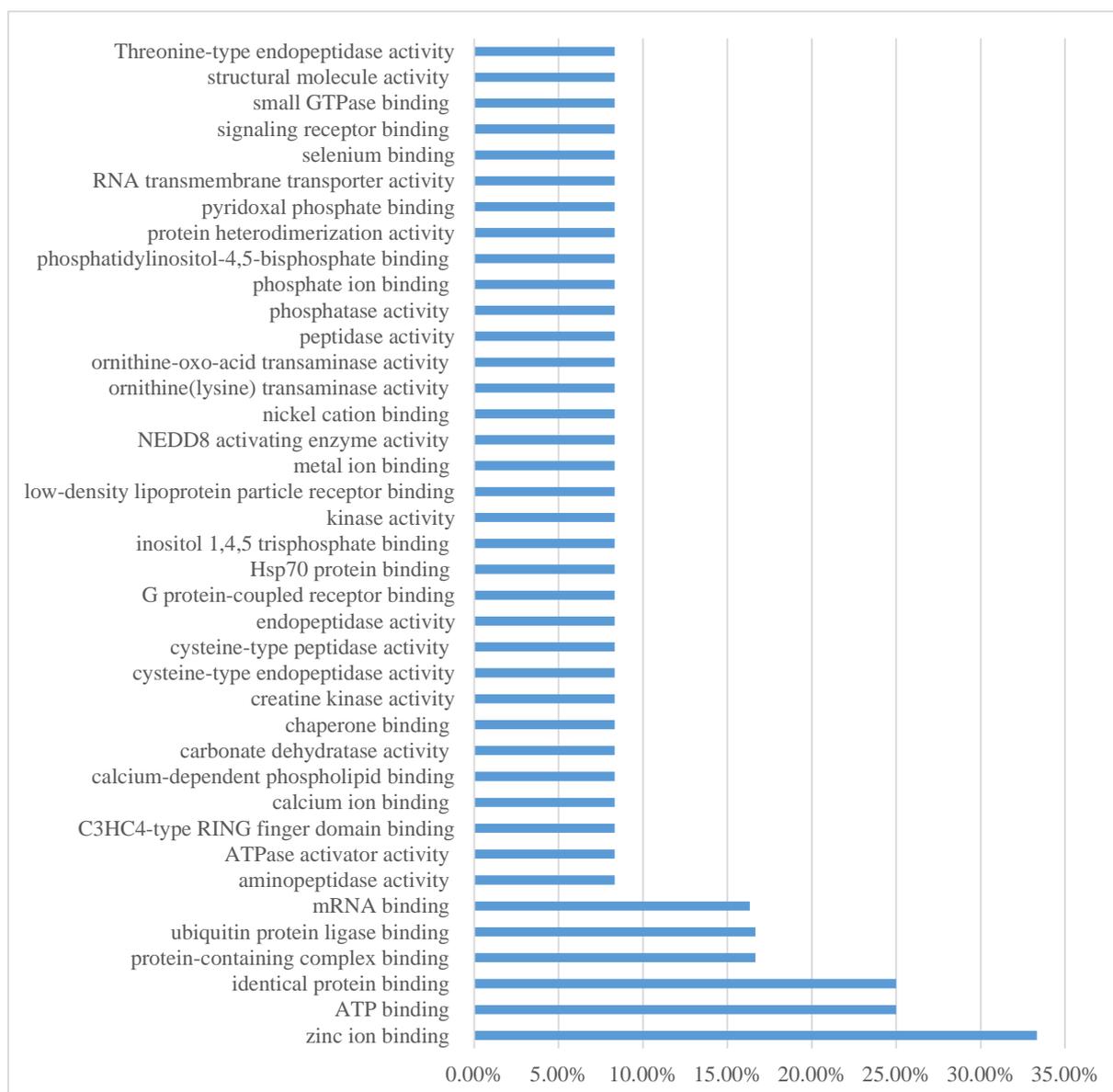
**Figure 69 : Fonctions moléculaires pour lesquelles l'expression des protéines est modifiée au niveau du cerveau des souris EAE + GSE en comparaison aux souris EAE + véhicule**



**Figure 69 bis : Focus sur les fonctions moléculaires pour lesquelles l’expression des protéines est modifiée différemment au niveau du cerveau des souris EAE + GSE en comparaison aux souris EAE + véhicule**

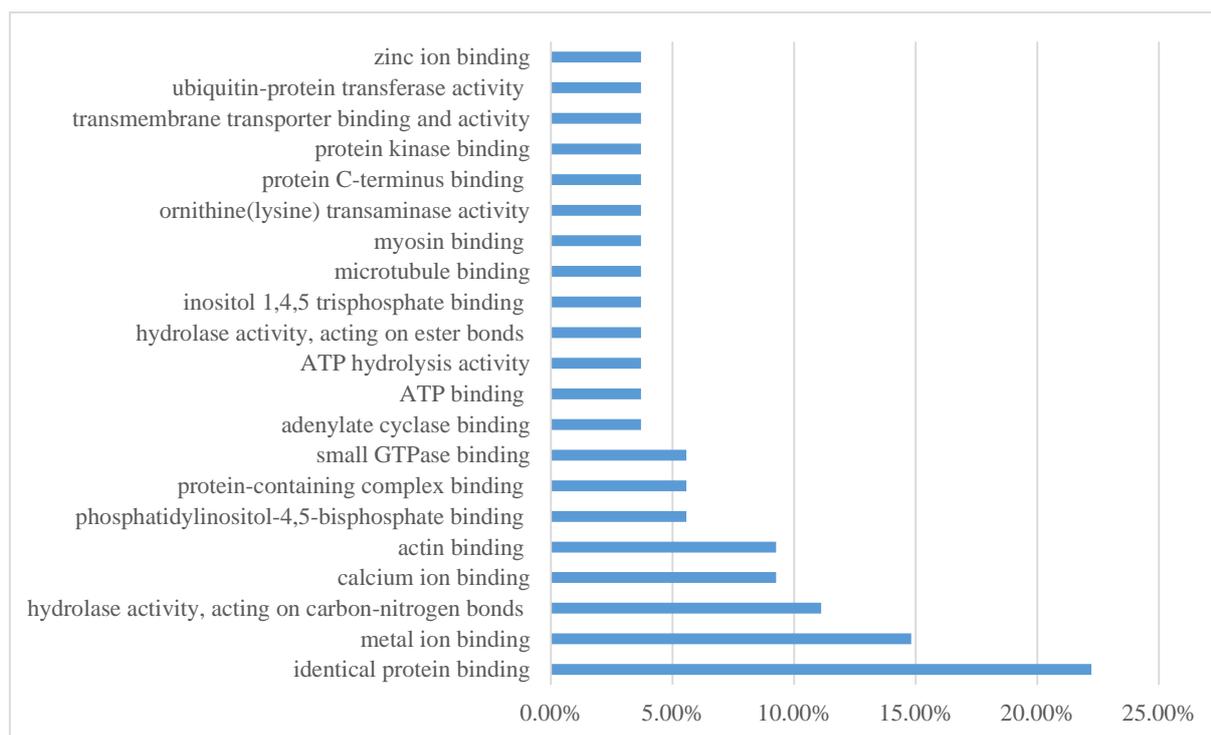
### **B. Au niveau de la moelle épinière**

La **Figure 70** représente les fonctions moléculaires dérégulées au niveau de la moelle épinière en comparant le groupe EAE + véhicule par rapport au groupe CTL + véhicule. Ces fonctions sont au nombre de 39 ; parmi les fonctions les plus corrigées, on retrouve l’association aux ions zinc suivie par l’association à l’ATP et la liaison à des protéines identiques.



**Figure 70 : Fonctions moléculaires dérégulées au niveau de la moelle épinière des souris EAE + véhicule en comparaison aux souris CTL + véhicule**

La **Figure 71** représente les fonctions moléculaires corrigées par le GSE au niveau de la moelle épinière en comparant le groupe EAE + GSE par rapport au groupe EAE + véhicule. Ces fonctions sont au nombre de 21, avec un pourcentage est supérieur à 2%. Les fonctions les plus modifiées sont la liaison à des protéines identiques, la liaison à des ions métalliques, l'activité hydrolase et la liaison aux ions calcium.



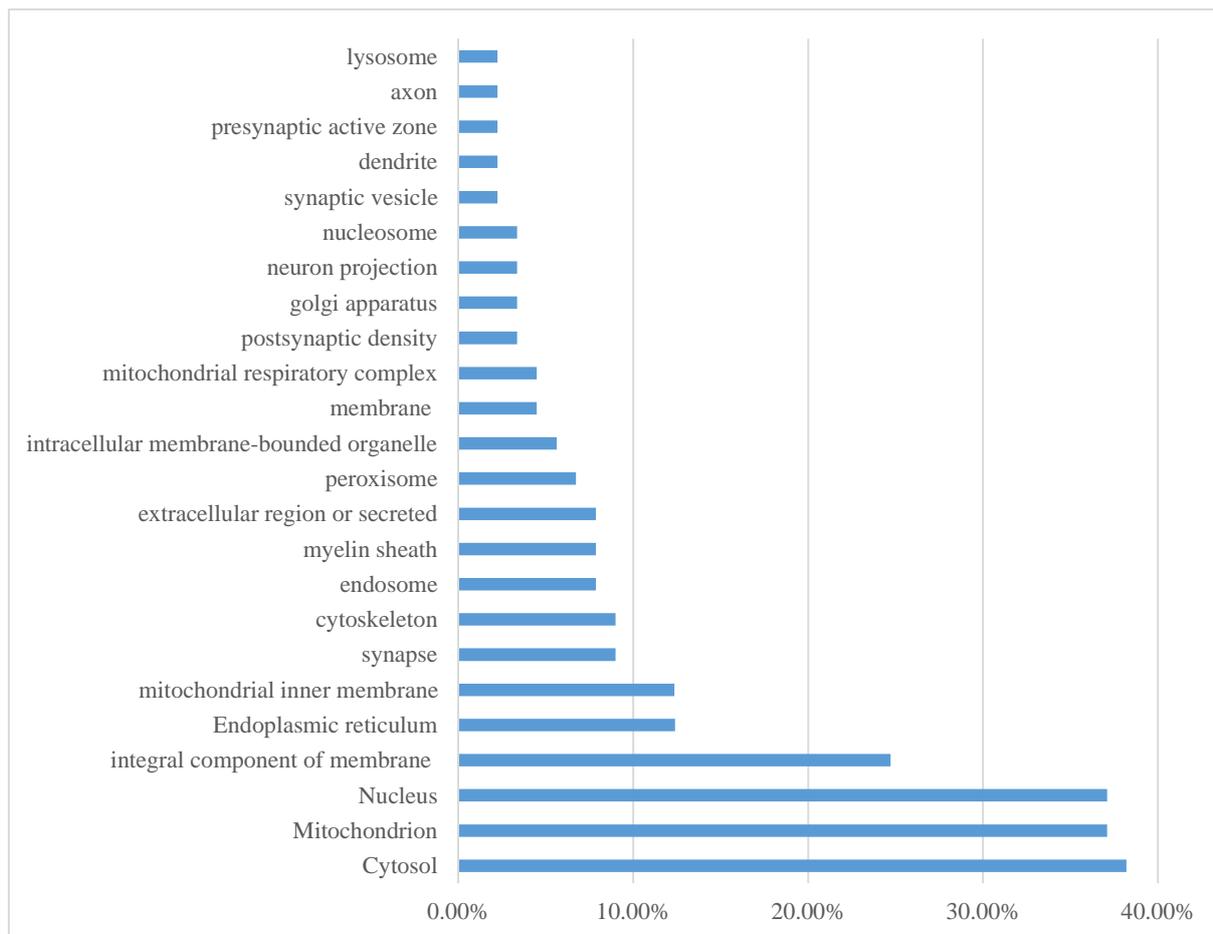
**Figure 71 : Fonctions moléculaires pour lesquelles l'expression des protéines est modifiée différemment au niveau de la moelle épinière des souris EAE + GSE en comparaison aux souris EAE + véhicule**

### 5.3.3. Analyse par composant cellulaire

Par la suite, nous avons analysé la 3<sup>ème</sup> grande famille des ontologies qui est le composant cellulaire permettant d'analyser la localisation intracellulaire des protéines, dont l'expression varie en fonction des conditions.

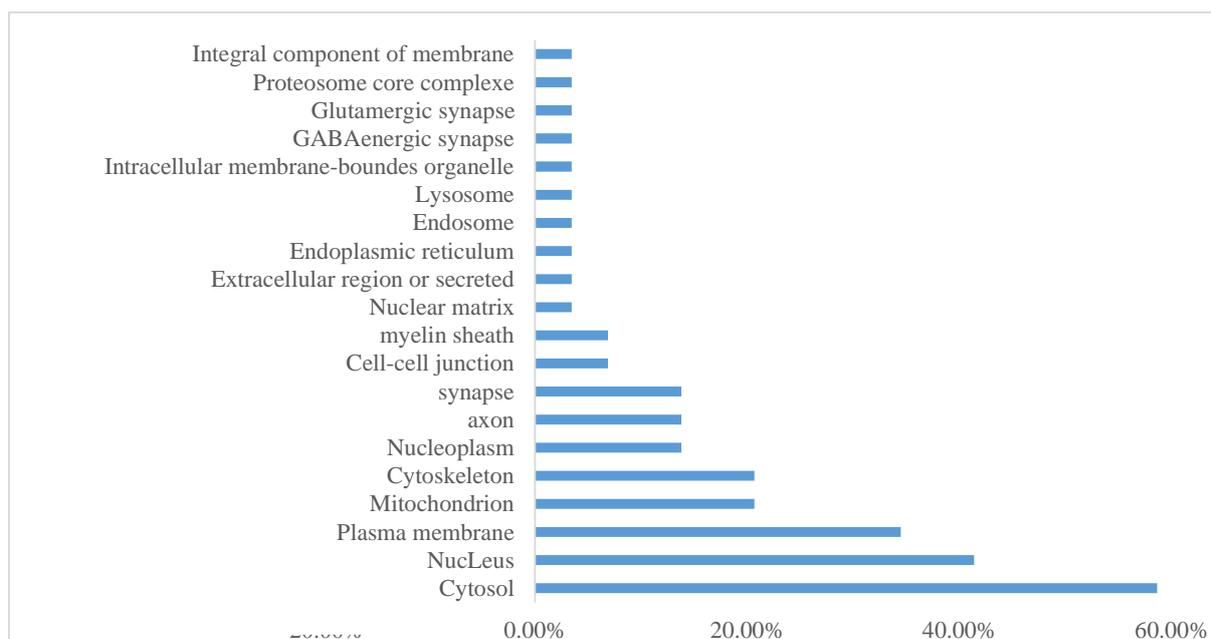
#### A. Au niveau du cerveau

La **Figure 72** représente les composants cellulaires dérégulés au niveau du cerveau des souris EAE + véhicule en comparaison des souris CTL + véhicule. Ils sont au nombre de 23, avec une sur-représentation importante du cytosol (38 %) suivi des mitochondries et du noyau (37%).



**Figure 72 : Composants cellulaires dans lesquels les protéines sont dérégulées au niveau du cerveau des souris EAE + véhicule en comparaison aux souris CTL + véhicule**

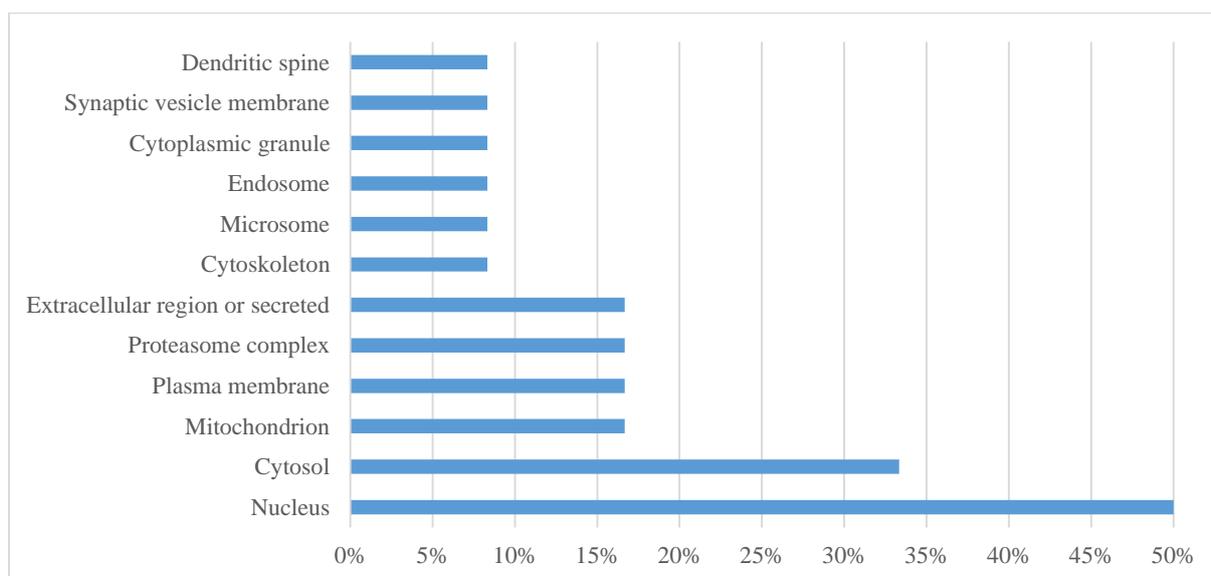
La **Figure 73** représente les composants cellulaires pour lesquels l'expression des protéines est fortement modifiée par le GSE. Cette analyse a été réalisée en comparant le groupe EAE + véhicules au groupe EAE + GSE. Les résultats obtenus montrent que 19 composants cellulaires sont impliqués incluant le cytosol, qui est le composant incluant le plus de modification (59%), suivi du noyau (41%) et de la membrane plasmatique (35%).



**Figure 73 : Composants cellulaires dans lesquels les protéines sont différemment exprimées au niveau du cerveau des souris EAE + GSE en comparaison aux souris EAE + véhicule**

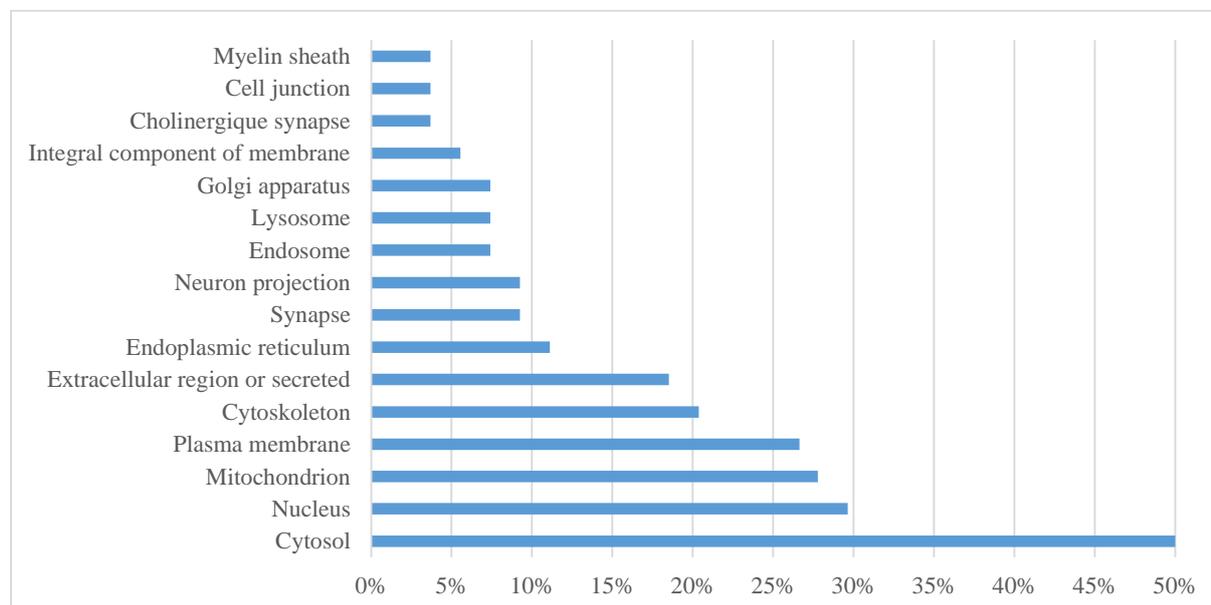
### B. Au niveau de la moelle épinière

La **Figure 74** représente les composants cellulaires altérés au niveau de la moelle épinière des souris EAE + véhicule en comparaison des souris CTL + véhicule. Les résultats obtenus montrent l'altération de 12 composants cellulaires, le noyau étant le plus altéré (50%), suivi du cytosol (33%) puis avec le même pourcentage de dérégulation des mitochondries, de la membrane plasmatique, des complexes du protéosome et du domaine extracellulaire (16%).



**Figure 74 : Composants cellulaires dans lesquels les protéines sont dérégulées au niveau de la moelle épinière des souris EAE + véhicule en comparaison aux souris CTL + véhicule**

La **Figure 75** représente les composants cellulaires corrigés par le traitement au GSE au niveau de la moelle épinière des souris EAE. Les résultats obtenus l'implication de 16 composants cellulaires, ceux présentant les pourcentages de dérégulation les plus importants étant le cytosol (50%) suivi du noyau (30%) et des mitochondries (28%).



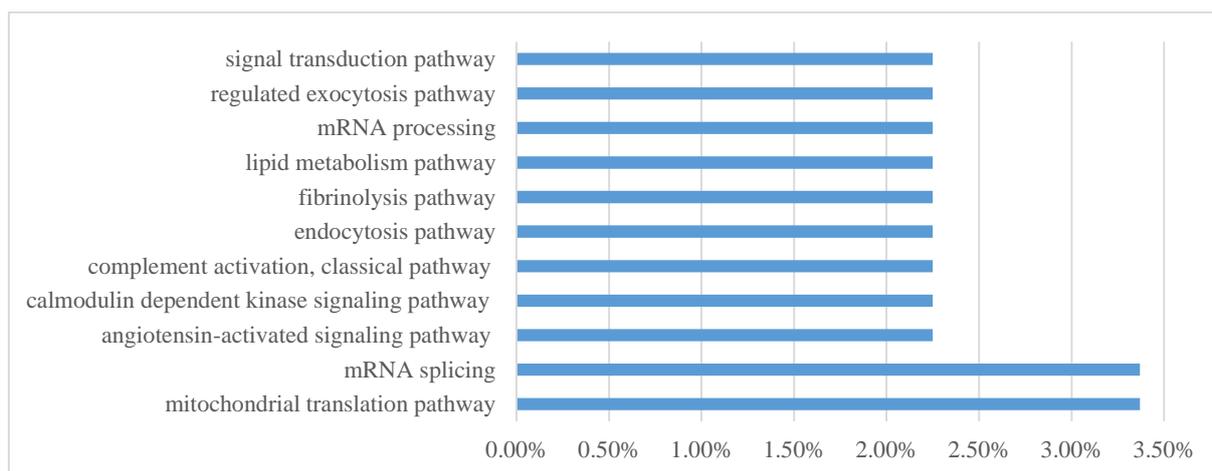
**Figure 75 : Composants cellulaires dans lesquels les protéines sont exprimées différemment au niveau de la moelle épinière des souris EAE + GSE en comparaison aux souris EAE + véhicule**

#### 5.3.4. Analyses par voie métabolique et/ou de signalisation cellulaire

Le dernier niveau d'analyse concerne les voies métaboliques et/ou de signalisation cellulaire dans lesquelles les protéines dérégulées sont impliquées.

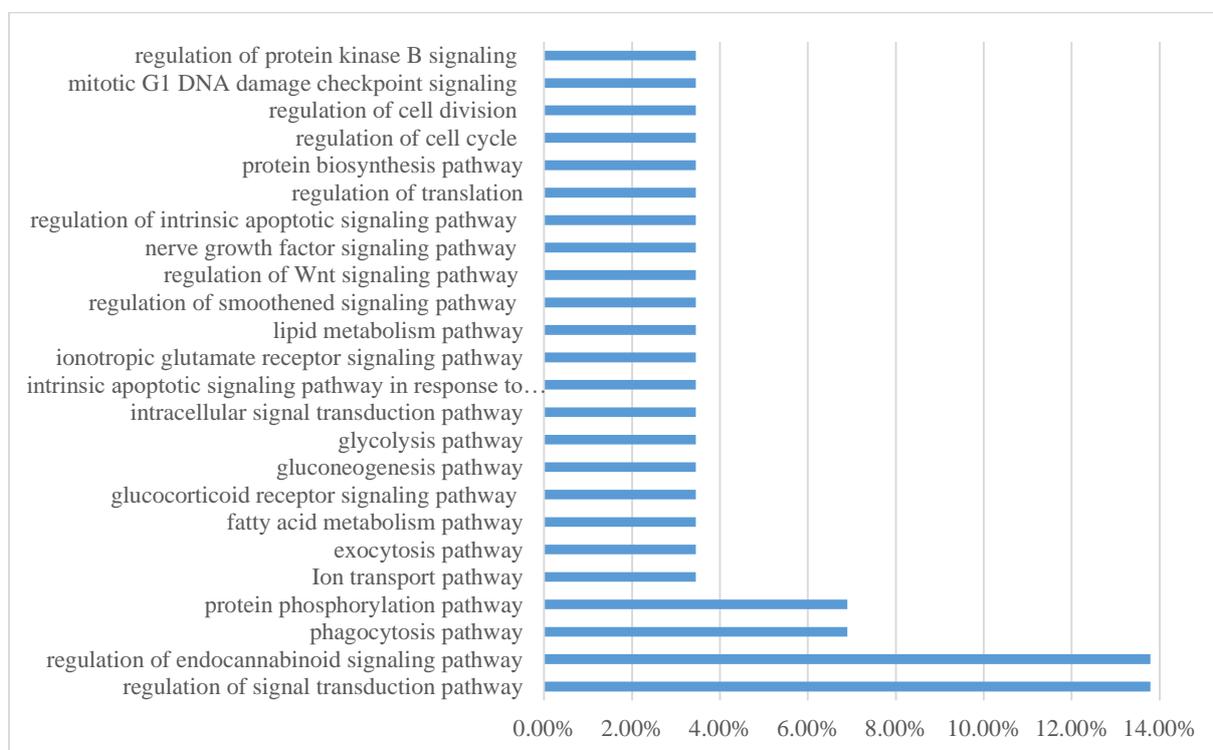
##### A. Au niveau du cerveau

La **Figure 76** représente les voies métaboliques et/ou de signalisation cellulaire dérégulées au niveau du cerveau des souris EAE qui sont au nombre de 12. La voie de signalisation des récepteurs couplés aux protéines G est la voie la plus altérée suivie par la voie de traduction mitochondriale et l'épissage d'ARNm.



**Figure 76 : Voies métaboliques et/ou de signalisation cellulaire au sein desquelles les protéines sont dérégulées au niveau du cerveau des souris EAE + véhicule en comparaison aux souris CTL + véhicule**

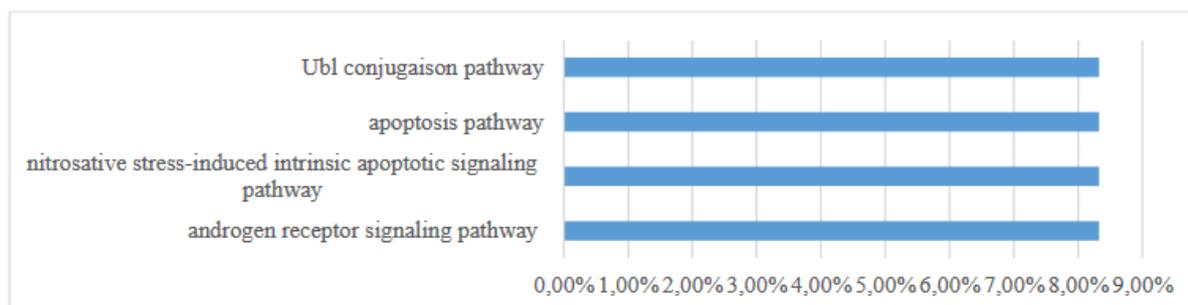
La **Figure 77** représente les voies métaboliques et/ou de signalisation cellulaire corrigées par le GSE au niveau du cerveau des souris EAE +GSE en comparaison aux souris EAE + véhicule. Sur les 24 voies impliquées, les résultats montrent que les voies de transduction du signal et de signalisation des endocannabinoïdes puis la phagocytose sont les voies les plus corrigées par le GSE au niveau du cerveau des souris EAE.



**Figure 77 : Voies métaboliques et/ou de signalisation cellulaire au sein desquelles les protéines sont différemment exprimées au niveau du cerveau des souris EAE + GSE en comparaison aux souris EAE + véhicule**

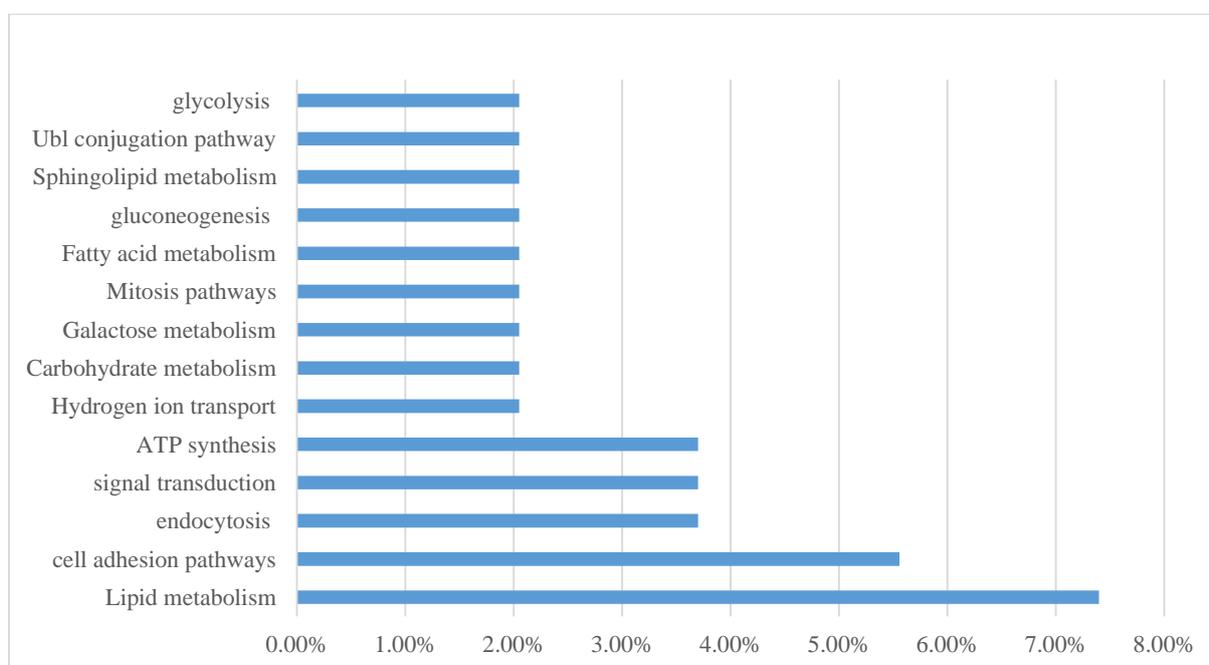
### B. Au niveau de la moelle épinière

La **Figure 78** montre que seules 4 voies sont dérégulées au niveau de la moelle épinière des souris EAE + véhicule en comparaison aux souris CTL + véhicule. Il s'agit de la voie de conjugaison Ubl, la voie d'apoptose, la voie de signalisation apoptotique intrinsèque induite par le stress nitrosatif, la voie de signalisation des récepteurs aux androgènes.



**Figure 78 : Voies métaboliques et/ou de signalisation cellulaire au sein desquelles les protéines sont dérégulées au niveau de la moelle épinière des souris EAE + véhicule en comparaison aux souris CTL + véhicule**

Enfin, la **Figure 79** représente les voies métaboliques et/ou de signalisation cellulaire corrigées par le GSE au niveau de la moelle épinière des souris EAE. Sur les 14 voies métaboliques modifiées, le métabolisme des lipides est le plus impacté par le GSE suivi des voies de l'adhésion cellulaire, de l'endocytose et de la transduction du signal.



**Figure 79 : Voies métaboliques et/ou de signalisation cellulaire au sein desquelles les protéines sont différemment représentées au niveau de la moelle épinière des souris EAE + GSE en comparaison aux souris EAE + véhicule**



## **Partie 4 : Discussion**



La SEP constitue un vrai problème de santé publique. Le fait de comprendre cette pathologie, qui affecte les jeunes adultes, et d'étudier les mécanismes physiopathologiques impliqués directement ou indirectement dans le développement et/ou la progression de cette pathologie permettra d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques afin de développer de nouveaux traitements permettant de guérir ou retarder l'évolution de la maladie, tout en améliorant au maximum la qualité de vie des malades. Jusqu'à présent, la SEP reste une maladie incurable. Malgré une étiologie complexe et mal comprise, de nombreuses études suggèrent que le stress oxydant joue un rôle crucial dans la démyélinisation, les dommages axonaux et la neurodégénérescence (**Pegoretti et al., 2020**). De plus, de nombreuses études suggèrent que les polyphénols végétaux pourraient avoir des effets neuroprotecteurs au cours de la SEP notamment par la régulation du stress oxydant (**Miller et al., 2019**). Au cours de ce travail de thèse, nous avons évalué l'effet d'un traitement curatif au GSE dans un modèle murin reproduisant certaines des caractéristiques cliniques et neuropathologiques de la SEP, l'EAE.

## **I. Le traitement curatif à l'extrait de pépin de raisin corrige les troubles comportementaux, la démyélinisation et l'activation gliale chez les souris atteintes d'encéphalomyélite auto-immune expérimentale du fait de ses propriétés antioxydantes**

### **1. Correction des troubles comportementaux**

Tout au long de l'étude, le modèle utilisé est celui décrit par **Olechowski et al., (2009)**. Celui-ci permet d'étudier les troubles sensitifs car les troubles moteurs présents dans le modèle sont suffisamment modérés pour ne pas interférer avec la mesure des premiers. Dans notre modèle et comme décrit précédemment par **Olechowski et al., (2009)**, les symptômes moteurs mis en évidence par la mesure quotidienne du score EAE ont débuté par une paralysie de la queue dès J9 post-induction correspondant au grade 1. Ensuite, ces symptômes ont évolué vers des déficits plus sévères correspondant au grade 3 ou grade 4 à partir de J21. Le traitement curatif au GSE initié à J10 a réduit l'évolution du score EAE dès J14 et une correction complète a été obtenue à partir de J25.

Au cours de notre étude, nous avons reproduit la chronologie des symptômes sensitifs décrits par **Olechowski et al., (2009)**, à savoir la présence d'une allodynie mécanique robuste avant et au début des déficits neurologiques, associée à une allodynie au froid survenant dès le pic des symptômes et perdurant durant la phase chronique de la maladie. Nous avons montré que le traitement au GSE a un effet curatif sur le développement de l'hypersensibilité mécanique et un effet préventif sur le développement de l'allodynie au froid. Pour permettre l'évaluation

des dysfonctionnements sensitifs, les troubles moteurs induits par l'immunisation doivent être réduits. Comme décrit précédemment dans ce modèle EAE (**Olechowski et al., 2009, Olechowski et al., 2013**), aucune altération de l'activité locomotrice spontanée évaluée par le test en champ ouvert (*Open field test* en anglais), ni de la coordination motrice évaluée par le test du rotarod n'a été observée dans cette étude et le traitement curatif au GSE n'affecte aucun de ces comportements.

Étant donné que la douleur est fréquemment associée avec certains autres symptômes de la SEP (on parle parfois de symptômes interférents), notamment la fatigue, les troubles de l'humeur (dépression et anxiété) et les troubles cognitifs (**Heitmann et al., 2020 ; Marck et al., 2017**), une évaluation large des troubles du comportement chez les souris EAE est importante pour se rapprocher le plus possible de la présentation clinique de la maladie. En ce qui concerne les troubles cognitifs, les données chez les souris EAE sont rares. Cependant, des troubles de la mémoire épisodique ont été décrits dans le même modèle CFA-EAE que celui utilisé dans notre étude (**Olechowski et al., 2013**) et des déficits de la mémoire associée à l'hippocampe ont été démontrés dans un autre modèle CFA-EAE (**Hollinger et al., 2016 ; Planche et al., 2017**). Malheureusement, nous n'avons pas observé de défaut de mémoire de travail en utilisant le test du labyrinthe en Y dans notre étude. En ce qui concerne les comportements liés à l'anxiété, des comportements exploratoires réduits lors du labyrinthe en croix surélevé (**Haji et al., 2012**) et du test de l'open field ont été observés uniquement pendant la phase pré-symptomatique de la maladie (avant l'apparition du score clinique) dans un modèle de souris CFA-EAE légèrement différent du nôtre (**Peruga et al., 2011 ; Haji et al., 2012**). Une fois encore, nos données obtenues en utilisant les mêmes tests n'ont montré aucun comportement lié à l'anxiété dans notre modèle de souris EAE. Les différences observées entre nos résultats et les données de la littérature concernant à la fois les troubles cognitifs et les comportements liés à l'anxiété pourraient s'expliquer par la différence entre les protocoles d'immunisation ou le moment choisi pour l'évaluation de ces comportements. En effet, nous n'avons pas évalué ces symptômes pendant la phase pré-symptomatique de la maladie, mais uniquement durant la phase symptomatique. Quoi qu'il en soit, il s'agit d'une limite à nos résultats car nous n'avons pas eu l'occasion d'évaluer l'effet du traitement curatif par le GSE sur les troubles cognitifs et les comportements liés à l'anxiété ainsi que sur les troubles moteurs sévères. Des études futures utilisant des périodes d'évaluations comportementales différentes ou d'autres variantes du modèle de souris EAE, ou d'autres modèles non-EAE de la SEP, sont ainsi envisagées pour mieux caractériser l'effet bénéfique potentiel du GSE sur l'ensemble des troubles et symptômes associés à la SEP.

## 2. Un effet sur les symptômes cliniques médié par ses propriétés antioxydantes

Comme indiqué précédemment, la SEP est une maladie multifactorielle dans laquelle le stress oxydant est un contributeur secondaire à la progression de la maladie, pouvant perturber diverses voies de signalisation et affecter de multiples processus biologiques. Il contribue notamment à l'aggravation de la neurodégénérescence (**Ciccarelli et al., 2014 ; Mahad et al., 2015 ; Peruzzoti-Jametti and Pluchino, 2018**) et pourrait donc constituer une cible thérapeutique de choix. Au cours de cette étude, nous nous sommes intéressés à l'évaluation de l'effet du traitement curatif au GSE sur les conséquences précoces du stress oxydant, à savoir l'oxydation des lipides et des protéines. Les résultats obtenus montrent qu'il y a une accumulation du MDA, et donc de la lipoperoxydation, au niveau du cerveau et de la moelle épinière lors du pic de la maladie (à J20 post-induction) qui disparaît au cours de la phase chronique (à J30 post-induction). En revanche, une augmentation de l'oxydation des protéines a été observée durant les deux phases de la maladie à travers une accumulation de la concentration en protéines carbonylées. Ces résultats concordent avec une étude précédente réalisée sur des modèles rats EAE de souche Lewis immunisés avec un homogénat de moelle épinière de cobaye montrant que les produits de la peroxydation lipidique s'accumulent tôt dans la moelle épinière avant même l'apparition des symptômes cliniques alors que l'oxydation des protéines apparaît plus tardivement avec un niveau élevé des protéines carbonylées uniquement au moment du pic des symptômes (**Smerjac and Bizzozero, 2008**). De manière très significative, le traitement curatif au GSE a corrigé l'oxydation des lipides et la carbonylation des protéines au niveau du cerveau et de la moelle épinière dès J20.

Nous avons ensuite évalué l'effet antioxydant du GSE en se concentrant sur la première ligne de défense intracellulaire antioxydante, à savoir les enzymes SOD, catalase et GPx. Nos résultats ont montré une diminution significative de l'activité enzymatique de ces trois acteurs au niveau du cerveau et de la moelle épinière des souris EAE, au moment du pic des symptômes et jusqu'à la phase chronique de la maladie. La diminution de ces activités enzymatiques est associée à une diminution de l'expression protéique de la SOD1 cytosolique, de la SOD2 mitochondriale, de la catalase et de la GPX1. Ces données sont en accord avec des études antérieures qui ont montré une diminution pendant la phase chronique de la maladie des activités des enzymes antioxydantes au niveau du cerveau des souris EAE-CFA légèrement différentes de notre modèle (**Kamisili et al., 2018 ; Ghareghani et al., 2018**). A notre connaissance, notre étude est la première à avoir évalué l'activité enzymatique des trois principales enzymes antioxydantes, et ce : 1) durant les stades précoces et tardifs du développement de la maladie et 2) à la fois dans le cerveau et la moelle épinière. Le

traitement curatif au GSE a amélioré de manière significative les activités SOD, CAT et GPx dans le cerveau et la moelle épinière dès 10 jours de traitement. Ces résultats ont également été retrouvés après 20 jours de traitement même si l'effet du GSE n'est plus significatif à J30 dans la moelle épinière pour l'activité SOD et GPx, principalement parce que les diminutions observées chez les souris EAE + véhicule pour ces conditions sont plus limitées. Ces effets bénéfiques sur les activités enzymatiques ont toujours été associés à une correction de la diminution de l'expression au niveau protéique. Par ailleurs, il semble que l'effet correcteur du GSE est plus prononcé pour la SOD1 que pour la SOD2 notamment à J20. Ces données suggèrent fortement que chez les souris EAE, le GSE est capable d'induire l'expression des enzymes antioxydantes afin de restaurer les défenses antioxydantes de première ligne. De manière très importante, les marqueurs du stress oxydant corrigés par le GSE chez les souris EAE sont ceux altérés chez les patients atteints de SEP. En effet, la peroxydation des lipides ou de leurs aldéhydes de dégradation, tel que le MDA, les protéines oxydées ainsi que des dommages oxydants sur l'ADN ont été observés dans les lésions de patients atteints de la SEP (**Lassmann et van Horssen, 2016 ; Kemp et al., 2016**). Bien qu'initialement élevés dans les lésions actives, les niveaux des enzymes antioxydantes sont souvent réduits au cours de la progression de la maladie (**van Horssen et al., 2008 ; Kemp et al., 2016**). Dans le même temps, les enzymes qui exacerbent la production des RL telles que la NADPH oxydase sont à la hausse (**Haider et al., 2011**). Ces preuves cliniques pour l'augmentation des marqueurs du stress oxydant dans la SEP ont récemment été renforcées par une méta-analyse confirmant le niveau accru de MDA dans le sang et le LCR des patients atteints de SEP (**Zhang et al., 2020**).

Une limitation importante de notre étude est qu'elle n'évalue pas la production des espèces réactives ni la signalisation redox aberrante conduisant à l'oxydation des macromolécules du fait du choix de notre protocole thérapeutique. Le traitement par le GSE est initié à J10, lorsque les premiers symptômes de l'EAE sont déjà observés. Ainsi, l'évaluation dans un futur proche de l'effet du GSE, en utilisant une initiation plus précoce du traitement, sur la production d'espèces réactives et la signalisation redox aberrante serait d'un grand intérêt. De plus, lors de notre étude à J20, nous ne pensions pas trouver une amélioration aussi importante du stress oxydant chez les souris EAE traitées au GSE. Il serait intéressant, lors d'un traitement initié à J10, de réaliser une étude biochimique plus précoce (probablement à J15) pour avoir une meilleure idée de la cinétique d'effet du GSE sur les atteintes pro-oxydantes induites par l'EAE.

### 3. Correction de l'expression des protéines de la myéline, de la prolifération des cellules astrocytaires et microgliales et de l'expression des sirtuines 1 et 2

Dans la présente étude, nous avons évalué la démyélinisation à travers la détermination de l'expression par western blot de la MBP et de la CNPase qui sont les deux protéines majeures de la myéline du SNC. Nous avons constaté une réduction significative de l'expression de ces deux protéines au niveau du cerveau et de la moelle épinière des souris EAE, durant le pic des symptômes et lors de la phase chronique de la maladie. Ces données ont confirmé que la démyélinisation affecte le SNC au cours de la phase aiguë et chronique de l'EAE, un résultat déjà largement décrit dans la littérature (**Souris EAE : Luo et al., 2018 ; Rats EAE : Dabrowska et al., 2017**). Au niveau du cerveau et de la moelle épinière, le traitement curatif au GSE a corrigé l'expression de la CNPase dès 10 jours de traitement, et n'a montré une correction significative de la diminution de l'expression de MBP que plus tard à J30 post-induction. L'effet rapide du GSE sur les niveaux d'expression de CNPase pourrait s'expliquer par le fait qu'étant une enzyme avec un rôle fonctionnel, son expression pourrait être diminuée précocement dans les oligodendrocytes en souffrance mais restaurée rapidement dès l'effet correcteur d'un traitement (**Raasakka et Kursula, 2014**). A l'opposé, la MBP étant une protéine structurale nécessaire au maintien de la gaine de myéline et au processus de myélinisation, son expression est diminuée principalement lors des processus de démyélinisation. Pour rétablir une expression normale, le traitement doit arrêter la démyélinisation et favoriser les processus de remyélinisation, ce qui demande plus de temps (**Martinsen et Kursula, 2022**).

Chez les patients atteints de SEP et dans le modèle EAE, la destruction de la myéline dans le SNC est associée à une activation des cellules de la microglie et des astrocytes qui sont alors impliqués dans la progression de la maladie. Au cours de notre étude, une augmentation de l'expression des protéines microgliales (Iba1) et astrogliales (GFAP) a été observée au niveau du cerveau et de la moelle épinière des souris EAE lors du pic des symptômes jusqu'à la phase chronique de la maladie. En accord avec la littérature, la surexpression d'Iba1 est plus importante que celle de GFAP (**Valente et al., 2017**) confirmant que la microglie joue un rôle majeur dans la physiopathologie de l'EAE (**Brambilla, 2019**). De manière significative, le traitement au GSE a pu corriger la surexpression d'Iba1 lors des phases précoces et tardives de la maladie, et la surexpression de GFAP uniquement lors de la phase tardive.

Les dysfonctionnements des sirtuines et particulièrement SIRT1 ont été décrits comme participant à la progression de plusieurs maladies neurodégénératives dont la SEP (**Leite et al., 2021 ; Shen et al., 2021**). Notre étude a montré une diminution de SIRT1 dans le cerveau

et la moelle épinière des souris EAE à partir du pic des symptômes jusqu'à la phase chronique de la maladie, tandis que l'expression de SIRT2 a été diminuée uniquement dans la moelle épinière durant les deux phases de la maladie. Nos données sont conformes à la littérature où une diminution de l'expression de SIRT2 a été observée dans le modèle EAE et dans des lésions cérébrales *post-mortem* des patients (**Jastorff et al., 2009**). Plus largement, des diminutions de l'expression de cette protéine ont été retrouvées dans des modèles de dégénérescence axonale et de douleur neuropathique (**Fourcade et al., 2018 ; Zhang and Chi, 2018**). La surexpression de SIRT2 par utilisation d'un vecteur de type adénovirus dans un modèle de douleur neuropathique a permis de corriger les symptômes douloureux, faisant de SIRT2 une cible particulièrement intéressante pour le traitement des douleurs neuropathiques (**Zhang and Chi, 2018**). L'implication de SIRT1 dans l'EAE semble controversée avec des études montrant un effet délétère lorsqu'elle est exprimée dans les cellules immunitaires périphériques (**Lim et al., 2015**) et plutôt un effet bénéfique lorsqu'elle est exprimée dans les tissus centraux (**Nimmagadda et al., 2013 ; Gandy et al., 2019**). Chez les patients atteints de SEP, les données sont rares mais suggèrent un effet délétère de la diminution de l'expression de SIRT1 (**Ciriello et al., 2018**). Le traitement au GSE a corrigé la diminution de l'expression de SIRT1 dans le cerveau et la moelle épinière lors des phases précoce et chronique de la maladie. Les données obtenues dans cette étude suggèrent que l'effet bénéfique du GSE pourrait être en partie dû à son action sur la signalisation des sirtuines. La présence de quercétine (**Kadri et al., 2019**), qui a été décrite comme un puissant inhibiteur de la NAD<sup>+</sup>ase CD38, augmentant la disponibilité cellulaire du NAD<sup>+</sup> et réduisant les niveaux d'acétylation des protéines, pourrait expliquer l'effet du GSE sur l'expression de SIRT1 et de SIRT2 (**Escande et al., 2013**). Nos données ne permettent pas d'expliquer précisément l'implication des sirtuines dans le développement de la pathologie EAE. Cependant, elles font partie d'un faisceau croissant de données suggérant que l'activation des sirtuines pourrait être compromise dans les maladies auto-immunes et neurologiques et pourrait ainsi représenter des cibles thérapeutiques d'intérêt. Dans ce contexte, le GSE pourrait présenter un intérêt particulier en étant capable d'améliorer à la fois l'expression de SIRT1 et de SIRT2.

Une des limites de ce travail est d'avoir étudié les atteintes neuropathologiques de l'EAE et leurs corrections par le traitement au GSE en utilisant seulement des dosages par westernblot. En effet, cette technique nous a permis d'avoir une idée générale de l'expression des protéines sans avoir une idée de leur répartition dans les différentes zones du cerveau et de la moelle épinière. Pour cela, il serait très intéressant dans premier temps de compléter cette étude avec

une étude histologique permettant de cibler les zones de lésions et de démyélinisation au niveau du cerveau et de la moelle épinière. Pour cela, les techniques de la coloration de Luxol Fast blue (**Doron et Danielle, 2019**) ou des études en microscopie électronique pourraient être mise en œuvre. Des expériences de coloration standard par l'hématoxyline-éosine permettraient de visualiser les zones d'inflammation et une coloration par imprégnation de Bielschowsky (Biel) pourrait être utilisée pour la détection de l'amincissement de la densité axonale dans les lésions (**Doron et Danielle, 2019**). Dans un second temps, il serait intéressant de réaliser une étude immunohistochimique sur des coupes de cerveau et de moelle épinière pour avoir une idée plus précise de la localisation des différents processus physiopathologiques ; les cellules immunitaires pourraient être étudiées par le marquage des lymphocytes T CD3 et des lymphocytes T cytotoxiques CD8, qui sont généralement présents dans les lésions actives de la SEP. Concernant l'activation gliale, les astrocytes pourraient être étudiés à l'aide d'un Ac anti- GFAP et la microglie à l'aide d'un Ac anti-Iba-1(**Doron et Danielle, 2019**).

#### **4. Un traitement bien toléré ce qui est très encourageant pour une future utilisation clinique**

Le GSE a été utilisé à une dose élevée (500 mg/kg PC) mais n'a pas conduit à des effets pro-oxydants indésirables au niveau du cerveau et de la moelle épinière qui auraient pu se traduire au niveau du groupe CTL + GSE par la diminution des niveaux de MDA, de la teneur en protéines carbonylées et également par une augmentation de l'activité des enzymes antioxydantes. Notre travail confirme les données obtenues précédemment par l'équipe du LSBA sur l'innocuité du GSE utilisé à très forte dose (2,5 g/kg PC) et à long terme (**Charradi et al., 2013**) ainsi que sa capacité à traverser la BHE pour atteindre le SNC en quantité suffisante et exercer ses effets bénéfiques pléiotropes. Les limites de la thérapie antioxydante en pathologie humaine ont été récemment décrites par **Forman and Zhang, 2021** en insistant sur le fait que « l'affirmation selon laquelle un antioxydant est un piègeur de  $\bullet\text{OH}$  n'a pas de sens car presque toutes les molécules réagissent avec  $\bullet\text{OH}$  à peu près au même rythme ; ainsi, la seule défense contre  $\bullet\text{OH}$  est d'empêcher sa formation, et le moyen le plus efficace d'y parvenir est l'élimination du  $\text{H}_2\text{O}_2$  ». Ainsi, les composés qui ont la capacité d'augmenter les activités SOD et CAT ou d'augmenter la biosynthèse de ces enzymes sont d'un grand intérêt. De plus, l'efficacité des traitements antioxydants est limitée par la mesure dans laquelle le stress oxydatif joue un rôle dans la pathologie traitée. Alors que le stress oxydant contribue de façon secondaire au développement de la SEP, des médicaments à effet antioxydant ont déjà

montré leur efficacité et sont utilisés chez les patients atteints de SEP, notamment le diméthyle (Blair HA, 2019). Ces données renforcent l'intérêt potentiel du GSE dans le traitement de la SEP.

## II. Quels sont les composés de l'extrait de pépins de raisin pouvant expliquer son effet thérapeutique ?

### 1. Impact de la méthode d'extraction

Avant de nous intéresser aux différents composés constituant le GSE et d'identifier parmi les composés ceux pouvant rendre compte de l'effet thérapeutique de l'extrait, revenons dans un premier temps sur le protocole d'extraction. Le GSE utilisé pour le traitement curatif précoce est un extrait préparé à partir de la poudre de pépins de raisin *Vitis Vinifera* en utilisant de l'éthanol 10% comme solvant d'extraction. Le choix du pourcentage du solvant est en corrélation avec la toxicité induite par les solvants organiques. Bien qu'une étude faite par notre équipe en Tunisie ait montré que l'extraction du GSE avec de l'éthanol 100% donne le rendement le plus élevé avec environ 15% de matière sèche, le GSE extrait avec de l'éthanol 10% montre un rendement égal à 2,57% de matière sèche (Kadri *et al.*, 2019) mais permet l'utilisation par la suite de l'extrait *in vivo* ce qui n'est pas possible avec de l'éthanol 100%.

Suite au fractionnement du GSE, nous avons constaté que la phase lipidique est majoritaire, représentant 50,75% de la matière sèche. Il est important de noter que les pépins de raisin contiennent une quantité importante de composés lipophiles comme notamment les acides gras (Garavaglia *et al.*, 2016). La deuxième fraction majoritaire est la phase phénolique qui représente 30,75% de la matière sèche, tandis que la phase aqueuse est la fraction la plus faible, ne représentant que 16,25%. Par ailleurs, peu de travaux ont porté sur les composés solubles qui existent dans les pépins de raisin et aucun travail antérieur ne s'est intéressé à la partie glucidique.

Par ailleurs, nous avons quantifié la teneur en polyphénols totaux dans l'extrait de GSE et avons montré que l'extraction avec de l'éthanol 10% donne une quantité faible, en comparaison avec celle obtenue avec d'autres solvants d'extraction. Notamment, des protocoles d'extraction utilisant l'acétate d'éthyle se sont avérés plus efficaces du point de vue du rendement (Das *et al.*, 2016 ; Masciet *et al.*, 2016). Par contre, en ce qui concerne les tanins condensés, notre extrait montre une teneur plus importante que celle obtenue avec d'autres solvants ; ceci est dû à la grande affinité de ces molécules polaires chargées positivement vis-à-vis de l'éthanol.

## 2. Compositions de l'extrait de pépins de raisin

La large gamme d'effets observée lors du traitement curatif précoce est très probablement due à la présence d'un grand nombre de composés bioactifs et à leur synergie. En effet, l'extrait de pépins de raisin est un mélange complexe de polyphénols, de flavonoïdes et de proanthocyanidines (Ma and Zhang, 2017 ; Kadri *et al.*, 2019 ; Unusan, 2020). Il est cependant intéressant de s'intéresser à la composition précise du GSE afin d'identifier les composés pouvant avoir un rôle prépondérant dans l'effet bénéfique du GSE dans le modèle EAE.

### 2.1. Phase polyphénolique

L'analyse et l'identification des différents composés contenus dans les différentes phases ont montré que la phase polyphénolique contient au moins 15 polyphénols différents. Des travaux antérieurs menés par d'autres équipes ont montré que le GSE pourrait contenir jusqu'à 54 polyphénols différents (Hollecker *et al.*, 2009). Ces différences de composition et d'abondance des polyphénols entre les équipes dépend essentiellement du cultivar de raisin et de la localisation et du climat de la zone de culture (Gupta *et al.*, 2020).

Même si cela reste assez approximatif, le tableau ci-dessous présente les quantités théoriques administrées chaque jour à chaque souris pour les principaux composants du GSE (calcul réalisé pour une souris de 20 g recevant 200 µl de GSE à 500 mg/kg).

**Tableau 31: Quantité en µg des composés identifiés dans la phase phénolique de l'extrait de pépins de raisin dans 200 µl d'extrait**

Phase phénolique	Quantité en µg/200 µL extrait
Epicatéchine	27,80
Catéchine	27,18
Acide gallique	10,14
Ester éthylique d'acide gallique	4,5
Quercétine	2,13

L'analyse générale de la composition phénolique (Tableau 31) a montré que l'épicatéchine et la catéchine sont les composés phénoliques les plus abondants avec une abondance comparable de 35,21% et 34,41% respectivement, de la teneur totale en polyphénols. Ceci confirme les résultats obtenus par plusieurs autres études (Hollecker *et al.*, 2009). En raison de nombreux groupes hydroxyles, les catéchines ont de puissantes propriétés antioxydantes et chélatrices de métaux, qui ont été confirmées par des études *in vitro* et

cliniques (**Sutherland et al., 2006 ; Bernatoniene and Kopustinskiene, 2018**). Certains travaux se sont concentrés sur l'utilisation des catéchines pour les maladies neurodégénératives, par exemple la maladie d'Alzheimer et la maladie de Parkinson (**Mandel et al., 2005 ; Ide et al., 2015**). Ces composés ont également montré des effets thérapeutiques dans d'autres troubles neurologiques et le déclin cognitif lié à l'âge (**Sebastiani et al., 2021**). Dans le cas de la SEP et de l'EAE le composé le plus étudié est l'épigallocatechine-3-gallate (EGCG) qui est la principale catéchine retrouvée dans le thé vert. Ce polyphénol a montré son effet bénéfique chez des souris EAE, immunisées avec un peptide dirigé contre PLP, en réduisant les dommages axonaux et la mort des cellules neuronales en ciblant notamment la formation des ROS (**Aktas et al., 2004**). Dans cette même étude il a également été montré que l'EGCG permet d'interférer avec le cycle cellulaire et permet d'activer le voie NF- $\kappa$ B et la voie de dégradation des protéines (protéasome) ce qui permet par voie de conséquence à diminuer la prolifération des LT CD4<sup>+</sup>. Une autre étude a montré que l'EGCG permet, de manière dose-dépendante, d'améliorer les symptômes cliniques et de retarder l'apparition de la maladie chez les souris atteintes d'EAE et ceci avec à une réduction de l'infiltration inflammatoire et de la démyélinisation dans le SNC (cerveau et moelle épinière de ces souris) (**Wanget al., 2012**). Dans les deux études *in vivo*, l'EGCG présentait des effets bénéfiques pour des doses journalières administrées allant de 12 à 600  $\mu$ g suggérant que les 27  $\mu$ g de catéchine et 27  $\mu$ g d'épicatéchine présents dans le GSE pourraient avoir des effets similaires dans notre étude. Cela reste néanmoins à nuancer par les résultats d'une étude *in vitro* ayant montré, que comparé à différentes catéchines, l'EGCG est la plus efficace pour lutter contre le stress oxydant induit par le peroxyde d'hydrogène et possède la meilleure activité de piégeage des radicaux (**He et al., 2018**). Ainsi, des doses plus importantes en catéchine et épicatéchine sont peut-être nécessaire pour avoir *in vivo* des effets similaires à l'EGCG.

En plus de la catéchine et de l'épicatéchine, les pépins de raisin contiennent différentes classes de polyphénols tels que les flavonoïdes, les acides phénoliques et les stilbènes (**Sochorova et al., 2020**). Notre étude a montré que l'acide gallique est le troisième composé polyphénolique le plus abondant du GSE. Ce résultat confirme les données retrouvées dans plusieurs études antérieures ayant déterminé la composition phénolique des pépins de raisin (**Pastrana-Bonilla et al., 2003 ; Huang et al., 2005 ; Hernandez-Jiménez et al., 2009**). Il existe sous forme d'acide gallique simple (12,84%) et d'ester éthylique d'acide gallique (1,73%). Au cours des dernières années plusieurs études se sont intéressées aux effets biologiques de l'acide gallique (**Corazzari et al., 2016 ; Lima et al., 2016**). Il a été rapporté que l'acide gallique montre une efficacité contre les troubles du SNC, notamment les maladies

d'Alzheimer et de Parkinson, l'ischémie/reperfusion, la dépression et l'anxiété (**Shabani et al., 2020**). Une étude récente montre que l'acide gallique supprime l'inflammation (diminue l'expression de COX2 et de NFκB) et favorise la myélinisation (augmentation de l'expression de MBP) dans des cultures de cellules gliales et de neurones hippocampiques suite à l'induction d'une démyélinisation par l'administration de lysophosphatidylcholine (LPC) (**Siddiqui et al., 2019**).

De plus, nous avons noté que le GSE contient de la quercétine et des dérivés de la quercétine. Comme mentionné précédemment, la quercétine est un des polyphénols qui pourrait être impliqué dans la régulation à la hausse des sirtuines. Des études *in vitro* ont également montré que la quercétine peut diminuer la phagocytose de la myéline par les macrophages et pourrait ainsi limiter le processus de démyélinisation au cours de la SEP (**Hendriks et al., 2003**). Enfin, et étant probablement son effet principal au regard des résultats de cette étude, la quercétine est un puissant activateur de NRF2, qui doit sans doute être impliqué dans l'augmentation des enzymes antioxydantes (**Forman et Zhang, 2021**). De plus, la quercétine aurait des effets immunomodulateurs intéressants dans une pathologie telle que la SEP. En effet, dans une étude *in vitro* menée sur des cellules mononucléaires de sang périphérique de patients atteints de SEP, le traitement à la quercétine a réduit leur prolifération et a modulé les niveaux d'IL-1β, de métalloprotéinase matricielle 9 et de TNF-α dans les surnageants de culture (**Shen et al., 2021b**). Enfin, dans une étude chez les souris EAE-CFA (SJL/J femelle), le traitement à la quercétine a inhibé l'activation induite par l'IL-12 de JAK2, TYK2, STAT3 et STAT4, ainsi que la différenciation Th1 des lymphocytes. Cet effet immunomodulateur semble être responsable de la correction de la démyélinisation au niveau de la moelle épinière des souris EAE mise en évidence par une augmentation de l'expression de MBP (**Muthian and Bright, 2004**). Dans cette étude, la quercétine est administrée quotidiennement aux doses de 50 ou 100 µg, très supérieure à la quantité de quercétine administrée dans notre GSE par voie intra-péritonéale.

Même si les effets protecteurs du GSE vis-à-vis de plusieurs pathologies ont été largement attribués aux polyphénols (**Mokni et al., 2016**), nous n'avons pas la certitude que tous les effets observés sont réellement médiés par ceux-ci. En effet, le GSE fourni par les industriels ou obtenu à partir d'extraits de pépins de raisin préparés artisanalement contient également des composés non phénoliques qui pourraient avoir également des effets (**El-Ashmawy and Bayad, 2016 ; Downing et al., 2017**). Aussi, est-il intéressant de s'intéresser à la composition des autres phases du GSE.

## 2.2. Phase lipidique

Au niveau de la phase lipidique, le monostéarate de glycérol, communément appelé GMS, représente le lipide le plus abondant avec 69% de la teneur totale en lipides. Le GMS a été utilisé dans plusieurs études comme une matrice pour les nanoparticules lipidiques solides afin d'améliorer le transport des composés à travers la BHE (**Garanti *et al.*, 2016 ; Natarajan *et al.*, 2016**). Il est probable que dans des conditions spécifiques, et notamment dans notre extrait, le GMS forme des complexes avec les polyphénols permettant leur passage à travers la BHE. Il est également important de noter que l'absorption intestinale de GMS est très élevée.

La 2-monostéarine représente le deuxième composé lipidique le plus abondant du GSE. C'est un isomère de GMS dans lequel l'acide gras est associé au second carbone du glycérol. La littérature sur la 2-monostéarine n'est pas riche et peu ou presque pas d'études décrivent ses effets biologiques.

De même dans cette fraction, nous avons trouvé la glycine, N-méthyl-n-propoxy carbonyl ester hexadécylique. Il a été récemment décrit que les acides aminés associés à certains acides gras peuvent avoir des effets biologiques. Parmi eux, la n-palmitoyl glycine est un complexe d'acide palmitique et de glycine qui est un arachidonoyl amide endogène capable de moduler le flux calcique et la production d'oxyde nitrique au niveau des neurones sensoriels (**Rimmerman *et al.*, 2008**).

## 2.3. Phase aqueuse

Dans la phase aqueuse, plus de 30 composés ont été identifiés, formés principalement par des glucides et quelques acides carboxyliques. Le glucopyranoside représente la molécule la plus abondante dans la phase aqueuse du GSE (26,42%). Le glucopyranoside n'a pas été décrit comme possédant d'activité biologique seul, mais associé à de nombreuses molécules, il permettrait de diminuer l'inflammation et le développement des métastases dans différents types de cancer en particulier ceux du sein et des poumons (**Nualkaew *et al.*, 2016 ; Chen *et al.*, 2016 ; Lee *et al.*, 2016**). Vient ensuite le fructofuranose qui se présente sous deux isomères 1 et 2 avec respectivement 17,31% et 2,23% suivi du saccharose (ou sucrose) avec 11,78%. De plus, le GSE contient 6,76% de sorbitol qui est un osmolyte contribuant à la stabilisation des protéines sous contrainte physique ou chimique stabilisant très probablement les autres composés contenus dans le GSE (**Oliveira *et al.*, 2016**).

Par ailleurs, nous avons trouvé que le GSE contient environ 2% de tréhalose. Ce composé a retenu l'attention au cours des dernières décennies pour son rôle dans la neuroprotection, en

particulier dans les modèles animaux de diverses maladies neurodégénératives, telles que les maladies de Parkinson, d'Alzheimer et de Huntington en agissant comme activateur de l'autophagie et inhibiteur de l'agrégation des protéines (Lee *et al.*, 2018 ; Khalifeh *et al.*, 2021). Ainsi, dans une étude menée dans un modèle de souris transgénique de la maladie de Huntington, le tréhalose a réduit les agrégats de polyglutamine dans le cerveau, amélioré le dysfonctionnement moteur, réduit l'atrophie cérébrale et augmenté la durée de vie chez les souris malades (Tanaka *et al.*, 2004). Le tréhalose a également amélioré la cognition et diminué le dépôt anormal d'A $\beta$  dans l'hippocampe d'un modèle de souris transgénique d'Alzheimer (Portbury *et al.*, 2017). Dans cette étude, le tréhalose était administré par voie orale dans l'eau de boisson à une concentration de 2% (représentant une dose journalière de 200  $\mu$ g pour une souris buvant 10 ml par jour) pour une durée moyenne de 30 jours. La dose de tréhalose administrée dans le GSE étant très inférieure (2.82  $\mu$ g) il est probable que le tréhalose ne soit pas impliqué dans l'effet du GSE mis en évidence dans notre étude, même si cela reste à confirmer.

Comme précédemment pour la phase phénolique, le **Tableau 32** ci-dessous présente les quantités théoriques administrées chaque jour à chaque souris pour les principaux composants du GSE pour les phases lipidiques et aqueuses (calcul réalisé pour une souris de 20 g recevant 200  $\mu$ l de GSE à 500 mg/kg).

**Tableau 32 : Quantité en  $\mu$ g des composés lipidiques et hydrosolubles identifiés dans l'extrait de pépins de raisin dans 200  $\mu$ l d'extrait**

<b>Phase lipidique</b>	<b>Quantité en <math>\mu</math>g/200 <math>\mu</math>L extrait</b>
Monostéarate de glycérol	89,55
2-monostéarine	20,10
Glycine, N-méthyl-n-propoxy carbonyl ester hexadécylique	12,65
<b>Phase aqueuse</b>	<b>Quantité en <math>\mu</math>g/200 <math>\mu</math>L extrait</b>
Glucopyranositol	11,01
Fructofuranose	7,21
Sorbitol	4,91
Tréhalose	2,82

### 3. Mesure biochimique des propriétés antioxydantes de l'extrait de pépins de raisin

Les effets antioxydants du GSE observés *in vivo* dans le modèle EAE ne sont pas surprenants dans la mesure où les études biochimiques préalables sur le GSE avaient déjà mis en évidence d'importantes propriétés antioxydantes. A la différence des autres tests, l'activité antioxydante totale permet non seulement de quantifier l'apport de l'activité antioxydante des polyphénols, mais aussi d'autres composés antioxydants tels que les vitamines. Nos résultats montrent une forte corrélation entre l'activité antioxydante totale de l'extrait et la teneur en polyphénols totaux, flavonoïdes totaux et tanins condensés. Le GSE aurait aussi un pouvoir chélateur d'ions ferreux important avec une IC 50 égale à 338 mg/mL. Le fer est le métal de transition pro-oxydant le plus puissant dans l'oxydation des lipides en raison de sa haute réactivité (Halliwell and Gutteridge, 1984). Ces résultats sont en accord avec l'étude de Keser *et al.*, 2013, ayant rapporté que les pépins de raisin ont un pouvoir chélateur puissant. Cette capacité de réduction du fer et donc de son effet pro-oxydant à travers la réaction de Fenton, est une caractéristique importante du GSE, qui serait impliquée dans les activités biologiques observées (Toyokuni, 2002). Il a été montré que parmi toutes les parties du raisin, les pépins possèdent la capacité de réduction du fer la plus élevée (Xu *et al.*, 2011 ; Keser *et al.*, 2013). De plus, nous avons montré que le GSE présente une activité de piégeage de DPPH très proche de celle du BHT avec une IC 50 égale à 229 µg/mL. Il reste à souligner que nos résultats confirment ceux obtenus par Keser *et al.*, 2014 qui ont montré que l'extrait éthanolique de GSE possède l'activité de piégeage de DPPH la plus élevée en comparaison à d'autres solvants d'extraction (Keser *et al.*, 2013).

### III. Premiers éléments d'analyse sur l'étude protéomique

L'approche par protéomique quantitative a permis d'évaluer les variations d'expression protéique au sein de nos 4 groupes d'animaux et d'identifier des modifications au sein des processus biologiques, des fonctions moléculaires, des composants cellulaires et des voies métaboliques liées au modèle EAE ou à l'effet du GSE au niveau du cerveau et de la moelle épinière. Il ne s'agit pas de la première étude transcriptomique concernant le modèle EAE ; d'autres études ont déjà été réalisées depuis le début des années 2000 (Sandi *et al.*, 2022). Cette étude nous permet néanmoins de confirmer de nombreux résultats de la littérature et ainsi valider notre travail d'un point de vue expérimental. Elle nous permet également d'identifier des voies de signalisation, autres que le stress oxydant, potentiellement impliquées dans l'effet thérapeutique du GSE.

### 1. Confirmation des processus biologiques impliqués dans le développement de l'encéphalomyélite auto-immune expérimentale

Au niveau du cerveau, l'analyse d'enrichissement des termes GO pour les processus biologiques a montré que l'un des processus les plus altérés chez les souris EAE + véhicule est l'inflammation avec notamment l'augmentation de l'expression des protéines DRS7B, RAC et CRK. RAC1 est un membre de la famille Rho, une petite protéine G ou petite GTPase, qui joue un rôle important dans l'induction de l'inflammation, de la réponse immunitaire et de l'apoptose (Sahajpal *et al.*, 2019; Hirohama *et al.*, 2020; Kowluru *et al.*, 2021). Les protéines adaptatrices Crk jouent un rôle clé dans la transduction du signal de certains récepteurs de surface. Elles sont impliquées dans les premières étapes de l'activation des lymphocytes grâce à leur interaction transitoire médiée par des domaines SH2 (« Src Homology 2 ») avec des molécules effectrices de la transduction de signal telles que Cbl, ZAP-70, CasL et STAT5. De plus, elles s'associent de manière constitutive, *via* leur domaine SH3 (« Src Homology 3 »), à des molécules effectrices, telles que C3G, qui sont impliquées dans l'adhésion cellulaire, la régulation de l'extravasation et le recrutement des lymphocytes vers les sites d'inflammation (Braiman and Isokov, 2015). L'implication de l'inflammation dans la physiopathologie de l'EAE est également illustrée dans notre étude par la sous-expression de la protéine responsable de la réponse cellulaire au TNF- $\alpha$  qui est la sulfhydryl oxydase liée au FAD (ALR). De même, une diminution d'expression de l'annexine A2 (ANXA2) qui est responsable de la régulation de l'activation des LT mémoire est également retrouvée. Des résultats similaires ont été obtenus par Hasan *et al.*, 2019 lors d'une étude en protéomique sur le cerveau de souris mâles EAE-CFA ayant montré une augmentation de l'expression des protéines impliquées dans l'inflammation dont Lcp1 et Pycard (Hasan *et al.*, 2019). Dans le cerveau des souris EAE non traitées, les résultats de notre étude protéomique confirment également l'implication du stress oxydant notamment par une augmentation de l'expression d'ATIF1 et EFTU ainsi que par une diminution de l'unité alpha de l'hémoglobine (HBA), une protéine responsable de la détoxification par les antioxydants cellulaires et du piégeage du peroxyde d'hydrogène. Des anomalies d'expression de protéines impliquées dans le fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale, et notamment une diminution de l'expression du complexe IV (sous-unité 6C du cytochrome c oxydase: COX6C) ont également été retrouvés au niveau du cerveau des souris EAE.

Au niveau de la moelle épinière, l'analyse d'enrichissement des termes GO pour les processus biologiques montre que le processus le plus altéré est l'apoptose, se traduisant par une diminution de DNJA1 et CAH3 qui jouent un rôle anti-apoptotique et une augmentation

d'ULA1 connue comme étant surexprimée dans l'apoptose. L'analyse quantitative montre également une diminution de la chaîne moyenne des neurofilaments (NFM) impliquée dans l'organisation du cytosquelette, ce qui pourrait suggérer une atteinte axonale.

## **2. Processus biologiques impliqués dans l'effet thérapeutique de l'extrait de pépins de raisin**

Au niveau du cerveau, le GSE semble corriger l'induction de l'apoptose notamment par l'augmentation de l'expression de RACK1 ainsi que par l'augmentation de la protéine 14-3-3 connue pour bloquer l'apoptose et réguler différemment les cascades des protéine kinase activée par les mitogènes (MAPK) (Xing *et al.*, 2000). D'un point de vue clinique, plusieurs études ont montré que ces protéines peuvent être identifiées au niveau du LCR des patients (Sato *et al.*, 2004 ; Colluci *et al.*, 2004) et représentent des marqueurs de sévérité de la SEP en mettant en évidence la destruction par apoptose du tissu cérébral et la fuite de protéines cellulaires normales dans le LCR (Shimada *et al.*, 2013). Les résultats obtenus au cours de cette étude protéomique suggèrent également que le GSE permet une augmentation du métabolisme de l'ATP par augmentation de l'expression de l'ATPG. Plusieurs études ont démontré un déficit de la chaîne respiratoire mitochondriale ainsi que des anomalies du transport mitochondrial dans la SEP, anomalies participant au phénomène de neurodégénérescence progressive (de Barcelos *et al.*, 2019). L'étude de l'apoptose et du fonctionnement mitochondrial semble être des pistes qu'il faudra explorer plus en détail dans le futur afin de mieux caractériser l'effet bénéfique du GSE.

Toujours au niveau du cerveau, le GSE semble avoir un effet bénéfique sur le processus de glycolyse en augmentant l'expression de la PGK1 qui est une enzyme intervenant lors de la septième réaction de la glycolyse (Mathur *et al.*, 2014). Il semble également avoir un effet au niveau de la bêta-oxydation des AG par augmentation de l'expression des éthylmalonyl-CoA décarboxylases (ECHD1) qui interviennent comme correcteur de la bêta-oxydation en diminuant les agents inducteurs de celle-ci (Shriver and Manchester, 2011). Des études ont montré le rôle de la bêta-oxydation dans la promotion de l'inflammation du SNC et dans la régulation de la réponse des LT et l'implication de la glycolyse dans la physiopathologie de la SEP (Shriver and Manchester, 2011 ; Yu *et al.*, 2022) ; ces deux fonctions seraient également à étudier pour mieux caractériser l'effet thérapeutique du GSE.

## **3. Confirmation des résultats obtenus pour les processus biologiques par les analyses par composant cellulaire, fonction moléculaire et voies métaboliques et/ou de signalisation cellulaire**

L'étude des localisations des protéines sur-exprimées en fonction des composants cellulaires au niveau du cerveau ou de la moelle épinière montre qu'elles sont majoritairement présentes au sein des mitochondries, du cytosol et du noyau, confirmant ainsi le rôle important des mitochondries dans la pathogenèse de la SEP.

L'analyse protéomique nous a permis de préciser les voies métaboliques dérégulées au niveau du cerveau et de la moelle épinière des souris EAE et modifiées par le traitement au GSE. Ainsi, au niveau du cerveau, une altération de l'activation du complément est mise en évidence chez les souris EAE. Ceci est en accord avec l'implication de l'activation du complément au cours du processus inflammatoire rencontré dans la SEP (**Morgan et al., 2021**). Toujours au niveau du cerveau, nos résultats obtenus chez les souris EAE montrent une dérégulation de la phagocytose. Ceci est en accord avec le rôle important de la phagocytose qui permet d'éliminer les débris cellulaires résultant de la dégradation de la gaine de myéline (**Grajchen et al., 2018**). De façon très intéressante, cette dérégulation est corrigée par le traitement curatif au GSE.

Au niveau de la moelle épinière, la voie apoptotique intrinsèque induite par le stress nitrosatif et la voie de l'apoptose sont les voies métaboliques les plus altérées, démontrant l'implication du stress oxydant et confirmant nos travaux réalisés avec une approche biochimique. L'étude protéomique montre également que le GSE corrige ces altérations.

Notre étude n'est pas la première étude protéomique réalisée chez les souris, mais c'est la première à être réalisée sur des moelle épinière et cerveau prélevés chez les mêmes animaux. Elle complète donc les informations déjà présentes dans la littérature, et notamment une étude réalisée sur des cerveaux de patients atteints de SEP qui compare le profil protéomique au sein des lésions de la SB et de la SG, en se focalisant sur les protéines mitochondriales (**Rai et al., 2022**). Une autre étude récente menée par Oveland *et al.*, compare le protéome des modèles EAE et cuprizone en utilisant des échantillons de cortex frontal et met en évidence l'implication de processus biologiques très différents entre les deux modèles (**Oveland et al., 2021**).

En conclusion, cette étude protéomique corrobore une partie de nos résultats obtenus lors des études biochimique et moléculaire. De plus, elle met en évidence l'importance de continuer la caractérisation de l'effet thérapeutique du GSE en s'intéressant à d'autres mécanismes tels que le métabolisme énergétique mitochondrial, la phagocytose ou l'activation du complément. Cette étude protéomique supporte également l'intérêt de réaliser une étude lipidomique s'intéressant notamment aux lipides de la gaine de myéline mais également aux sphingolipides.



## *Conclusion*



Cette thèse en co-tutelle s'intègre dans le cadre d'un travail collaboratif mis en place entre l'UMR INSERM/Université Clermont Auvergne 1107 Neuro-Dol en France et le Laboratoire des Substances Bioactives (LSBA) au sein du Centre de Biotechnologie de Borj Cédria (CBBC) en Tunisie. Elle a débuté en mai 2018 suite à l'obtention d'un financement auprès du Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique (MESRS) Tunisien pour un premier projet de mobilité. En raison de l'intérêt des résultats obtenus, ce premier échange s'est transformé en thèse de co-tutelle pour laquelle deux financements ont été obtenus :

- le programme PHC Utique 2020 qui est une coopération interuniversitaire franco-tunisienne, financée en Tunisie par le MESRS et en France par le Ministère de l'Enseignement Supérieur, de la Recherche et de l'Innovation (MESRI) et par le Ministère de l'Europe et des Affaires Étrangères (MEAE) ;
- le programme "WOW (Wide Open to the World) CAP20-25 de l'Université Clermont Auvergne.

L'objectif du projet s'inscrit dans un programme plus large avec les pays euro-méditerranéens (France, Allemagne, Roumanie, République Tchèque, Espagne, Tunisie, Algérie, Egypte), sous l'impulsion de l'équipe Tunisienne du Dr Aouani. Il vise à développer l'utilisation des sous-produits du raisin comme sources de composés bioactifs afin de diminuer leur impact environnemental.

Au cours de ce travail, nous avons tout d'abord reproduit le modèle EAE chez les souris afin de caractériser les aspects comportementaux, notamment les troubles sensitifs, ainsi que les aspects biochimiques et protéomiques afin d'évaluer l'effet correcteur d'un traitement précoce au GSE sur l'ensemble des dommages rencontrés dans le modèle. Notre étude a montré que le GSE module la réponse cellulaire au stress oxydant *via* son effet antioxydant et plusieurs autres voies de signalisation cellulaire, notamment la régulation de l'expression des protéines de la myéline, de la microglie, des astrocytes et des sirtuines, ce qui a souligné que le GSE est une cible d'intérêt très prometteuse pour le traitement de la SEP.

L'analyse protéomique a confirmé ces résultats en ce qui concerne notamment le rôle joué par l'inflammation et le stress oxydant dans la pathogenèse de la SEP et l'effet correcteur du GSE. Cette étude a également permis d'envisager d'autres mécanismes d'action potentiels pour l'effet du GSE, notamment via l'amélioration de la dégradation des lipides. Mécanismes d'action qui devront être évalués en détail dans des études à venir.

L'objectif à long terme de ce travail est de considérer le GSE comme un traitement curatif putatif chez les patients diagnostiqués avec une SEP présentant déjà des altérations du SNC. Cette première étude amorce de futures recherches sur :

1) les voies cellulaires et moléculaires précoces responsables de la suppression de l'EAE induite par le GSE, 2) l'effet curatif du GSE sur d'autres symptômes de la SEP tels que les troubles moteurs, cognitifs et anxio-dépressifs en utilisant différents modèles d'EAE ou d'autres modèles non EAE de la SEP, 3) l'effet préventif du GSE.

Cependant, le puissant effet induit par le traitement curatif du GSE sur le score EAE et les altérations sensibles (les symptômes étant très résistants au traitement actuel de la SEP) soutiennent fortement l'idée que le GSE pourrait être une approche thérapeutique efficace pour le traitement de la SEP.

## *Références bibliographiques*



A

Adamczyk B and Adamczyk-Sowa M. New Insights into the Role of Oxidative Stress Mechanisms in the Pathophysiology and Treatment of Multiple Sclerosis. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* (2016). doi: 10.1155/2016/1973834.

Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol* (1984) 105:121-126.

Aicher SA, Silverman MB, Winkler CW, Bebo BF Jr. Hyperalgesia in an animal model of multiple sclerosis. *Pain* (2004) 110(3):560-570.

Akhondzadeh S, Fallah-Pour H, Afkham K, Jamshidi AH, Khalighi-Cigroudi F. Comparison of *Crocus sativus L.* and imipramine in the treatment of mild to moderate depression: A pilot double-blind randomized trial [ISRCTN45683816]. *BMC Complement Altern Med* (2004). doi: 10.1186/1472-6882-4-12.

Aktas O, Prozorovski T, Smorodchenko A, Savaskan NE, Lauster R, Kloetze PM, Infante-Duarte C, Brocke S, Zipp F. Green tea epigallocatechin-3-gallate mediates T-cellular NF-kappa B inhibition and exerts neuroprotection in autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* (2004) 173:5794-5800.

Alberti TB, Marcon R, Bicca MA, Raposo NRB, Calixto JB, Dutra RC. Essential oil from *Pterodon Emarginatus* seeds ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis by modulating Th1/Treg cell balance. *Journal of Ethnopharmacology* (2014) 155(2014):485-494.

Alkadi H. A Review on Free Radicals and Antioxidants. *Infect Disord Drug Targets* (2020) 20(1):16-26.

Ammar N, Gouider-Khouja N, Hentati F. Étude comparative des aspects cliniques et paracliniques de la sclérose en plaques en Tunisie. *Revue Neurologique* (2006) 162:729-733.

Anne-Claire N. La sclérose en plaques Historique, épidémiologique et pathogénie. Chapitre 4 : Anatomie pathologie de la sclérose en plaques et des maladies apparentées. Elsevier Masson (2019). ISBN:9782294714207.

Arellano G, Ottum PA, Reyes LI, Burgos PI, Naves R. Stage specific role of interferon-gamma in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Frontiers in Immunology* (2015). doi: 10.3389/fimmu.2015.00492.

Arora A, Nair MG, Strasburg GM. Structure-activity relationships for antioxidant activities of a series of flavonoids in a liposomal system. *Free Radic. Biol. Med* (1998) 24:1355-1363.

Ascherio A, Munger KL, Simon KC. Vitamin D and multiple sclerosis. *The Lancet Neurology* (2010) 9:599-612.

Ascherio A, Munger KL. Environmental risk factors for multiple sclerosis. Part I: the role of infection. *Ann Neurol* (2007) 61(4):288-299.

## **B**

Badet C. Chapter 65 - Antibacterial Activity of Grape (*Vitis vinifera*, *Vitis rotundifolia*)Seeds. In: *Nuts and seeds in health and disease prevention*. San Diego: Academic Press: 545-552.

Baecher-Allan C, Kaskow BJ, Weiner HL. Multiple Sclerosis: Mechanisms and Immunotherapy. *Neuron* (2018) 97(4):742-768.

BagchiD, Garg A, Krohn RL, Bagchin M, Bagchi DJ, Balmoori J, Stohs SJ. Protective Effects of Grape Seed Proanthocyanidins and Selected Antioxidants against TPA-Induced Hepatic and Brain Lipid Peroxidation and DNA Fragmentation, and Peritoneal Macrophage Activation in Mice. *General Pharmacology: The Vascular System* (1998) 30(5):771-776.

Balu M, Sangeetha P, Murali G, Panneerselvam CH. Age-related oxidative protein damages in central nervous system of rats: modulatory role of grape seed extract. *Int J Devl Neuroscience* (2005) 23:501-507.

Barcelos IP, Troxell MR, Graves JS. Mitochondrial Dysfunction and Multiple Sclerosis Biology (2019). doi: 10.3390/biology8020037.

Barkhof F, Hommes OR, Scheltens P, Valk J. Quantitative MRI changes in gadolinium-DTPA enhancement after high-dose intravenous methylprednisolone in multiple sclerosis. *Neurology* (1991).doi: 10.1212/WNL.41.8.1219.

Barreira JCM, Ferreira ICFR, Oliveira MBPP, Pereira JA. Antioxidant activities of the extracts from chestnut flower, leaf, skins and fruit. *Food Chem* (2008) 107:1106-1113.

Baudin B. Stress oxydant et protections antioxydantes. *Revue Francophone des laboratoires* (2020) 2020(522):22-30.

Bellmann SJ, Paul F, Wuerfel J. Epigallocatechin Gallate in Relapsing Remitting Multiple Sclerosis: A randomized, Placebo-Controlled Trial. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm* (2021). doi: 10.1212/NXI.0000000000000981.

- Belviranlı M, Gokbel H, Okudan N, Basarali K. Effects of grape seeds extract supplementation on exercise-induced oxidative stress in rats. *British Journal of Nutrition* (2012) 108:249-256.
- Ben-Nun A, Wekerle H, Cohen IR. Vaccination against autoimmune encephalomyelitis with T-lymphocyte line cells reactive against myelin basic protein. *Nature* (1981) 292(5818):60-71.
- Benson C, Paylor JW, Tenorio G, Winship I, Baker G, Kerr BJ. Voluntary wheel running delays disease onset and reduces pain hypersensitivity in early experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *Exp Neurol* (2015) 271:279-90.
- Ben Youssef S, Brisson G, Doucet-Beaupré H, Castonguay AM, Gora C, Amri M, Lévesque M. Neuroprotective benefits of grape seed and skin extract in a mouse model of Parkinson's disease. *Nutr Neurosci* (2021) 24(3):197-211.
- Bermel RA, Bakshi R. The measurement and clinical relevance of brain atrophy in multiple sclerosis. *Lancet Neurol* (2006) 5(2):158-170.
- Bernatoniene J, Kopustinskiene DM. The Role of Catechins in Cellular Responses to Oxidative Stress. *Molecules* (2018).doi: 10.3390/molecules23040965.
- Bittner S, Afzali AM, Wiendl H, Meuth SG. Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein (MOG35-55) Induced Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE) in C57BL/6 Mice. *Journal of Visualized Experiments: JoVE* (2014). doi: 10.3791/51275.
- Bjelobaba I, Begovic-Kupresanin V, Pekovic S, Lavrnja I. Animal models of multiple sclerosis: Focus on experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neurosci Res* (2018) 96(6):1021-1042.
- BjornevikK, Cortese M, Healy BC, Kuhle J, Mina MJ, Leng Y, Elledge LJ, Niebuhr DW, Scher AI, Kassandra L.Ascherio A. Longitudinal analysis reveals high prevalence of Epstein-Barr virus associated with multiple sclerosis. *Science* (2022)375(6578): 296-301.
- Blair HA. Dimethyl Fumarate: A Review in Relapsing-Remitting MS. *Drugs* (2021) 79(18):1965-1976.
- Boiko A, Vorobeychik G, Paty D, Devonshire V, Sadovnick D. University of British Columbia MS Clinic Neurologists: Early onset multiple sclerosis: a longitudinal study. *Neurology* (2002) 59(7):1006-1010.

Brady CM, DasGupta R, Dalton C, Wiseman OJ, Berkley KJ, Fowler CJ. An open-label pilot study of cannabis-based extracts for bladder dysfunction in advanced multiple sclerosis. *Multiple sclerosis* (2004) 10: 425-433.

Braiman A, Isokov N. The role of Crk adaptor proteins in T- cell adhesion and migration. *Front Immunol* (2015). doi: 10.3389/fimne2015.00509.

BrambillaR. The contribution of astrocytes to the neuroinflammatory response in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *Acta Neuropath* (2019) 13(5):757-783.

Brola W, Mitosek-Szcwczyk K, Opara J. Symptomatology and pathogenesis of different types of pain in multiple sclerosis. *Neurologia I Neurochirurgia Polsha* (2014) 48: 272-279.

Buccellato E, Carretta D, Utan A, Cavina C, Speroni E, Grassi G, Candeletti S, Romualdi P. Acute and chronic cannabinoid extracts administration affects motor function in a CREAE model of multiple sclerosis. *J Ethnopharmacol* (2011) 133:1033-1038.

Buzzard KA, Broadley SA, Butzkueven H. What Do Effective Treatments for MultipleSclerosis Tell Us about the Molecular Mechanisms Involved in Pathogenesis? *IntJ Mol Sci* (2012) 13(10):12665-709.

## C

CadotY, Miñana-Castelló MT, Chevalier M. Anatomical, Histological, and Histochemical Changes in Grape Seeds from *Vitis vinifera* L. cv Cabernet franc during Fruit Development. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (2006) 54 (24):9206-9215.

Cairns J, Vavasour IM, Traboulsee A, Carruthers R, Kolind SH, Li DKB, Moore GRW. Diffusely abnormal white matter in multiple sclerosis. *J neuroimaging* (2022) 32:5-16.

Cambier J, Masson M, Masson C, Dehen H. *Neurologie*. 13 edition. Elsevier Masson (2012): 560.

Cantorna MT. Vitamin D and its role in immunology: multiple sclerosis, and inflammatory bowel disease. *Progress in biophysics and molecular biology* (2006) 92:60-64.

Carswell R. *Illustrations of the Eleentary Forms of Disease*. London: Longman (1838).

- Ceccarelli A, Rocca MA, Falini A, Tortorella P, Pagani E, Rodegher M, Comi G, Scotti G, Filippi M. Normal-appearing white and grey matter damage in MS. A volumetric and diffusion tensor MRI study at 3.0 Tesla. *J Neurol* (2007) 254(4):513-518.
- Chacón MR, Ceperuelo-Mallafré V, Maymó-Masip E, Mateo-Sanz JM, Arola L, Guitiérrez, C, Fernandez-Real JM, Ardèvol A, Simón I, Vendrell J. Grape-seed procyanidins modulate inflammation on human differentiated adipocytes in vitro. *Cytokine* (2009) 47:137-142.
- Chang E, Ghosh N, Yanni D, Lee S, Alexandru D, Mozaffar T. A Review of Spasticity Treatments: Pharmacological and Interventional Approaches. *Crit Rev Phys Rehabil Med* (2013) 25(2):11-22.
- Chaplan SR, Bach FW, Pogrel JW, Chung JM, Yaksh TL. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *J Neurosci Methods* (1994) 53(1):55-63.
- Charcot JM. Histologie de la sclérose en plaques. *Gaz Hop (Paris)* (1868) 4:554-559.
- Charradi K, Mahmoudi M, Elkahoui S, Limam F, Aouani E. Grape seed and skin extract mitigates heart and liver oxidative damage induced by a high-fat diet in the rat: gender dependency. *Can J Physiol Pharmacol* (2013) 91(12):1076-1085.
- Chataway J, Schuerer N, Alsanousi A, Chan D, MacManus D, Hunter K, Anderson V, Bangham CR, Clegg S, Nielsen C, Fox NC, Wilkie D, Nicholas JM, Calder VL, Greenwood J, Frost C, Nicholas R. Effect of high-dose simvastatin on brain atrophy and disability in secondary progressive multiple sclerosis (MS-STAT): a randomised, placebo-controlled, phase 2 trial. *Lancet* (2014) 383(9936):2213-2221.
- Chen L, Huang J, Zhao P, Persson AK, Dib-Hajj FB, Cheng X. Conditional knockout of NaV1.6 in adult mice ameliorates neuropathic pain. *Sci Rep* (2018). doi: 10.1038/s41598-018-22216-w.
- Chen M, Chen G, Nie H, Zhang X, Niu X, Zang YCQ, Skinner SM, Zhang JZ, Killian JM, Hong J. Regulatory effects of IFN- $\beta$  on production of osteopontin and IL-17 by CD4<sup>+</sup> T Cells in MS. *European journal of immunology* (2009) 39: 2525-2536.
- Chen TC, Mackic JB, McComb JG, Giannotta SL, Weiss MH, Zlokovic BV. Cellular uptake and transport of methylprednisolone at the blood /brain barrier. *Neurosurgery* (1996) 38: 348-354.
- ChenX, Guo C, Kong J. Oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Neural regeneration research* (2012) 7(5):376-385.

- Chen X, Guo H, Li F, Fan D. Phycion 8-O- $\beta$ -glucopyranoside suppresses the metastasis of breast cancer *in vitro* and *in vivo* by modulating DNMT1. *Pharmacol Rep PR* (2016) 69:36-44.
- Chitnis T, Krupp L, Yeh A, Rubin J, Kuntz N, Strober JB, Chabas D, Weinstock-Guttman B, Ness J, Rodriguez M, Waubant E. Pediatric multiple sclerosis. *Neurol Clin* (2011) 29(2):481-505.
- Chiurchiù V, van der Stelt M, Centonze D, Maccarrone M. The endocannabinoid system and its therapeutic exploitation in multiple sclerosis: Clues for other neuroinflammatory diseases. *Progress in neurobiology* (2018) 160:82-100.
- Ciccarelli O, Barkhof F, Bodini B, De Stefano N, Golay X, Nicolay K, Pelletier D, Pouwels PJ, Smith SA, Wheeler-Kingshott CA, Stankoff B, Yousry T, Miller DH. Pathogenesis of multiple sclerosis: insights from molecular and metabolic imaging. *Lancet Neurol* (2014) 13(8):807-822.
- Ciriello J, Tatomir A, Hewes D, Boodhoo D, Anselmo F, Rus V, Rus H. Phosphorylated SIRT1 as a biomarker of relapse and response to treatment with glatiramer acetate in multiple sclerosis. *Exp Mol Pathol* (2018) 105(2):175-180.
- Claussen MC, Korn T. Immune mechanisms of new therapeutic strategies in MS: teriflunomide. *Clin Immunol* (2012) 142(1):49-56.
- Clifton PM. Effect of grape seed extract and quercetin on cardiovascular and endothelial parameters in high-risk subjects. *J Biomed Biotechnol* (2004) 2004(5): 272-278.
- Colloca L, Ludman T, Bouhassira D, Baron R, Dickenson AH, Yarnitsky D, Freeman R, Truini A, Attal N, Finnerup NB, Eccleston C, Kalso E, Bennett DL, Dworkin RH, Raja SN. Neuropathic pain. *Nat Rev Dis Primers* (2017). doi: 10.1038/nrdp.2017.2.
- Colluci M, Rocatagliata L, Capello E, Narciso E, Catronico N, Tabaton M, Mancandi GL. The 14-3-3 protein in multiple sclerosis: a marker disease severity. *Mult Scler* (2004) 10(5): 477-481.
- Coluzzi F, Mattia C. Mechanism-based treatment in chronic neuropathic pain: the role of antidepressants. *Curr Pharm Des* (2005) 11(23):2945-2960.
- Compston A, Coles A. Multiple sclerosis. *Lancet* (2008) 372(9648):1502-1517.

Constantinescu CS, Farooqui N, O'Brien K, Gran B. Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) as a model for multiple sclerosis (MS). *British Journal of Pharmacology* (2011) 164(4): 1079-1106.

Corazzari I, Tomatis M, Turci F, Ferraris S, Bertone E, Prenesti E Vernè E. Gallic acid grafting modulates the oxidative potential of ferrimagnetic bioactive glass-ceramic SC-45. *Colloids Surf B Biointerfaces* (2016) 148:592-599.

Corey-Bloom J, Wolfson T, Gamst A, Jin S, Marcotte TD, Bentley H, Gouaux B. Smoked cannabis for spasticity in multiple sclerosis: a randomized, placebo-controlled trial. *CMAJ*. (2012) 184(10): 1143-1150.

Correale J, Marrodan M, Ysraelit MC. Mechanisms of Neurodegeneration and Axonal Dysfunction in Progressive Multiple Sclerosis. *Biomedicines* (2019). doi: 10.3390/biomedicines7010014.

Cunniffe N and Coles A. Promoting remyelination in multiple sclerosis. *Journal of Neurology* (2021) 268:30-34.

## **D**

Dabrowska NL, Stepien A, Sulkowski G, Dabrowska-Bouta B, Langfort J, Chalimoniuk M. Effects of IFN- $\beta$ 1a and IFN- $\beta$ 1b treatment on the expression of cytokines, inducible NOS (NOS type II), and myelin proteins in animal model of multiple sclerosis. *Arch Immunol Ther Exp*. (2017) 65:325-338.

Das AJ, Khawas P, Seth D, Miyaji T, Deka SC. Optimization of the extraction of phenolic compounds from *Cyclosorus extensa* with solvents of varying polarities. *Prep Biochem Biotechnol* (2016) 46:755-763.

Dasuri K, Zhang L, Keller JN. Oxidative stress, neurodegeneration, and the balance of protein degradation and protein synthesis. *Free Radical Biology and Medicine* (2013) 62:170-185.

de la Lastra CA, Villegas I. Resveratrol as an anti-inflammatory and anti-aging agent: Mechanisms and clinical implications. *Mol. Nutr. Food Res* (2005) 49:405-430.

Defer G, Debouverie M, Bardou M, Benamar R, Bernard-Valnet P, Branger D, Brassat N, Benallègue F, Calocer V, Damotte O, Dejardin A, Dejean N, Derache F, Docagne C, Donzé A.L, Dubessy B, Fontaine G, Vukusic V. La Sclérose en Plaques - Historique, épidémiologie et Pathogénie. Chapitre 1 - Historique de la sclérose en plaques (2019): 3-30.

- Defer G, Debouverie M, Bardou M, Benamar R, Bernard-Valnet P, Branger D, Brassat N, Benallègue F, Calocer V, Damotte O, Dejardin A, Dejean N, Derache F, Docagne C, Donzé A.L, Dubessy B, Fontaine G, Vukusic V. La Sclérose en Plaques - Historique, épidémiologie et Pathogénie: Chapitre 5 - Immunologie de la sclérose en plaques (2019):151-198.
- Dehmeshki J, Chard DT, Leary SM, Watt HC, Silver NC, Tofts PS, Thompson AJ, Miller DH. The normal appearing grey matter in primary progressive multiple sclerosis: a magnetisation transfer imaging study. *J Neurol* (2003) 250(1):67-74.
- Delaroche O, Evreux B, Bigot-Corbel E, Wiertlewsky S, Bailly F, Loubersac V, Orsonneau JL. Biochemical analysis of cerebrospinal fluid in support to diagnosis of multiple sclerosis. *Immuno-analyse & Biologie Spécialisée* (2012) 18 (2): 86-91.
- Démosthènes A. Exploration physiopathologique du développement de douleurs neuropathiques dans deux modèles murins de sclérose en plaques. Thèse soutenue le 18 décembre 2018.
- Dendrou CA, Fugger L, Friese MA. Immunopathology of multiple sclerosis. *Nat Rev Immunol.* (2015) 15(9):545-558.
- Depaz R, Aboaba J, Gout O. Update on diagnostic and treatment of multiple sclerosis. *La revue de médecine interne* (2013) 34(10): 628-635.
- Dewanto V, Wu X, Adom KK, Liu RH. Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity. *J Agric Food Chem* (2002) 50:3010-3014.
- Di Nuzzo L, Orlando R, Nasca C, Nicoletti F. Molecular pharmacodynamics of new oral drugs used in the treatment of multiple sclerosis. *Drug Des Devel Ther* (2014) 8: 555-568.
- Didonna A and Oksenberg JR. Multiple Sclerosis: Perspectives in Treatment and Pathogenesis: Chapter 1: The Genetics of Multiple Sclerosis. Zagon IS, McLaughlin PJ, editors. Brisbane (AU): Codon Publications (2017).
- Diebold M, Derfuss T. Immunological treatment of multiple sclerosis. Elsevier (2016).doi:10.1093/carcin/bgl030.
- Dixon WJ. Efficient analysis of experimental observations. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* (1980) 20: 441-62.
- Dizdaroglu M, Karakaya AE. Advances in DNA damage and repair oxygen radical effects, cellular protection, and biological consequences. Springer Science & Business Media (2012).

- Dobson R, Giovannoni R. Multiple sclerosis - a review. *Eur J Neurol* (2019) 6(1):27-40.
- Domon B, Ruedi A. Mass Spectrometry and Protein Analysis. *Science* (2006a) 312 (5771): 212-217.
- Doron M, Danielle S. Chapitre 4: Anatomie pathologique de la sclérose en plaques et des maladies apparentées: La sclérose en plaques Historiques, épidémiologie et pathogénie. Elsevier (2019).
- Downing LE, Ferguson BS, Rodriguez K, Ricketts ML. A grape seed procyanidin extract inhibits HDAC activity leading to increased Ppara phosphorylation and target gene expression. *Mol Nutr Food Res* (2017). doi:10.1002/mnfr.201600347.
- Draper HH, Hadley M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol* (1990) 186: 421-431.
- Dutta R, Trapp BD. Relapsing and progressive forms of multiple sclerosis: insights from pathology. *Curr Opin Neurol* (2014)27(3):271-278.
- Dworkin RH, O'Connor AB, Audette J, Baron R, Gourlay GK, Haanpää ML, Kent JL, Krane EJ, Lebel AA, Levy RM, Mackey SC, Mayer J, Miaskowski C, Raja SN, Rice AS, Schmader KE, Stacey B, Stanos S, Treede RD, Turk DC, Walco GA, Wells CD. Recommendations for the pharmacological management of neuropathic pain: an overview and literature update. *Mayo Clin Proc* (2010) 85(3): 3-14.
- Dyment DA, Ebers GC, Sadovnick AD. Genetics of multiple sclerosis. *The Lancet Neurology* (2004) 3:104-110.
- Dziedzic T, Metz I, Dallenga T, König FB, Müller S, Stadelmann C, Brück W. Wallerian degeneration: a major component of early axonal pathology in multiple sclerosis. *Brain Pathol* (2010) 20(5):976-985.

## *E*

- Einstein ER, Robertson DM, Dicaprio JM, Moore W. The isolation from bovine spinal cord of a homogeneous protein with encephalitogenic activity. *J Neurochem* (1962) 9:353-361.
- El Ayed M, Kadri S, Mabrouk M, Aouani E, Elkahoui S. Protective effect of grape seed and skin extract against high-fat diet induced dyshomeostasis of energetic metabolism in rat lung. *Lipids Health Dis* (2018). doi: 10.1186/s12944-018-0754-0.

El-Ashmawy IM, Bayad AE. Folic Acid and Grape Seed Extract Prevent Azathioprine induced Fetal Malformations and Renal Toxicity in Rats. *Phytother Res* (2016) 30(12):2027-2035.

Emadali A, Gallagher-Gambarelli M. Quantitative proteomics by SILAC: practicalities and perspectives for an revolving approach. *Med Sci* (2009) 25: 835-842.

Encinas JM, Manganas L, Enikolopov G. Nitric oxide and multiple sclerosis. *Current neurology and neuroscience reports* (2005) 5:232-238.

Engelhardt B. Molecular mechanisms involved in T cell migration across the blood-brain barrier. *Journal of Neural Transmission* (2006) 113:477-485.

Erbing B, Jansson PE, Widmalm G, Nimmich W. Structure of the capsular polysaccharide from the Klebsiella K8 reference strain 1015. *Carbohydr Res* (1995) 273:197-205.

Escande C, Nin V, Price NL, Capellini V, Gomes AP, Barbosa MT, O'Neil L, White TA, Sinclair DA, Chini EN. Flavonoid apigenin is an inhibitor of the NAD<sup>+</sup>ase CD38: implications for cellular NAD<sup>+</sup> metabolism, protein acetylation, and treatment of metabolic syndrome. *Diabetes* (2013) 62(4):1084-1093.

Eylar EH, Brostoff S, Jackson J, Carter H. Allergic Encephalomyelitis in Monkeys Induced by a Peptide from the A1 Protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (1972) 69(3):617-619.

## ***F***

Fahmy HM, Noor NA, Mohammed FF, Elsayed AA, Radwan NM. *Nigella sativa* as an anti-inflammatory and promising remyelinating agent in the cortex and hippocampus of experimental autoimmune encephalomyelitis-induced rats. *J Basic Appl Zool* (2014) 67(5):182-195.

Fanara S, Aprile M, Lacono S, Schirò G, Bianchi A, Brighina F, Dominguez LJ, Ragonese P, Salemi G. The Role of Nutritional Lifestyle and Physical Activity in Multiple Sclerosis Pathogenesis and Management: A Narrative Review. *Nutrients* (2021). doi: 10.3390/nu13113774.

Fancy SP, Chan JR, Baranzini SE, Franklin RJ, Rowitch DH. Myelin regeneration: a recapitulation of development? *Annual review of neuroscience* (2011) 34:21-43.

- Fender P, Paita M, Ganay D, Benech JM. Prevalence of thirty long-term disorders for French health insurance members in 1994. *Revue d'épidémiologie et de santé publique* (1997) 45: 454-464.
- Ferretti G, Bacchetti T, Principi F, Di Ludovico F, Viti B, Angeleri VA, Danni M, Provinciali L. Increased levels of lipid hydroperoxides in plasma of patients with multiple sclerosis: a relationship with paraoxonase activity. *Multiple Sclerosis Journal* (2005) 11:677-682.
- Filippi M, Bar-Or A, Piehl F, Preziosa P, Solari A, Vukusic S, Rocca MA. Multiple sclerosis. *Nat Rev Dis Primers* (2018) 4(1):43. doi: 10.1038/s41572-018-0041-4.
- Fine AM. Oligomeric proanthocyanidin complexes: History, structure, and phytopharmaceutical applications. *Alternative Medicine Review* (2000) 5(2): 144-151.
- Forman HJ, Zhang H. Targeting oxidative stress in disease: promise and limitations of antioxidant therapy. *Nat Rev Drug Discov* (2021) 20(9):689-709.
- Foshati S, Nouripour F, Sadeghi E, Reza A. The effect of grape (*Vitis vinifera*) seed extract supplementation on flow-mediated dilation, blood pressure, and heart rate: A systematic review and meta-analysis of controlled trials with duration- and dose-response analysis. *Pharmacological Research* (2022). doi: 10.1016/j.phrs.2021.105905.
- Fouad GI, Rizk MZ. Possible neuromodulating role of different grape (*Vitis vinifera* L.) derived polyphenols against Alzheimer's dementia: treatment and mechanisms. *Bulletin of the National Research Centre* (2019). doi: 10.1186/s42269-019-0149-z.
- Foulon S, Maura G, Dalichampt M, Alla F, Debouverie M, Moreau T, Weil A. Prevalence and mortality of patients with multiple sclerosis in France in 2012: a study based on French health insurance data. *Journal of Neurology* (2017) 264(6):1185-1192.
- Fourcade S, Morató L, Parameswaran J, Ruiz M, Ruiz-Cortés T, Jové M, Naudí A, Martínez-Redondo P, Dierssen M, Ferrer I, Villarroya F, Pamplona R, Vaquero A, Portero-Otín M, Pujol A. Loss of SIRT2 leads to axonal degeneration and locomotor disability associated with redox and energy imbalance. *Aging Cell* (2017) 6(6):1404-1413.
- Fox E. Révisions des critères de McDonald de 2017 pour permettre un diagnostic plus précoce de la sclérose en plaques. *Point de vue d'expert* (2019).
- Fox RJ, Coffey CS, Conwit R, Cudkovic ME, Gleason T, Goodman A, Klawiter EC, Matsuda K, McGovern M, Naismith RT, Ashokkumar A, Barnes J, Ecklund D, Klingner E, Koeppe M, Long JD, Natarajan S, Thornell B, Yankey J, Bermel RA, Debbins JP, Huang X,

Jagodnik P, Lowe MJ, Nakamura K, Narayanan S, Sakaie KE, Thoomukuntla B, Zhou X, Krieger S, Alvarez E, Apperson M, Bashir K, Cohen BA, Coyle PK, Delgado S, Dewitt LD, Flores A, Giesser BS, Goldman MD, Jubelt B, Lava N, Lynch SG, Moses H, Ontaneda D, Perumal JS, Racke M, Repovic P, Riley CS, Severson C, Shinnar S, Suski V, Weinstock-Guttman B, Yadav V, Zabeti A. Phase 2 Trial of Ibudilast in Progressive Multiple Sclerosis. *N Engl J Med* (2018) 379(9):846-855.

Freund J, McDermott K. Sensitisation to horse serum by means of adjuvants. *Proc Soc Exp Biol* (1942) 49:548-553.

Freund J, Stern ER, Pisani TM. Isoallergic Encephalomyelitis and Radiculitis in Guinea Pigs After One Injection of Brain and Mycobacteria in Water-in-Oil Emulsion. *J Immunol* (1947) 57(2): 179-194.

Friese MA, Schattling B, Fugger L. Mechanisms of neurodegeneration and axonal dysfunction in multiple sclerosis. *Nat Rev Neurol* (2014) 10(4):225-238.

Frohman EM, Racke MK, Raine CS. Multiple sclerosis-the plaque and its pathogenesis. *N Engl J Med* (2006) 354:942-955.

Fromont A, Binquet C, Sauleau EA, Fournel I, Despalins R, Rollot F, Weill A, Clerc L, Bonithon-Kopp C, Moreau T. National estimate of multiple sclerosis incidence in France (2001–2007). *Multiple Sclerosis Journal* (2012) 18:1108-1115.

## **G**

Gallai V, Sarchielli P, Trequattrini A, Franceschini M, Floridi A, Firenze C, Alberti A, Di Bene-detto D, Stragliotto E. Cytokine secretion and eicosanoid production in the peripheral blood mononuclear cells of MS patients undergoing dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids. *J Neuroimmunol* (1995) 56:143-153.

Gandhi S, Abramov AY. Mechanism of oxidative stress in neurodegeneration. *Oxidative medicine and cellular longevity* (2012). doi: 10.1155/2012/428010.

Gandy KAO, Zhang J, Nagarkatti P, Nagarkatti M. Resveratrol (3, 5, 4'-Trihydroxy-trans-Stilbene) Attenuates a Mouse Model of Multiple Sclerosis by Altering the miR-124/Sphingosine Kinase 1 Axis in Encephalitogenic T Cells in the Brain. *J Neuroimmune Pharmacol* (2019) 4(3):462-477.

- Garanti T, Stasik A, Burrow AJ, Alhnan MA, Wan KW. Anti-glioma activity and the mechanism of cellular uptake of Asiatic acid-loaded solid lipid nanoparticles. *Int J Pharm* (2016) 500:305-315.
- Garavaglia J, Markoski M.M, Oliveira A, Marcadenti A. Grape Seed Oil Compounds: Biological and Chemical Actions for Health. *Nutr Metab Insights* (2016) 9:59-64.
- Gargari BP, Abedini S, Babaei H , Aliasgarzadet A, Pourebdollehi P. Effect of supplementation with grape seed (*Vitis Vinifera*) extract on antioxidant status and lipid peroxidation in patient with type II diabetes. *Journal of Medicinal Plants Research* (2011) 5(10):2029-2034.
- Gene Ontology Consortium, BlakeJA, Dolan M, Drabkin H, Hill DP, Li N, Sitnikov D, Bridge S, Burgess S, Buza T. Gene Ontology annotations and resources. *NucleicAcids Res* (2013) 41: 530-535.
- Ghaffari S, Hatami H, Dehghan G. Saffron ethanolic extract attenuates oxidative stress, spatial learning, and memory impairments induced by local injection of ethidium bromide. *Research in Pharmaceutical Sciences* (2015) 10 (3): 222-232.
- Ghareghani M, Zibara K, Sadeghi H, Farhadi N. Spasticity Treatment Ameliorates the Efficacy of Melatonin Therapy in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE) Mouse Model of Multiple Sclerosis. *Cellular and Molecular Neurobiology* (2018) 38 (5): 1145-1151.
- Ghazavi A, Mosayebi G, Salehi H, Abtahi H. Effect of Ethanol Extract of Saffron (*Crocus sativus* L.) on the Inhibition of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis in C57bl/6 Mice. *Pak J Biol Sci*(2009)12(9):690-695.
- Gillard GO, Collette B, Anderson J, Chao J, Scannevin RH, Huss DJ, Fontenot, JD. DMF, but not other fumarates, inhibits NF- $\kappa$ B activity in vitro in an Nrf2-independent manner. *Journal of neuroimmunology* (2015) 283: 74-85.
- Giraudon P, Bernard A. Chronic viral infections of the central nervous system: Aspects specific to multiple sclerosis. *Revue Neurologique* (2009) 165:789-795.
- Glatigny S, Bettelli E. Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE) as Animal Models of Multiple Sclerosis (MS). *Cold Spring Harb Perspect Med* (2018).doi: 10.1101/cshperspect.a028977.

Gold R, Linington C, Lassmann H. Understanding pathogenesis and therapy of multiple sclerosis via animal models: 70 years of merits and culprits in experimental autoimmune encephalomyelitis research. *Brain* (2006) 129:1953-1971.

Goldschmidt C, McGinley MP. Advances in the Treatment of Multiple Sclerosis. *Neurol Clin* (2021) 39(1):21-33.

Grajchen, E., Hendriks, J.J.A. & Bogie, J.F.J. The physiology of foamy phagocytes in multiple sclerosis. *Acta Neuropathol Commun* (2018). doi: 10.1186/s40478-018-0628-8.

Griffin M. Grape Seed extract Benefits and side effects. WebMD. <https://www.webmd.com/diet/grape-seed-extract>.

Grishkan IV, Fairchild AN, Calabresi PA, Gocke AR. 1, 25-Dihydroxyvitamin D3 selectively and reversibly impairs T helper-cell CNS localization. *Proceedings of the National Academy of Sciences* (2013) 110:21101-21106.

Guentas L, Pheulpin P, Michaud P, Heyraud A, Gey C, Courtois B, Courtois J. Structure of a polysaccharide from a *Rhizobium* species containing 2-deoxy-beta-D-arabino-hexuronic acid. *Carbohydr Res* (2001) 332:167-173.

Gupta M, Dey S, Marbaniang D, Pal P, Ray S, Mazumder B. Grape seed extract: having a potential health benefits. *J Food Sci Technol* (2020) 57(4):1205-1215.

## ***H***

Habek M, Hojsak I, Brinar VV. Nutrition in multiple sclerosis. *Clinical Neurology and Neurosurgery* (2010) 112:616-620.

Haider L, Fischer MT, Frischer JM, Bauer J, Höftberger R, Botond G, Esterbauer H, Binder CJ, Witztum JL, Lassmann H. Oxidative damage in multiple sclerosis lesions. *Brain* (2011) 134(7):1914-1924.

Haider L. Inflammation, Iron, Energy Failure, and Oxidative Stress in the Pathogenesis of Multiple Sclerosis. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* (2015). doi: 10.1155/2015/725370.

Haines JD, Inglese M, Casaccia P. Axonal damage in multiple sclerosis. *Mt Sinai J Med*. (2011) 78(2):231-243.

- Haji N, Mandolesi G, Gentile A, Sacchetti L, Fresegna D, Rossi S, et al. TNF- $\alpha$ -mediated anxiety in a mouse model of multiple sclerosis. *Exp Neurol* (2012) 237(2):296-303.
- Halliwell B, Gutteridge JM. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem J* (1984) 219:1-14.
- Halliwell B. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *Journal of neurochemistry* (2006) 97: 1634-1658.
- Hanato, H. Kagawa, T. Yasuhara, T. Okuda. Two new flavonoids and other constituents in licorice root: their relative astringency and radical scavenging effect. *Chem Pharm Bull* (1988) 36(6): 1090-1097.
- Handel AE, Williamson AJ, Disanto G, Dobson R, Giovannoni G, Ramagopalan SV. Smoking and multiple sclerosis: an updated meta-analysis. *PloS one* (2011). doi: 10.1371/journal.pone.0016149.
- Harborne JB. *The flavonoids: Advances in research since 1980*. Springer (2013).
- Harris VK, Sadiq SA. Disease Biomarkers in Multiple Sclerosis. *Molecular Diagnosis & Therapy* (2009) 13(4)225-244.
- Hart BA, Luchicchi A, Schenk GJ, Killestein J, JGeurts GGJ. Multiple sclerosis and drug discovery: A work of translation. *EBioMedicine* (2021). doi: 10.1016/j.ebiom.2021.103392.
- Hasan M, Min H, Rahaman KA, Muresan AR, Kim H, Han D, Kwon OS. Quantitative Proteome Analysis of Brain Subregions and Spinal Cord from Experimental Autoimmune Encephalomyelitis Mice by TMT-Based Mass Spectrometry. *Proteomics* (2019). doi: 10.1002/pmic.201800355.
- Hauser SL, Bar-Or A, Cohen JA, Comi G, Correale J, Coyle PK, Cross AH, de Seze J, Leppert D, Montalban X, Selmaj K, Wiendl H. Ofatumumab versus Teriflunomide in Multiple Sclerosis. *N Engl J Med* (2020)383:546-557.
- Hauser SL, Oksenberg JR. Heterogeneity at the HLA-DRB1 locus and risk for multiple sclerosis. *Hum Mol Genet* (2006) 15(18):2813-2824.
- Hawkes CH. Smoking is a risk factor for multiple sclerosis: a metanalysis. *Multiple Sclerosis Journal* (2007) 13:610-615.

- He J, Xu L, Yang L, Wang X. Epigallocatechin Gallate Is the Most effective Catechin Against Antioxidant Stress via Hydrogen Peroxide and Radical Scavenging Activity. *Med Sci Monit.* (2018) 24:8198-8206.
- Hedström AK, Olsson T, Alfredsson L. High body mass index before age 20 is associated with increased risk for multiple sclerosis in both men and women. *Mult Scler* (2012) 18(9):1334-1336.
- Heitmann H, Haller B, Tieann L, Mühlau M, Berthele A, Tölle TR, et al. Longitudinal prevalence and determinants of pain in multiple sclerosis: results from the German National Multiple Sclerosis Cohort study. *Pain* (2020) 161:787-796.
- Hemmer B, Archelos JJ, Hartung HP. New concepts in the immunopathogenesis of multiple sclerosis. *Nat Rev Neurosci* (2002) 3(4):291-301.
- Hemmer B, Kerschensteiner M, Korn T. Role of the innate and adaptive immune responses in the course of multiple sclerosis. *Lancet Neurol* (2015) 14(4):406-419.
- Hendriks JJ, De Vries HE, Van der Pol SM, Van den Berg TK, Van Tol EA, Dijkstra CD. Flavonoids inhibit myelin phagocytosis by macrophages; a structure-activity relationship study. *Biochem Pharmacol* (2003) 65(5): 877-885.
- Hernandez-Jiménez A, Gomez-Plaza E, Martinez-Cutillas A, Kennedy JA. Grape skin and seed proanthocyanidins from Monastrell x Syrah grapes. *J. Agric. Food Chem* (2009) 57: 10798-10803.
- Hirohama D, Kawarazaki W, Nishimoto M, Ayuzawa N, Marumo T, Shibata S, Fujita T. PGI2 Analog Attenuates Salt-Induced Renal Injury through the Inhibition of Inflammation and Rac1-MR Activation. *Int J Mol Sci* (2020). doi:10.3390/ijms21124433.
- Hodge S, Hodge G, Flower R, Han P. Methyl-prednisolone up-regulates monocyte interleukin-10 production in stimulated whole blood. *Scand J Immunol* (1999) 49(5):548-553.
- Hollecker L, Pinna M, Filippino G, Scrugli S, Pinna B, Argiolas F, Murru M. Simultaneous determination of polyphenolic compounds in red and white grapes grown in Sardinia by high performance liquid chromatography-electron spray ionisation-mass spectrometry. *J Chromatogr A* (2009) 1216:3402-3408.
- Hollenbach JA, Oksenberg JR. The immunogenetics of multiple sclerosis: A comprehensive review. *J Autoimmun* (2015)64:13-25.

Hollinger KR, Alt J, Riehm AM, Slusher BS, Kaplin AI. Dose-dependent inhibition of GCPII to prevent and treat cognitive impairment in the EAE model of multiple sclerosis. *Brain research* (2016)1635:105-112.

Houzen H, Kondo K, Horiuchi K, Niino M. Consistent increase in the prevalence and female ratio of multiple sclerosis over 15 years in northern Japan. *Eur J Neurol* (2018) 25(2):334-339.

Huang D, Ou B, Prior RL. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (2005) 53(6):1841-1856.

Huang H, Taraboletti A, Shriver LP. Dimethyl fumarate modulates antioxidant and lipid metabolism in oligodendrocytes. *Redox biology* (2015) 5:69-75.

Hwang I, Ahn G, Park E, Ha D, Song JY, Jee Y. An acidic polysaccharide of panax ginseng ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis and induces regulatory T cells. *Immunol Lett* (2011) 138(2):169-178.

## ***I***

Ide K, Yamada H, Takuma N, Kawasaki Y, Harada S, Nakase J, Ukawa Y, Sagesaka YM. Effects of green tea consumption on cognitive dysfunction in an elderly population: A randomized placebo-controlled study. *Nutr J* (2015)15:1-9.

Ingram G, Loveless S, Howell OW, Hakobyan S, Dancy B, Harris CL, Robertson NP, Neal JW, Morgan BP. Complement activation in multiple sclerosis plaques: an immunohistochemical analysis. *Acta Neuropathol Commun* (2014). doi: 10.1186/2051-5960-2-53.

## ***J***

Jahn O, Tenzer S, Werner HB. Myelin Proteomics: Molecular Anatomy of an Insulating Sheath. *Mol Neurobiol* (2009)40: 55-72.

Jastorff AM, Haegler K, Maccarrone G, Holsboer F, Weber F, Ziemssen T, Turck CW. Regulation of proteins mediating neurodegeneration in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Proteomics Clin Appl* (2009) 3(11):1273-1287.

Jelinek GA, Marck CH, Weiland TJ, Pereira N, van der Meer DM, Hadgkiss EJ. Latitude, sun exposure and vitamin D supplementation: associations with quality of life and disease

outcomes in a large international cohort of people with multiple sclerosis. *BMC neurology* (2015). doi: 10.1186/s12883-015-0394-1.

Johnson SK, Diamond BJ, Rausch S, Kaufman M, Shiflett SC, Graves L. The effect of Ginkgo biloba on functional measures in multiple sclerosis: A pilot randomized controlled trial. *Explore (NY)* (2006)2(1):19-24.

Jörg S, Grohme DA, Erzler M, Binsfeld M, Haghikia A, Müller DN, Linker RA, Kleinewietfeld M. Environmental factors in autoimmune diseases and their role in multiple sclerosis. *Cell Mol Life Sci* (2016) 73(24):4611-4622.

### **K**

Kadri S, El Ayed M, Limam F, Aouani E, Mokni M. Protective effect of (Xenical+GSF) against I/R-induced blood brain barrier disruption, ionic edema, lipid deregulation, and neuroinflammation. *Microvascular Research* (2020). doi: 10.1016/j.mvr.2020.104054.

Kadri S, El Ayed M, Mabrouk M, Limam F, Elkahoui S, Aouani E, Mokni M. Characterization, anti-oxidative effect of grape seed powder and in silico affinity profiling of polyphenolic and extra-phenolic compounds for calpain inhibition. *J PharmBiomed Anal* (2019) 164: 365-372.

Kadri S, Smine S, El Ayed M, Limem F, Cosette P, Amri M, Aouani E, Mokni M. Protective effect of grape seed and skin extract on cerebral ischemia in rat: implication of transition metals. *Int J Stroke* (2014) 10(3):415-424.

Kala M, Miravalle A, Vollmer T. Recent insights into the mechanism of action of glatiramer acetate. *J Neuroimmunol* (2011) 235(2):9-17.

Kamisili S, Ciftci O, Taslidre A, Turkmen NB, Ozcan C. The beneficial effects of 18β-glycchatinc acid on the experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) in C57BL/6 mouse model. *Immunopharmacology and immunotoxicology* (2018) 40(4):344-352.

Kamm CP, Uitdehaag BM, Polman CH. Multiple sclerosis: currentknowledge and future outlook. *European neurology* (2014) 72:132-141.

Kandel ER, Schwartz JH, Jessel TM. Principales of neural science. Art editor Sarah Mack-5<sup>th</sup> edition. New York; Chicago; San Francisco: McGraw-Hill Medical. Art editor Sarah Mack – 5<sup>th</sup> edition (2013).

- Karadeniz F, Durst RW, Wrolstad RE. Polyphenolic composition of raisins. *J Agric Food Chem* (2000)48:5343-5350.
- Kay M, Hojati Z, Dehghanian F. The molecular study of IFN $\beta$  pleiotropic roles in MS treatment. *Iran J Neurol* (2013) 12(4):149-156.
- Kemp K, Redondo J, Hares K, Rice C, Scolding N, Wilkins A. Oxidative injury in multiple sclerosis cerebellar grey matter. *Brain Res* (2016) 1642:452-460.
- Keser S, Celik S, Turkoglu S. Total phenolic contents and free-radical scavenging activities of grape (*Vitis vinifera* L.) and grape products. *Int J Food Sci Nutr* (2013) 64: 210-216.
- Masoomeh Khalifeh, George E. Barreto, and Amirhossein Sahebkar, Therapeutic potential of trehalose in neurodegenerative diseases: the knowns and unknowns. *Neural Regeneration Research* (2021) 16 (10): 2026-2027.
- Khan N, Smith MT. Multiple sclerosis-induced neuropathic pain: pharmacological management and pathophysiological insights from rodent EAE models. *Inflammopharmacology* (2014) 22(1):1-22.
- Khan N, Woodruff TM, Smith MT. Establishment and characterization of an optimized mouse model of multiple sclerosis-induced neuropathic pain using behavioral, pharmacologic, histologic and immunohistochemical methods. *Pharmacol Biochem Behav* (2014a) 126:13-27.
- Kilkenny C, Browne WJ, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG. Improving Bioscience Research Reporting: The ARRIVE Guidelines for Reporting Animal Research. *PLoS Biology* (2010). doi: 10.1371/journal.pbio.1000412.
- Kim H, Deshane J, Barnes S, Meleth S. Proteomics analysis of the actions of grape seed extract in rat brain: Technological and biological implications for the study of the actions of psychoactive compounds. *Life Sci* (2006) 78:2060-2065.
- Kim Y, Park J, Choi YK. The Role of Astrocytes in the Central Nervous System Focused on BK Channel and Heme Oxygenase Metabolites: A Review. *Antioxidants (Basel)*. (2019).doi: 10.3390/antiox8050121.
- Kingwell E, Marriott JJ, Jetté N, Pringsheim T, Makhan N, Morrow SA., Fisk JD, Evans C, Béland SG, Kulaga S. Incidence and prevalence of multiple sclerosis in Europe: a systematic review. *BMC neurology* (2013).doi: 10.1186/1471-2377-13-128.

- Kipp M, van der Star B, Vogel DY, Puentes F, van der Valk P, Baker D, Amor S. Experimental in vivo and in vitro models of multiple sclerosis: EAE and beyond. *Mult Scler Relat Disord* (2012) 1(1):15-28.
- Koch MW, Metz LM, Agrawal SM, Yong VW. Environmental factors and their regulation of immunity in multiple sclerosis. *Journal of the neurological sciences* (2013) 324:10-16.
- Koch MW, Ramsaransing GSM, Arutjunyan AV, Stepanov M, Teelken A, Heersema DJ, De Keyser J. Oxidative stress in serum and peripheral blood leukocytes in patients with different disease courses of multiple sclerosis. *Journal of neurology* (2006) 253:483-487.
- Kočovská E, Gaughran F, Krivoy A, Meier UC. Vitamin-D deficiency as a potential environmental risk factor in multiple sclerosis, schizophrenia, and autism. *Frontiers in psychiatry* (2017). doi: 10.3389/fpsy.2017.00047.
- Kong X, Guan J, Gong S, Wang R. Neuroprotective Effects of Grape Seed Procyanidin Extract on Ischemia-Reperfusion Brain Injury. *Chin Med Sci J* (2017) 32(2):92-99.
- Kornek B, Storch MK, Bauer J, Djamshidian A, Weissert R, Wallstroem E, Stefferl A, Zimprich F, Olsson T, Linington C, Schmidbauer M, Lassmann H. Distribution of a calcium channel subunit in dystrophic axons in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain* (2001) 124(6):1114-1124.
- Kowluru RA, Radhakrishnan R, Ghulam M. Regulation of *Rac1* transcription by histone and DNA methylation in diabetic retinopathy. *Sci Rep* (2021). doi: 10.1038/s41598-021-93420-4.
- Kremer M, Salvat E, Muller A, Yalcin I, Barrot M. Antidepressants and gabapentinoids in neuropathic pain: Mechanistic insights. *Neuroscience* (2016)338:183-206.
- Kulkarni S, Micci MA, Leser J, Shin C, Tang CS, Fu YY, Liu L, Li Q, Saha M, Li C, Grigori Enikolopov G, Becker L, Rakhilin N, Anderson M, Shen X, Dong X, Butte MJ, Song H, Southard-Smith EM, Kapur RP, Bogunovic M, Pasricha PJ. Adult enteric nervous system in health is maintained by a dynamic balance between neuronal apoptosis and neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2017)114(18):3709-3718.
- Kurtzke JF. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology* (1983) 33(11):1444-1452.
- Kutzelnigg A, Faber-Rod JC, Bauer J, Lucchinetti CF, Sorensen PS, Laursen H, Stadelmann C, Brück W, Rauschka H, Schmidbauer M, Lassmann H. Widespread demyelination in the cerebellar cortex in multiple sclerosis. *Brain Pathol* (2007) 17(1):38-44.

Kutzelnigg A, Lassmann H. Pathology of multiple sclerosis and related inflammatory demyelinating diseases. *Handb Clin Neurol* (2014) 122:15-58.

Kutzelnigg A, Lucchinetti CF, Stadelmann C, Brück W, Rauschka H, Bergmann M, Schmidbauer M, Parisi JE, Lassmann H. Cortical demyelination and diffuse white matter injury in multiple sclerosis. *Brain* (2005) 128(11):2705-2712.

## **L**

Lalive PH. Biomarqueurs en neuroimmunologie. *Rev Med Suisse* (2011) 291: 860-866.

Lassmann H, Bradl M. Multiple sclerosis: experimental models and reality. *Acta Neuropathol* (2017) 133(2):223-244.

Lassmann H, Brück W, Lucchinetti CF. The immunopathology of multiple sclerosis: an overview. *Brain pathology* (2007) 17:210-218.

Lassmann H, van Horssen J. Oxidative stress and its impact on neurons and glia in multiple sclerosis lesions. *Biochim Biophys Acta* (2016) 1862(3):506-510.

Lassmann H., Van Horssen J, Mahad D. Progressive multiple sclerosis: pathology and pathogenesis. *Nature Reviews Neurology* (2012) 8: 647-656.

Lebar R, Lubetzki C, Vincent C, Lombraill P, Boutry JM. The M2 autoantigen of central nervous system myelin, a glycoprotein present in oligodendrocyte membrane. *Clin Exp Immunol* (1986) 66(2):423-434.

Lebrun C. Indications thérapeutiques à visée symptomatique de la spasticité dans la sclérose. *Revue neurologique* (2001)157(8): 1045-1050.

Lee DS, Kim J. Effects of grape seed extract supplementation on hemodynamic response and vascular endothelial function in postmenopausal women. *Iran J Public Health* (2019) 48 (9): 1735-1737.

Lee HJ, Yoon YS, Lee SJ. Mechanism of neuroprotection by trehalose: controversy surrounding autophagy induction. *Cell Death & Disease* (2018). doi: 10.1038/s41419-018-0749-9.

Lee TH, Park S, Yoo G, Jang C, Kim MH, Kim SH, Kim SY. Demethyleugenol  $\beta$ -Glucopyranoside Isolated from *Agastache rugosa* Decreases Melanin Synthesis via Down-regulation of MITF and SOX9. *J AgricFood Chem* (2016)64(41):7733-7742.

Leite JA, Ghirotto B, Targhetta VP, De Lima J, Câmara NOS. Sirtuins as pharmacological targets in neurodegenerative and neuropsychiatric disorders. *British journal of pharmacology* (2022) 179(8):1496-1511.

Lennon VA, Wilks AV, Carnegie PR. Immunologic properties of the main encephalitogenic peptide from the basic protein of human myelin. *J Immunol* (1970) 105(5):1223-1230.

Leray E, Moreau T, Fromont A, Edan G. Epidemiology of multiple sclerosis. *Rev Neurol* (2016) 172(1):3-13.

Leussink VI, Jung S, Merschdorf U, Toyka KV, Gold R. High-dose methylprednisolone therapy in multiple sclerosis induces apoptosis in peripheral blood leukocytes. *Arch Neurol* (2001) 58(1):91-97.

Levine RL, Garland D, Oliver CN et al. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol* (1990) 186: 464-478.

Li JM, Yang Y, Zhu P, Zheng F, Gong FL, Mei YW. Mitoxantrone exerts both cytotoxic and immunoregulatory effects on activated microglial cells. *Immunopharmacol Immunotoxicol*. (2012) 34(1):36-41.

Lim HW, Kang SG, Ryu JK, Schilling B, Fei M, Lee IS, Kehasse A, Shirakawa K, Yokoyama M, Schnölzer M, Kasler HG, Kwon HS, Gibson BW, Sato H, Akassoglou K, Xiao C, Littman DR, Ott M, Verdin E. SIRT1 deacetylates ROR $\gamma$ t and enhances Th17 cell generation. *J Exp Med* (2015) 212(5):607-617.

Lima KG, Krause GC, Schuster AD, Catarina AV, Basso BS, De Mesquita FC, Pedrazza L, Marczak ES, Martha BA, Nunes FB. Gallic acid reduces cell growth by induction of apoptosis and reduction of IL-8 in HepG2 cells. *Biomed Pharmacother Biomedecine Pharmacother* (2016) 84:1282-1290.

Lin MT, Beal MF. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature* (2006) 443(7113): 787-795.

Lin SX, Lisi L, Russo CD, Polak PE, Sharp A, Weinberg G, Kalinin S, Feinstein DL. The anti-inflammatory effects of dimethyl fumarate in astrocytes involve glutathione and haem oxygenase-1. *ASN Neuro* (2011). doi: 10.1042/AN20100033.

Lindberg RLP, Nägelin Y, Kuhle J et al. Génétique et examens moléculaires dans la SEP. *Forum Med Suisse* (2010) 10:458-460.

- Linker RA, Lee DH, Ryan S, van Dam AM, Conrad R, Bista P, Zeng W, Hronowsky X, Buko A, Chollate S. Fumaric acid esters exert neuroprotective effects in neuroinflammation *via* activation of the Nrf2 antioxidant pathway. *Brain* (2011) 134:678-692.
- Lipton MM, Freund J. Encephalomyelitis in the rat following intracutaneous injection of central nervous system tissue with adjuvant. *Proc Soc Exp Biol Med* (1952) 81(1):260-271.
- LomaI, Heyman R. Multiple sclerosis: pathogenesis and treatment. *Curr Neuropharmacol* (2011) 9(3):409-416.
- Lovera J, Bagert B, Smoot K, Morris CD, Frank R, Bogardus K. Ginkgo biloba for the improvement of cognitive performance in multiple sclerosis: A randomized, placebo-controlled trial. *Mult Scler* (2007)13(3):376-385.
- Lubetzki C, Zalc B, Williams A, Stadelmann C, Stankoff B. Remyelination in multiple sclerosis: from basic science to clinical translation. *The lancet neurology* (2020) 19 (8): 678-688.
- Lubetzki C and Stankoff B. Multiple Sclerosis and Related Disorders: Chapter 4 Demyelination in multiple sclerosis. *Handbook of Clinical Neurology* (2014) 122 (3rd series).
- Lublin FD, ReingoldSC. Defining the clinical course of multiple sclerosis, Results of an international survey. *Neurology* (1996) 46 (4): 907-911.
- Lublin FD, Reingold SC, Cohen JA. Defining the clinical course of multiple sclerosis: the 2013 revisions. *Neurology* (2014) 83(3): 278-286.
- Lublin FD, Coetzee T, Cohen JA, Marrie RA, Thompson AJ. The 2013 clinical course descriptors for multiple sclerosis. *Neurology* (2020) 94:1088-1092.
- Lucas RM, Byrne SN, Correale J, Ilschner S, Hart PH. Ultraviolet radiation, vitamin D and multiple sclerosis. *Neurodegenerative disease management* (2015) 5:413-424.
- Lucchinetti CF, Popescu BFG, Bunyan RF, Moll NM, Roemer SF, Lassmann H, Brück W, Parisi JE, Scheithauer BW, Giannini C. Inflammatory cortical demyelination in early multiple sclerosis. *New England Journal of Medicine* (2011) 365:2188-2197.
- Luo F, Tran AP, Xin L, Sanapala L, Lang TB, Silver J, Yang Y. Modulation of proteoglycan receptor PLP  $\sigma$  enhances MMP-2 activity, to promote recovery from multiple sclerosis. *Nature communication* (2018). doi: 10.1038/s41467-018-06505-6.

Lysandropoulos AP, Jaquiéry E, Jilek S, Pantaleo G, Schlupe M., Du Pasquier R.A. Vitamin D has a direct immunomodulatory effect on CD8+ T cells of patients with early multiple sclerosis and healthy control subjects. *Journal of neuroimmunology* (2011) 233:240-244.

## **M**

Ma ZH and Zhang H. Phytochemical constituents, health benefits, and industrial applications of Grape seeds: A mini review. *Antioxidants* (2017). doi: 10.3390/antiox6030071.

Macdonald AD, Woolfe G, Bergel F, Morrison AL, Rinderknecht H. Analgesic action of pethidine derivatives and related compounds. *Br J Pharmacol Chemother* (1946) 1(1): 4-14.

Magy L. La sclérose en plaques. *Actualités pharmaceutiques hospitalières* (2009)5(19): 14-19.

Mahad DH, Trapp BD, Lassmann H. Pathological mechanisms in progressive multiple sclerosis. *Lancet Neurol* (2015) 14(2):183-193.

Mahad DJ, Ziabreva I, Campbell G, Lax N, White K, Hanson PS, Lassmann H, Turnbull DM. Mitochondrial changes within axons in multiple sclerosis. *Brain* (2009) 132(5):1161-1174.

Mähler A, Steiniger J, Bock M, Klug L, Perreidt N, Lorenz M, Zimmermann BF, Krannich A, Paul F, Boschmann M. Metabolic response to epigallocatechin-3-gallate in relapsing-remitting multiple sclerosis: A randomized clinical trial. *Am. J. Clin. Nutr* (2015) 101: 487-495.

Mallucci G, Peruzzotti-Jametti L, Bernstocka JD, and Stefano Pluchino. The role of immune cells, glia and neurons in white and gray matter pathology in multiple sclerosis. *EMC Neurologie* (2004) 1(4): 415-457.

Mandel SA, Avramovich-Tirosh Y, Reznichenko L, Zheng H, Weinreb O, Amit T, Youdim, MBH. Multifunctional activities of green tea catechins in neuroprotection: Modulation of cell survival genes, iron-dependent oxidative stress and PKC signaling pathway. *NeuroSignals* (2005) 14: 46-60.

Mandillo S, Tucci V, Hölter SM, Meziane H, Banchaabouchi MA, Kallnik M, et al. Reliability, robustness, and reproducibility in mouse behavioral phenotyping: a cross-laboratory study. *Physiol Genomics* (2008) 34(3): 243-255.

Mannucci C, Casciaro M, Sorbara EE, Calapai F, Salvo ED, Pioggia P, Navarra M, Calapai G and Gangemi S. Nutraceuticals against Oxidative Stress in Autoimmune Disorders. *Antioxidants* (2021). doi: 10.3390/antiox10020261.

- MarckCH, LiveraAMD, WeilandTJ, JelinekPL, NeateSL, BrownCR, TaylorKL, KhanF and JelinekGA. Pain in People with Multiple Sclerosis: Associations with Modifiable Lifestyle Factors, Fatigue, Depression, Anxiety, and Mental Health Quality of Life. *Front Neurol* (2017). doi: 10.3389/fneur.2017.00461.
- Markova J, Essner U, Akmaz B, Marinelli M, Trompke C, Lentschat A, Vila C. Sativex as add-on therapy vs. further optimized first-line ANTispastics (SAVANT) in resistant multiple sclerosis spasticity: a double-blind, placebo-controlled randomised clinical trial. *The International journal of neuroscience* (2018) 56: 1-10.
- Marrie RA. Environmental risk factors in multiple sclerosis aetiology. *Lancet Neurol* (2004)3:709-718.
- Martín R, Carvalho-Tavares J, Hernández M, Arnes M, Ruiz-Gutierrez V, Nieto ML. Beneficial actions of oleanolic acid in an experimental model of multiple sclerosis: a potential therapeutic role. *Biochemical Pharmacology* (2010) 79:198-208.
- Martini R, Schachner M. Molecular bases of myelin formation as revealed by investigations on mice deficient in glial cell surface molecules. *Glia* (1997) 19:298-310.
- Martinsen V, Kursula P. Multiple sclerosis and myelin basic protein: Insights into protein disorder and disease. *Amine Acids* (2022) 54:99-109.
- Masci A, Coccia A, Lendaro E, Mosca L, Paolicelli P Cesa S. Evaluation of different extraction methods from pomegranate whole fruit or peels and the antioxidant and antiproliferative activity of the polyphenolic fraction. *Food Chem* (2016) 202:59-69.
- Masquelier J. Historic Note on OPC, Procyanidines de France. In. Martillac, France (1991).
- Mathur D, Lopez-Rodas G, Casanova B, Marti MB. Perturbed glucose metabolism: insights into multiple sclerosis pathogenesis. *Front Neurol* (2014). doi: 10.3389/fneur. 2014.00250.
- Matthäus B. Virgin grape seed oil: Is it really a nutritional highlight? *European Journal of lipid science and technology* (2008) 110 (7): 645-650.
- Matusheski NV, Juvik JA, Jeffery EH. Heating decreases epithiospecifier protein activity and increases sulforaphane formation in broccoli. *Phytochemistry* (2004) 65:1273-1281.
- Mauriz E, Vallejo D, Tunon MJ, Rodriguez-Lopez JM, Rodriguez-Perez R, Sanz-Gomez J, García-Fernández Mdel C. Effects of dietary supplementation with lemon verbena extracts on serum inflammatory markers of multiple sclerosis patients. *Nutr Hosp* (2015) 31:764-771.

- McCarthy DP, Richards MH, Miller SD. Mouse modelsof multiple sclerosis: Experimental autoimmune encephalomyelitis and Theiler's virus-induced demyelinating disease. *Methods in Molecular Biology* (2012) 900:381-401.
- McGinley MP, Goldschmidt CH, Rae-Grant AD. Diagnosis and Treatment of Multiple Sclerosis A Review. *JAMA* (2021) 325 (8):765-779.
- McQualter JL, Bernard CC. Multiple sclerosis: A battlebetween destruction and repair. *Journal of Neurochemistry* (2007) 100:295-306.
- Meador W, Salter AR, Rinker JR 2nd. Symptomatic Management of Multiple Sclerosis-Associated Tremor Among Participants in the NARCOMS Registry. *Int J MS Care* (2016) 18(3):147-53.
- Meinl E, Derfuss T, Krumbholz M, Pröbstel AK, Hohlfeld R. Humoral autoimmunity in multiple sclerosis. *J Neurol Sci* (2011) 306(2):180-182.
- Mellen PB, Daniel KR, Brosnihan KB, Hansen KJ, Herrington DM. Effect of muscadine grape seed supplementation on vascular function in subjects with or at risk for cardiovascular disease: a randomized crossover trial. *J Am Coll Nutr* (2010) 29 (5): 469-475.
- Menge T, Stüve O, Bernd C, Kieseier C, Hartung HP. Alemtuzumab: The advantages and challenges of a novel therapy in MS. *American Academy of Neurology* (2014). doi: 10.1212/WNL.0000000000000540.
- MichaličkováD, Siman S, Slanar O. New Insights in the Mechanisms of Impaired Redox Signaling and its Interplay With Inflammation and Immunity in Multiple Sclerosis *Physiol Res* (2020) 69: 1-19.
- Miller DM, Weinstock-Guttman B, Béthoux F, Lee JC, Beck G, Block V, Durelli L, LaMantia L, Barnes D, Sellebjerg F, Rudick RA. A meta-analysis of methylprednisolone in recovery from multiple sclerosis exacerbations. *Mult Scler* (2000) 6(4):267-273.
- Miller E, Walczak A, Majsterek I, Kedziora J. Melatonin reduces oxidative stress in the erythrocytes of multiple sclerosis patients with secondary progressive clinical course. *J. Neuroimmunol* (2013) 257:97-101.
- Miller ED, Dziedzic A, Saluk-Bijak J, Bijak M. A Review of Various Antioxidant Compounds and their Potential Utility as Complementary Therapy in Multiple Sclerosis. *Nutrients* (2019). doi: 10.3390/nu11071528.

- Milo R, Kahana E. Multiple sclerosis: geoeidemiology, genetics and the environment. *Autoimmunity reviews* (2010) 9:387-394.
- Mirabelli E, Elkabes S. Neuropathic Pain in Multiple Sclerosis and Its Animal Models: Focus on Mechanisms, Knowledge Gaps and Future Directions. *Front Neurol* (2021). doi: 10.3389/fneur.2021.793745.
- Mirshafiey A, Mohsenzadegan M. Antioxidant therapy in multiple sclerosis. *Immunopharmacology and Immunotoxicology* (2009) 31(1): 13-29.
- Mitsdoerffer M., Kuchroo V. New pieces in the puzzle: How does interferon- $\beta$  really work in multiple sclerosis? *Annals of Neurology: Official Journal of the American Neurological Association and the Child Neurology Society* (2009) 65:487-488.
- Mix E, Meyer-Rienecker H, Hartung HP, Zettl UK. Animal models of multiple sclerosis--potentials and limitations. *Prog Neurobiol* (2010) 92(3):386-404.
- Mohajeri M, Sadeghizadeh M, Najafi F, Javan M. Polymerized nano-curcumin attenuates neurological symptoms in eae model of multiple sclerosis through down regulation of inflammatory and oxidative processes and enhancing neuroprotection and myelin repair. *Neuropharmacology* (2015) 99:156-167.
- Moisset X, Ouchchane L, Guy N, Bayle DJ, Dallel R. Migraine headaches and pain with neuropathic characteristics: comorbid conditions in patients with multiple sclerosis: Migraine and neuropathic pain in multiple sclerosis. *PAIN Elsevier* (2013) 154 (12): 2691- 2699.
- Mojaverrostami S, Bojnordi MN, Ghasemi-Kasman M, Ebrahimzadeh MA and Hamidabadi HG. A review of herbal therapy in multiple sclerosis. *Adv Pharm Bull* (2018) 8(4): 575-590.
- Mokni M, HamLaoui-Guesmi S, Amri M, Marzouki L, Limam F, Aouani E. Grape seed and skin extract protects against acute chemotherapy toxicity induced by doxorubicin in rat heart. *Cardiovasc Toxicol* (2012) 12(2):158-165.
- Mokni M, Hamlaoui S, Karkouch I. Resveratrol Provides Cardioprotection after Ischemia/reperfusion Injury via Modulation of Antioxidant Enzyme Activities. *Iran J Pharm Res* (2016) 12(4):867-875.
- Mokry LE, Ross S, Timpson NJ, Sawcer S, Davey Smith G, Richards JB. Obesity and Multiple sclerosis: A Mendelian Randomization study. *PloS Med* (2016).doi: 10.1371/journal.pmed.1002053.

Moreau T, Debouverie M, Fromont A, Mathey G. Epidémiologie et comorbidités. In : Moreau T, Du Pasquier R, coordinators. Sclérose en plaques. Traité de neurologie, Editor : Doin (2017). Chapter 1.

Moreau T. La sclérose en plaques, pour répondre aux questions de vos patients. Editions Edimark santé (2012) 21(66):184-185.

Morgan BP, Gommorman JL, Ramaglia V. An “Outside-In” and “Inside-Out” Consideration of Complement in the Multiple Sclerosis Brain: Lessons From Development and Neurodegenerative Diseases. *Front Cell Neurosci sec Cellular Neuropathology* (2021). doi: 10.3389/fncel.2020.600656.

Morrow SA, Metz LM, Kremenchutzky M. High dose oral steroids commonly used to treat relapses in Canadian MS clinics. *Can J Neurol Sci* (2009) 36(2):213-215.

Munger KL, Chitnis T, Ascherio A. Body size and risk of MS in two cohorts of US women. *Neurology* (2009) 73(19):1543-1550.

Munoz JJ, Bernard CC, Mackay IR. Elicitation of experimental allergic encephalomyelitis (EAE) in mice with the aid of pertussigen. *Cell Immunol* (1984) 83(1):92-100.

Muresanu DF, Balea M, Rosu O, Buzoianu A, Slavoaca D. Neuroprotection and Recovery in Multiple Sclerosis. *Licensee In Tech* (2016). doi: 10.5772/63829.

Murray M. Procyanidolic oligomers. *The Textbook of Natural Medicine*. Nandakumar V, Singh T, Katiyar S K. Multi-targeted prevention and therapy of cancer by proanthocyanidins. *Cancer Letters* (1999) 269(2): 378-387.

Muthian G, Bright JJ. Quercetin, a flavonoid phytoestrogen, ameliorates experimental allergic encephalomyelitis by blocking Il-12 signaling through JAK-STAT pathway in Tlymphocyte. *Journal of clinical immunology* (2004) 24(5):542-552.

## *N*

Natarajan J, Baskaran M, Humtsoe LC, Vadivelan R, Justin A Enhanced braintargeting efficacy of Olanzapine through solid lipid nanoparticles. *Artif. Cells NanomedicineBiotechnol* (2016)45(2): 364-371.

NaveKA, Werner HB. Myelination of the Nervous System: Mechanisms and Functions .*Annual Review of Cell and Developmental Biology* (2014) 30(1): 503-533.

Nedergaard M, Ransom B, Goldman SA. New roles for astrocytes: redefining the functional architecture of the brain. *Trends Neurosci* (2003) 26:523-530.

Nicol B, Laplaud DA, Liblau R. Sclérose en plaques, une maladie auto-immune. In : Moreau T, Du Pasquier R, coordinators. Sclérose en plaques. *Traité de neurologie*, Editor : Doin (2017). Chapter 5.

Nielsen TR, Rostgaard K, Nielsen NM, Koch-Henriksen N, Haahr S, Sørensen PS Hjalgrim, H. Multiple sclerosis after infectious mononucleosis. *Archives of neurology* (2007) 64:72-75.

Nieuwenhuys R, Voogd J, Huijzen C. *The Human Central Nervous System. A Synopsis and Atlas*. Steinkopff-Verlag Darmstadt (2008). doi: 10.1007/978-3-540-34686-9.

Nimmagadda VK, Bever CT, Vattikunta NR, Talat S, Ahmad V, Nagalla NK, Trisler D, Judge SI, Royal W 3rd, Chandrasekaran K, Russell JW, Makar TK. Overexpression of SIRT1 protein in neurons protects against experimental autoimmune encephalomyelitis through activation of multiple SIRT1 targets. *J Immunol* (2013) 190(9):4595-4607.

Noor NA, Fahmy HM, Mohammed FF, Elsayed AA, Radwan NM. *Nigella sativa* ameliorates inflammation and demyelination in the experimental autoimmune encephalomyelitis-induced Wistar rats. *Int J Clin Exp Pathol* (2015)8(6):6269-6286.

Noseworthy JH, Lucchinetti C, Rodriguez M, Weinshenker BG. Multiple sclerosis. *New England journal of medicine* (2000) 343:938-952.

Nualkaew S, Thongpraditchote S, Wongkrajang Y, Umehara K, Noguchi H. Isolation of a new compound, 2-butanone 4-glucopyranoside 6'-O-gallate and other 8 compounds from the anti-inflammatory leave extracts of *Memecylon edule* Roxb. *Nat Prod Res* (2016) 31(12):1-9.

Nunomura A, Honda K, Takeda A, Hirai K, Zhu X, Smith MA, Perry G. Oxidative damage to RNA in neurodegenerative diseases. *J Biomed Biotechnol* (2006). doi: 10.1155/JBB/2006/82323.

## **O**

O'Connor AB, Schwid SR, Herrmann DN, Markman JD, Dworkin RH. Pain associated with multiple sclerosis: systematic review and proposed classification. *Pain* (2008) 137(1):96-111.

Odai T, Terauchi M, Kato K, Hirose A, Miyasaka N. Effects of grape seed proanthocyanidin extract on vascular endothelial function in participants with prehypertension: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Nutrients* (2019). doi: 10.3390/nu11122844.

- Ohl K, Tenbrock K, Kipp M. Oxidative stress in multiple sclerosis: Central and peripheral mode of action. *Experimental Neurology* (2016) 277: 58-67.
- Olechowski CJ, Parmar A, Miller B, Stephan J, Tenorio G, Tran K, Leighton J, Kerr BJ. A diminished response to formalin stimulation reveals a role for the glutamate transporters in the altered pain sensitivity of mice with experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *Pain* (2010) 149(3):565-572.
- Olechowski CJ, Tenorio G, Sauve Y, Kerr BJ. Changes in nociceptive sensitivity and object recognition in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *Exp Neurol* (2013) 241:113-121.
- Olechowski CJ, Truong JJ, Kerr BJ. Neuropathic pain behaviours in a chronic-relapsing model of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *Pain* (2009) 141(1-2): 156-164.
- OlitzkyPK, Yager RH. Experimental disseminated encephalomyelitis in white mice. *J Exp Med* (1949) 90(3):213-224.
- Oliveira IP, Martínez L. Molecular basis for competitive solvation of the Burkholderiacepacia lipase by sorbitol and urea. *Phys Chem Chem Phys PCCP* (2016) 18: 21797-21808.
- Oliver AR, Lyon GM, Ruddle NH. Rat and human myelin oligodendrocyte glycoproteins induce experimental autoimmune encephalomyelitis by different mechanisms in C57BL/6 mice. *J Immunol* (2003) 171(1):462-8. Erratum in: *J Immunol* (2003) 171(1): 462-480.
- Oliveri RL, Valentino P, Russo C, Sibilgia G, Aguglia U, Bono F, Fera F, Gambardella A, Zappia M, Pardatscher K, Quattrone A. Randomized trial comparing two different high doses of methylprednisolone in MS: a clinical and MRI study. *Neurology* (1998) 50(6):1833-1836.
- Olson JJ, Poor MM Jr, Beck DW. Methylprednisolone reduces the bulk flow of water across an in vitro blood-brain barrier. *Brain Res* (1988) 439(2):259-265
- Österberg A, BoivieJ. Central pain in multiple sclerosis – Sensory abnormalities. *European Journal of Pain* (2010) 14(1): 104-110.
- Osterberg A, Boivie J, Thuomas KA. Central pain in multiple sclerosis--prevalence and clinical characteristics. *Eur J Pain* (2005) 9(5):531-542.
- Ouallet JC, Brochet B. Aspects cliniques, physiopathologiques et thérapeutiques de la sclérose en plaques. *EMC-Neurol* (2004) 1: 415-457.

Oveland E, Ahmad I, Lereim RR. Cuprizone and EAE mouse frontal cortex proteomics revealed proteins altered in multiple sclerosis. *Sci Rep* (2021). doi: 10.1038/s41598-021-86191-5.

**P**

Pacottet P. Viticulture : Encyclopédie agricole. Broché (2012). MAXTOR.

Palumbo S and Pellegrini S. Multiple Sclerosis: Perspective in Treatment and Pathogenesis, Chapter 11: Experimental *In Vivo* Models of Multiple Sclerosis: State of the Art. Zangron Ic, MC Laughlin PJ, editors (2017) Brisbane (AU).

Papeix C. La Sclérose en plaques : S'informer pour mieux se soigner. Editions Odile Jacob, (2011).

Parandoosh M, Yousefi R, Khorsandi H, Nikpayam O, Saidpour A, Babaei H. The effects of grape seed extract (*Vitis vinifera*) supplement on inflammatory markers, neuropeptide Y, anthropometric measures, and appetite in obese or overweight individuals: a randomized clinical trial. *Phytother Res* (2020) 34 (2): 379-387.

Park E, Edirisinghe I, Choy YY, Waterhouse A, Burton-Freeman B. Effects of grape seed extract beverage on blood pressure and metabolic indices in individuals with pre-hypertension: a randomised, double-blinded, two-arm, parallel, placebo-controlled trial. *Br J Nutr* (2016) 115 (2):226-238.

Parnell GP, Booth DR. The Multiple Sclerosis (MS) Genetic Risk Factors Indicate both Acquired and Innate Immune Cell Subsets Contribute to MS Pathogenesis and Identify Novel Therapeutic Opportunities. *Front Immunol* (2017).doi: 10.3389/fimmu.2017.00425.

Parodi B, Rossi S, Morando S, Cordano A, Bragioni A, Motta C, Usai C, Wipke BT, RH Scannevin, Mancardi GL, Centonza D, de Rosbo RK, Uccelli A. Fumarates modulate microglia activation through a novelHCAR2 signaling pathway and rescue synaptic dysregulationin inflamed CNS. *Acta Neuropathol* (2015) 130:279-295.

Pastrana-Bonilla E, Akoh CC, Sellappan S, Krewer G. Phenolic content and antioxidant capacity of muscadine grapes. *J. Agric. Food Chem* (2003) 51:5497-4503.

Paterson PY. Transfer of allergic encephalomyelitis in rats by means of lymph node cells. *The Journal of Experimental Medicine* (1960)111(1):119-136.

Patsopoulos NA. Understanding MS genetics. *Genetics of Multiple Sclerosis: An Overview and New Directions*. Cold Spring Harb Perspect Med (2018). doi: 10.1101/cshperspect.a028951.

Pegoretti V, Swanso KA, Bethea JR, Probert L, Eisel ULM, Fisher R. Inflammation and Oxidative Stress in Multiple Sclerosis: Consequences for therapy Development. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* (2020). doi: 10.1155/2020/7191080.

Pekmezovic T, Drulovic J, Milenkovic M, Jarebinski M, Stojsavljevic N, Mesaros S, Kistic D, Kostic J. Lifestyle factors and multiple sclerosis: a case-control study in Belgrade. *Neuroepidemiology* (2006) 27:212-216.

Pérennes M, Ollivier C, Lorillon P. La sclérose en plaques, première cause non traumatique Perforatum. *Nutr Neurosci* (2014)17(5):214-221.

Perry G, Nunomura A, Hirai K, Zhu X, Prez M, Avila J, Castellani RJ, Atwood CS, Aliev G, Sayre LM. Is oxidative damage the fundamental pathogenic mechanism of Alzheimer's and other neurodegenerative diseases? *Free Radical Biology and Medicine* (2002) 33:1475-1479.

Peruga I, Hartwig S, Thöne J, Hovemann B, Gold R, Juckel G, Linker RA. Inflammation modulates anxiety in an animal model of multiple sclerosis. *Behav Brain Res* (2011) 220(1):20-29.

Peruzzotti-Jametti L, Pluchino S. Targeting Mitochondrial Metabolism in Neuroinflammation: Towards a Therapy for Progressive Multiple Sclerosis. *Trends Mol Med* (2018) 24(10):838-855.

Pinent M., Castell-Auví A, Genovese MI, Serrano J, Casanova A, Blay M, Ardévol A. Antioxidant effects of proanthocyanidin-rich natural extracts from grape seed and cupuassu on gastrointestinal mucosa. *Journal of the Science of Food and Agriculture* (2016) 96(1): 178-182.

Pittman M. Pertussis toxin: the cause of the harmful effects and prolonged immunity of whooping cough A hypothesis. *Rev Infect Dis* (1979) 1(3):401-412.

Pivot D, Debouverie M, Grzebyk M, Brassat D, Clanet M, Clavelou P, Confavreux C, Edan G, Leray E, Moreau T, Vukusic S, Hédelin G. Geographical Heterogeneity of Multiple Sclerosis Prevalence in France. *PLoS One* (2016).doi:10.1371/journal.pone.0167556.

- Planche V, Panatier A, Hiba B, Ducourneau EG, Raffard G, Dubourdiou N et al. Selective dentate gyrus disruption causes memory impairment at the early stage of experimental multiple sclerosis. *Brain, behavior, and immunity* (2017) 60:240-254.
- Portburya ST, Hare DJ, Sgambellonia C, PerronnesaK, Portburya AJ, Finkelsteina DI, Adlarda A. Trehalose Improves Cognition in the Transgenic Tg2576 Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's disease* (2017).doi: 10.3233/JAD-170322.
- Potter LE, Doolen S, Mifflin K, Tenorio G, Baker G, Taylor BK, Kerr BJ. Antinociceptive Effects of the Antidepressant Phenelzine are Mediated by Context-Dependent Inhibition of Neuronal Responses in the Dorsal Horn. *Neuroscience* (2018) 5(383): 205-215.
- Power JHT, Blumbergs PC. Cellular glutathione peroxidase in human brain: cellular distribution, and its potential role in the degradation of Lewy bodies in Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Acta neuropathologica* (2009)117:63-73.
- Price ML, and Butler LG. Rapid visual estimation and spectrophotometric determination of tannin content of sorghum grain. *J Agric Food Chem* (1977) 25:1268-1273.
- Prieto P, Pineda M, Aguilar M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex. Specific application to the determination of vitamin E1. *Analytical Biochemistry* (1999)269:337-341.
- Procaccini C, De Rosa V, Pucino V, Formisano L, Matarese G. Animal models of Multiple Sclerosis. *Eur J Pharmacol* (2015) 15 (759):182-191.

## **R**

- Raasakka A, Kursula P. The myelin membrane-associated enzyme 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase: on a highway to structure and function. *Neurosci Bull* (2014) 30(6):956-966.
- Rabchevsky, A. G., Degos, J. D., & Dreyfus, P. A. Peripheral injections of Freund's adjuvant in mice provoke leakage of serum proteins through the blood-brain barrier without inducing reactive gliosis. *Brain Research* (1999) 832:84-96.
- Rabiei Z. Phytotherapy as a Complementary Medicine for Multiple Sclerosis. *Turk J Pharm Sci* (2019) 16(2):246-251.
- Racke MK. Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *Curr Protoc Neurosci* (2001).Chapter 9:Unit9.7.

- Raftopoulos R, Hickman SJ, Toosy A. Phenytoin for neuroprotection in patients with acute optic neuritis: a randomised, placebo-controlled, phase 2 trial. *Lancet Neurol* (2016) 15(3): 259-269.
- Rahn EJ, Iannitti T, Donahue RR, Taylor BK. Sex differences in a mouse model of multiple sclerosis: neuropathic pain behavior in females but not males and protection from neurological deficits during proestrus. *Biol Sex Differ* (2014). doi: 10.1186/2042-6410-5-4.
- Rai NK, Singh V, Dutta R. Comparative proteomic profiling identifies reciprocal expression of mitochondrial proteins between white and gray matter lesions from multiple sclerosis brains. *Front Neurol* (2021). doi: 10.3389/fneur.2021.779003.
- Ramagopalan SV, Knight JC, Erbers GC. Multiple sclerosis and the major histocompatibility complex. *Current opinion in Neurology* (2009) 22(3): 219-225.
- Ramos-Cejudo J, Oreja-Guevara C, Aroeira LS, De Antonio LR, Chamorro B, Diez-Tejedor, E. Treatment with natalizumab in relapsing–remitting multiple sclerosis patients induces changes in inflammatory mechanism. *Journal of clinical immunology* (2011) 31:623-631.
- Ransom BR, Connors BW, Richerson GB. The nervous system. In: Boron WF and Boulpaep EF, coordinators. *Medical Physiology: A cellular and Molecular approach*. Editor Saunders/Elsevier (2009). Chapter III.
- Rathnasamy G, Ling EA, Kaur C. Therapeutic implications of melatonin in cerebral edema. *Histol. Histopathol* (2014) 29:1525-1538.
- Raverdeau M, Breen CJ, Misiak A, Mills KH. Retinoic acid suppresses IL-17 production and pathogenic activity of  $\gamma\delta$ T cells in CNS autoimmunity. *Immunol Cell Biol* (2016) 94:763-773.
- Riccio P, Rossano R. Diet, Gut Microbiota, and Vitamins D + A in Multiple Sclerosis. *Neurotherapeutics* (2018) 15(1):75-91.
- Riccio P, Rossano R. Nutrition facts in multiple sclerosis. *ASN Neuro* (2015). doi: 10.1177/1759091414568185.
- Rice GP, Hartung HP, Calabresi PA. Anti- $\alpha$ 4 integrin therapy for multiple sclerosis: mechanisms and rationale. *Neurology* (2005) 64(8):1336-1342.
- Richard J, Cambien F, Ducimetiere P. Epidemiologic characteristics of coronary disease in France. *La Nouvelle Presse Medicale* (1981) 10(14):153-159.

Ridge SC, Sloboda AE, McReynolds RA, Levine S, Oronsky AL, Kerwar SS. Suppression of experimental allergic encephalomyelitis by mitoxantrone. *Clin Immunol Immunopathol* (1985) 35(1):35-42.

Rimmerman N, Bradshaw HB, Hughes HV, Chen JSC, Hu SSJ, McHugh D, Vefring E, Jahnsen JA, Thompson EL, Masuda K. N-palmitoyl glycine, a novel endogenous lipid that acts as a modulator of calcium influx and nitric oxide production in sensory neurons. *Mol Pharmacol* (2008) 74:213-224.

Rivers TM, Schwentker FF. Encephalomyelitis accompanied by myelin destruction experimentally produced in monkeys. *J Exp Med* (1935) 61(5): 689-702.

Rivers TM, Sprunt DH, Berry GP. Observations on attempts to produce acute disseminated encephalomyelitis in monkeys. *J Exp Med* (1933) 58(1):39-53.

Rodgers RJ, Dalvi A. Anxiety, defence and the elevated plus-maze. *Neurosci Biobehav Rev* (1997) 21(6):801-810.

Rodrigues DH, Leles BP, Costa VV, Miranda AS, Cisalpino D, Gomes DA, de Souza DG, Teixeira AL. IL-1 $\beta$  Is Involved with the Generation of Pain in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *Mol Neurobiol* (2016) 53(9):6540-6547.

Rodrigues DH, Sachs D, Teixeira AL. Mechanical hypernociception in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Arq Neuropsiquiatr* (2009) 67(1):78-81.

Rodríguez-Pérez C, García-Villanova B, Guerra-Hernández E, Verardo V. Grape Seeds Proanthocyanidins: An Overview of In Vivo Bioactivity in Animal Models. *Nutrients* (2019). doi:10.3390/nu11102435.

## S

Saboor YAA, Harirchian MH, Mohammadzadeh Honarvar N, Bitarafan S, Abdolahi M, Siassi F, Salehi E, Sahraian MA, Eshraghian MR, Roostaei T. The effect of vitamin A supplementation on Foxp3 and TGF- $\beta$  gene expression in Avonex-treated multiple sclerosis patients. *J Mol Neurosci* (2015) 56:608-612.

Sahajpal N, Kowluru A, Kowluru RA. The Regulatory Role of Rac1, a Small Molecular Weight GTPase, in the Development of Diabetic Retinopathy. *J Clin Med* (2019). doi: 10.3390/jcm8070965.

- Sandi D, Kokas Z, Biernacki T, Bencsik K, Klivényi P, Vécsei L. Proteomics in MultipleSclerosis: The Perspective of the Clinician. *Int J Mol Sci* (2022). doi: 10.3390/ijms23095162.
- Sano A, Uchida R, Saito M, Shioya N, Komori Y, Tho Y, Hashizume N. Beneficial effects of grape seed extract on malondialdehyde-modified LDL. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology (Tokyo)* (2007) 53(2): 174-182.
- Satoh JI, Yamamura T, Arima J. The 14-3-3 Protein \_ Isoform Expressed in ReactiveAstrocytes in Demyelinating Lesions of MultipleSclerosis Binds to Vimentin and Glial Fibrillary AcidicProtein in Cultured Human Astrocytes. *American Journal of Pathology* (2004) 165(2): 577-592.
- Sawcer S. The complex genetics of multiple sclerosis: pitfalls and prospects. *Brain* (2008) 131:3118-3131.
- Sawcer S. The genetic aspects of multiple sclerosis. *Ann Indian Acad Neurol* (2009) 12(4):206-214.
- Scannevin RH, Chollate S, Jun MY, Shackett M, Patel H, Bista P, Zeng W, Ryan S, Yamamoto M, Lukashev M. Fumarates promote cytoprotection of central nervous system cells against oxidative stress via the nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 pathway. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* (2012) 341:274-284.
- Scherer SS. Nodes, paranodes, and incisures: from form to function. *Ann N Y Acad Sci* (1999) 883:131-142.
- Scherer C, Dubas F. Sclérose en plaques. *Rev Prat* (2009) 59:695-701.
- Schreibelt G,Horssen J, Rossum S,Dijkstra DC, Drukarch B, de Vries HE. Therapeutic potential and biological role of endogenous antioxidant enzymes in multiple sclerosis pathology.*Brain Research Reviews* (2007)56(2): 322-330.
- Schulz D, Kopp B, Kunkel A, Faiss JH. Cognition in the early stage of multiplesclerosis.*J Neurol* (2006) 253: 1002-1010.
- Sebastiani G, Almeida-Toledano, Serra-Delgado M, Navarro-Tapia E, Sailer S, Valverde O, Garcia-Algar O, Andreu-Fernández V. Therapeutic Effects of Catechins in Less Common Neurological and Neurodegenerative Disorders. *Nutrients* (2021). doi:10.3390/nu13072232.

- Sedighi B, Pardakhty A, Kamali H, Shafiee K, Hasani BN. Effect of *Boswellia papyrifera* on cognitive impairment in multiple sclerosis. *Iran J Neurol* (2014)13(3):149-153.
- Shabani S, Rabiei Z, Amini-Khoei H. Exploring the multifaceted neuroprotective actions of gallic acid: a review, *International Journal of Food Properties* (2020) 23(1): 736-752.
- Shen P, Deng X, Chen Z, Ba X, Qin K, Huang Y, et al. SIRT1: A Potential Therapeutic Target in Autoimmune Diseases. *Front Immunol* (2021). doi: 10.3389/fimmu.2021.779177.
- Shi J, Yu J, Pohorly JE, Kakuda Y. Polyphenolics in grape seeds-biochemistry and functionality. *J Med.Food* (2003) 6:291-299.
- Shimada T, Fournier AE, Yamagata K. Neuroprotective function of 14-3-3 proteins in neurodegeneration. *BioMed Research International* (2013). doi: 10.1155/2013/564534.
- Shindler KS, Ventura E, Dutt M, Elliott P, Fitzgerald DC, Rostami A. Oral resveratrol reduces neuronal damage in a model of multiple sclerosis. *J Neuroophthalmol* (2010)30(4):328-339.
- Shirani A, Darin T, Okud, Stüve O. Therapeutic Advances and Future Prospects in Progressive Forms of Multiple Sclerosis. *Neurotherapeutics* (2016) 13:58-69.
- Shon P, Allegrini K, Engelhart-Jentsch A, Riva G, Petrangolini P. Grape seed extract positively modulates blood pressure and perceived stress: a randomized, double-blind, placebo-controlled study in healthy volunteers. *Nutrients* (2021).doi: 10.3390/nu13020654.
- Shriver LP, Manchester M. Inhibition of fatty acid metabolism ameliorates disease activity in an animal model of multiple sclerosis. *Scientific reports* (2011). doi: 10.1038/srep00079.
- Siahpoosh A, Majdinasab N, Derakhshannezhad N, Khalilic HR, Malayeric A. Effect of grape seed on quality of life in multiple sclerosis patients. *J Contemp Med Sci* (2018) 4(3): 148-152.
- Siddiqui S, Kamal A, Khan F, Jamali KS, Saify ZK. Gallic and vanillic acid suppress inflammation and promote myelination in an in vitro mouse model of neurodegeneration. *Molecular Biology Reports* (2019) 46:997-1011.
- Simkins TJ, Duncan GJ, Bourdette D. Chronic demyelination and axonal degeneration in multiple sclerosis: pathogenesis and therapeutic implications. *Curr Neurol Neurosci Rep* (2021). doi: 10.1007/s11910-021-01110-5.
- Simon KC, Schmidt H, Loud S, Ascherio A. Epstein–Barr virus candidate genes and multiple sclerosis. *Multiple sclerosis and related disorders* (2015) 4: 60-64.

- Singleton VL, Rossi JA. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Viticult* (1965) 16:44-58.
- Sloka JS, Stefanelli M. The mechanism of action of methylprednisolone in the treatment of multiple sclerosis. *Mult Scler* (2005) 11(4):425-432.
- Sloka S, Silva C, Pryse-Phillips W, Patten S, Metz L, Yong VW. A quantitative analysis of suspected environmental causes of MS. *Canadian Journal of Neurological Sciences* (2011) 38: 98-105.
- Smerjac SM and Bizzozero OA. Cytoskeletal protein carbonylation and degradation in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neurochem* (2008) 105(3): 763-772.
- Smine S, Obry A, Kadri S, Hardouin J, Fréret M, Amri M, Jouenne T, Limam F, Cosette P, Aouani E. Brain proteomic modifications associated to protective effect of grape extract in a murine model of obesity. *BBA - Proteins and Proteomics* (2017). doi:10.1016/j.bbapap.2017.03.001.
- Smith P. Animal Models of Multiple Sclerosis. *Current Protocols* (2021). doi: 10.1002/cpz1.185.
- Sochorova L, Prusova B 1, Cebova M, Jurikova T, MLcek J, Adamkova A, Nedomova S, Baron M, Sochor J. Health Effects of Grape Seed and Skin Extracts and Their Influence on Biochemical Markers. *Molecules* (2020). doi: 10.3390/molecules25225311.
- Solaro C, Uccelli MM. Management of pain in multiple sclerosis: a pharmacological approach. *Nat Rev Neurol* (2011) 7(9):519-527.
- Song P, Zou MH. Roles of reactive oxygen species in physiology and pathology. *Atherosclerosis: Risks, Mechanisms, and Therapies* (2015) 9: 379-392.
- Spain R, Powers K, Murchison C. Lipoic acid in secondary progressive MS: A randomized controlled pilot trial. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm* (2017). doi: 10.1212/NXI.0000000000000374.
- Stadelmann C, TimmLer S, Barrantes-Freer A, Simons M. Myelin in the Central Nervous System: Structure, Function, and Pathology. *Physiol Rev* (2019) 99(3):1381-1431.
- Stämpfli MR and Anderson JP. How cigarette smoke skews immune responses to promote infection, lung disease and cancer. *Nature Reviews Immunology* (2009) 9:377-384.

Steinman L, Zamvil SS. How to successfully apply animal studies in experimental allergic encephalomyelitis to research on multiple sclerosis. *Ann Neurol* (2006) 60(1):12-21.

Stromnes IM, Goverman JM. Active induction of experimental allergic encephalomyelitis. *Nature Protocols* (2006a) 1:1810-1819.

Stuart G, Krikorian KS. Serological Diagnosis of the Enterica by the Method of Qualitative Receptor Analysis. *J Hyg (Lond)* (1928) 28(2):105-126.

Suemaru K, Kawasaki H, Gomita Y, Tanizaki Y. Involvement of nitric oxide in development of tail-tremor induced by repeated nicotine administration in rats. *European Journal of pharmacology* (1997) 335:139-143.

Sutherland BA, Rahman RM, Appleton I. Mechanisms of action of green tea catechins, with a focus on ischemia-induced neurodegeneration. *J Nutr Biochem* (2006) 17:291-306.

Szent-Györgyi A. Vitamin P: Flavonols as vitamins. *Nature* (1936). doi:10.1038/138027a0.

## **T**

Tanaka M and Vécsei L. Monitoring the Redox Status in Multiple Sclerosis. *Biomedicines* (2020). doi: 10.3390/biomedicines8100406.

Tanaka M, Machida Y, Niu S, Ikeda T, Jana NR, Doi H, Kurosawa M, Nekooki M, Nukina N. Trehalose alleviates polyglutamine-mediated pathology in a mouse model of Huntington disease. *Nat Med* (2004) 10(2):148-154.

Tandon A, Singh SJ, Chaturvedi RJ. Stem Cells as Potential Targets of Polyphenols in Multiple Sclerosis and Alzheimer's disease. *BioMed Research Internation* (2018). doi: 10.1155/2018/1483791.

Terra X, Montagut G, Bustos M, Llopiz N, Ardèvol A, Bladé C, Fernández-Larrea J, Pujadas G, Salvadó J, Arola L. Grape-seed procyanidins prevent low-grade inflammation by modulating cytokine expression in rats fed a high-fat diet. *J Nutr Biochem* (2009) 20: 210-218.

Teuscher C, Bunn JY, Fillmore PD, Butterfield RJ, Zachary JF, Blankenhorn EP. Gender, age, and season at immunization uniquely influence the genetic control of susceptibility to histopathological lesions and clinical signs of experimental allergic encephalomyelitis: implications for the genetics of multiple sclerosis. *Am J Pathol* (2004) 165(5):1593-1602.

- Thacker EL, Mirzaei F, Ascherio A. Infectious mononucleosis and risk for multiple sclerosis: a meta-analysis. *Ann Neurol* (2006) 59(3):499-503.
- Thompson AJ, Banwell BL, Barkhof F, et al. Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. *Lancet Neurol* (2018a)17(2):162-173.
- Thompson AJ, Baranzini SE, Geurts J, Hemmer B, Ciccarelli O. Multiple sclerosis. *Lancet* (2018b) 2:1622-1636.
- Thompson AJ, Toosy AT, Ciccarelli O. Pharmacological management of symptoms in multiple sclerosis: current approaches and future directions. *Lancet Neurol* (2010) 9:1182-1199.
- Thouvenot É. Update on clinically isolated syndrome. *Presse Med* (2015). doi: 10.1016/j.lpm.2015.03.002.
- Tian DH, Perera CJ, Moalem-Taylor G. Neuropathic pain in animal models of nervous system autoimmune diseases. *Mediators Inflamm* (2013)2013:298-326.
- Tintoré M, Arrambide G. Early onset multiple sclerosis: The role of gender. *Journal of the Neurological Sciences* (2009) 286:31-34.
- Tintore M, Vidal-Jordana A, Sastre-Garriga J. Treatment of multiple sclerosis success from bench to bedside. *Nat Rev Neurol* (2019)15(1):53-58.
- Tischner D, Reichardt HM. Glucocorticoids in the control of neuroinflammation. *Mol Cell Endocrinol* (2007) 275(1-2):62-70.
- Tobore TO. Towards a Comprehensive Etiopathogenetic and Pathophysiological Theory of Multiple Sclerosis. *Journal of Neuroscience* (2019). doi: 10.1080/00207454.2019.1677648.
- Toyokuni S. Iron and carcinogenesis: from Fenton reaction to target genes. *Redox Rep Commun Free Radic Res* (2002)7:189-197.
- Tu X, Wang M, Liu Y, Zhao W, Ren X, Li Y, Liu H, Gu Z, Jia H, Liu J, Li G, Luo L. Pretreatment of Grape Seed Proanthocyanidin Extract Exerts Neuroprotective Effect in Murine Model of Neonatal Hypoxic-ischemic Brain Injury by Its Antiapoptotic Property. *Cell Mol Neurobiol* (2019) 39(7):953-961.
- Truini A, Barbanti P, Pozzilli C, Cruccu G. A mechanism-based classification of pain in multiple sclerosis. *J Neurol* (2013) 260(2):351-367.

Tuohy VK, Lu ZJ, Sobel RA, Laursen RA, Lees MB. A synthetic peptide from myelin proteolipid protein induces experimental allergic encephalomyelitis. *J Immunol* (1988) 141(4):1126-1230.

Turki K, Charradi K, Boukhalfa H, Belhaj M, Limam F, Aouani E. Grape seed powder improves renal failure of chronic kidney disease patients. *Excli J* (2016) 27(15):424-433.

## *U*

Unusan N. Proanthocyanidins in grape seeds: An updated review of their health benefits and potential uses in the food industry. *Journal of functional Foods* (2020). doi: 10.1016/j.jff.2020.103861.

## *V*

Valente T, Serratosa J, Perpiña U, Saura J, Solá C. Alterations in CD200-CD200R1 system during EAE already manifest at presymptomatic stages. *Frontiers in Cellular Neuroscience* (2017). doi: 10.3389/fncel.2017.00129.

Valet M, Lejeune T, Devis M, van Pesch V, El Sankari S, Stoquart G. Timed Up-and-Go and 2-Minute Walk Test in patients with multiple sclerosis with mild disability: reliability, responsiveness and link with perceived fatigue. *Eur J Phys Rehabil Med* (2019) 55(4):450-455.

Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The international journal of biochemistry & cell biology* (2007) 39: 44-84.

Van der Mei IAF, Ponsonby AL, Dwyer T, Blizzard L, Taylor BV, Kilpatrick T, Butzkueven H, McMichael A.J. Vitamin D levels in people with multiple sclerosis and community controls in Tasmania, Australia. *Journal of neurology* (2007) 254(5): 581-590

Van Meeteren ME, Teunissen CE, Dijkstra CD, Van Tol EAF. Antioxidants and polyunsaturated fatty acids in multiple sclerosis. *European journal of clinical nutrition* (2005) 59(12): 1347-1361.

Vanderheyde N, Verhasselt V, Goldman M, Willems F. Inhibition of human dendritic cell functions by methylprednisolone. *Transplantation* (1999) 67(10):1342-1347.

Vaney C, Heinzl-Gutenbrunner M, Jobin P, Tschopp F, Gattlen B, Hagen U, Schnelle M, Reif M. Efficacy, safety and tolerability of an orally administered cannabis extract in the

treatment of spasticity in patients with multiple sclerosis: a randomized, double-blind, placebo-controlled, crossover study. *Clinical Trial Mult Scler* (2004)10(4):417-424.

Visioli F, Rihn LL, Rodriguez de Turco EB, Kreisman NR, Bazan NG. Free fatty acid and diacylglycerol accumulation in the rat brain during recurrent seizures is related to cortical oxygenation. *J Neurochem* (1993) 61:1835-1842.

Vollmer T, Stewart T, Baxter N. Mitoxantrone and cytotoxic drugs' mechanisms of action. *Neurology* (2010) 74 (1):41-46.

Vrenken H, Geurts JJ. Gray and normal-appearing white matter in multiple sclerosis: an MRI perspective. *Expert Rev Neurother* (2007) 7(3):271-279.

Vukusic S, Van Bockstael V, Gosselin S, Confavreux C. Regional variations of multiple sclerosis prevalence in French farmers. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* (2007).doi: 10.1136/jnnp.2006.101196.

## **W**

Wade DT, Makela P, Robson P, House H, Bateman C. Do cannabis-based medicinal extracts have general or specific effects on symptoms in multiple sclerosis? A double-blind, randomized, placebocontrolled study on 160 patients. *Mult Scler* (2004)10(4):434-441.

Waksman BH, Adams RD. A comparative study of experimental allergic neuritis in the rabbit, guinea pig, and mouse. *J Neuropathol Exp Neurol* (1956) 15(3):293-334.

Waldner H, Whitters MJ, Sobel RA, Collins M, Kuchroo VK. Fulminant spontaneous autoimmunity of the central nervous system in mice transgenic for the myelin proteolipid protein-specific T cell receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (2000) 97:3412-3417.

Walton C, King R, Rechtman L, Kaye R, Leray E, Ann Marrie R, Robertson N, La Rocca N, Uitdehaag B, Mei IVD, Wallin M, Helme A, Napier CA, Rijke N, Baneke P. Rising prevalence of multiple sclerosis worldwide: Insights from the Atlas of MS, third edition. *Mult Scler* (2020) 26(14):1816-1821.

Wang HK, Park UJ, Kim SY, Lee JH, Kim SU, Gwag B, Lee YB. Free radical production in CA1 neurons induces MIP-1alpha expression, microglia recruitment, and delayed neuronal death after transient forebrain ischemia. *J Neurosci* (2008) 28(7):1721-1727.

- Wang IC, Chung CY, Liao F, Chen CC, Lee CH. Peripheral sensory neuron injury contributes to neuropathic pain in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Sci Rep* (2017).doi: 10.1038/srep42304.
- Wang P, Xie K, Wang C, Bi J. Oxidative stress induced by lipid peroxidation is related with inflammation of demyelination and neurodegeneration in multiple sclerosis. *Eur Neurol.* (2014)72(3-4):249-254.
- Wang J, Ren Z, Xu Y, Xiao S, Meydani SN, Wu D. Epigallocatechin-3-gallate ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis by altering balance among CD4+ T-cell subsets. *Am. J. Pathol* (2012) 180:221-234.
- Wang YJ, Thomas P, Zhong JH, Bi FF, Kosaraju S, Pollard A, Fenech M, Zhou XF. Consumption of grape seed extract prevents amyloid-beta deposition and attenuates inflammation in brain of an Alzheimer's disease mouse. *Neurotox Res* (2009) 15(1):3-14.
- Ward NC, Hodgson JM, Croft KD, Burke V, Beilin LJ, Puddey IB. The combination of vitamin C and grape-seed polyphenols increases blood pressure: a randomized, double blind, placebo-controlled trial. *J Hypertens* (2005) 23 (2):427-434.
- Warnke C, Wiendl H, Hartung H-P, Stüve O, Kieseier BC. Identification of targets and new developments in the treatment of multiple sclerosis – focus on cladribine. *Drug Design, Development and Therapy* (2010) 4:117-126.
- Warwicka RA, Ledgerwood CJ, Brenner T, Hanani M. Satellite glial cells in dorsal root ganglia are activated in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Neuroscience Letters* (2014) 569: 59-62.
- Waslo C, Bourdette D, Gray N, Wright K, Spain R. Lipoic Acid and Other Antioxidants as Therapies for Multiple Sclerosis. *Curr Treat Options Neurol* (2019). doi: 10.1007/s11940-019-0566-1.
- Wekerle H, Kojima K, Lannes-Vieira J, Lassmann H, Linington C. Animal models. *Ann Neurol* (1994) 36: 47-53.
- Wendel A. Glutathione Peroxidase. *Methods in enzymology.* (1980) 77: 325-333.
- Werner P, Pitt D, Raine CS. Multiple sclerosis: altered glutamate homeostasis in lesions correlates with oligodendrocyte and axonal damage. *Ann Neurol* (2001) 50(2):169-180.

Widlansky ME, Gutterman DD. Regulation of endothelial function by mitochondrial reactive oxygen species. *Antioxidants & redox signaling* (2011) 15:1517-1530.

Williams A, Piaton G, Aigrot MS, Belhadi A, Théaudin M, Petermann F, Thomas JL, Zalc B, Lubetzki C. Semaphorin 3A and 3F: key players in myelin repair in multiple sclerosis? *Brain*. (2007) 130(10):2554-2565.

## **X**

Xia EQ, Deng GF, Guo YJ, Li HB. Biological activities of polyphenols from grapes. *Int J Mol Sci* (2010) 11: 622-646.

Xie L, Li XK, Funeshima-Fuji N, Kimura H,Matsumoto Y, Isaka Y. Amelioration of experimental autoimmune encephalomyelitis by curcumin treatment through inhibition of IL-17 production. *Int Immunopharmacol* (2009) 9(5):575-581.

Xing H, Zhang S, Muslin AJ. 14-3-3 proteins block apoptosis and differentially regulate MAPK cascades. *EMBO Journal* (2000)19(3):349-358.

Xu C, Zhang Y, Zhu L, Huang Y, Lu J. Influence of growing season on phenolic compounds and antioxidant properties of grape berries from vines grown in subtropical climate. *J Agric Food Chem* (2011) 59: 1078-1086.

## **Y**

Yamakoshi J, Saito M, Kataoka S, Kikuchi M. Safety evaluation of proanthocyanidin-rich extract from grape seeds. *Food and Chemical Toxicology* (2002) 40(5):599-607.

Yan I, Guo MS, Zhang Y, Yu L, Wu JM, Tang Y, Ai W, Zhu FD, Yuen-Kwan Law B, Chen Q. Neurodegenerative Diseases: Current Evidence, Advances, and Opportunities. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* (2022). doi: 10.1155/2022/5288698

Yaouanq J, Semana G, Eichenbaum S et al. Evidence for linkage disequilibrium between HLA-DRB1 gene and multiple sclerosis. *Science* (1997) 276:664-665.

Yilmazer C, Lamers I, Solaro C, Feys P. Clinical perspective on pain in multiple sclerosis. *Mult Scler* (2020). doi: 10.1177/1352458520952015.

Yilmazer- Musa M, Griffith AM, Michels AJ, Schneider E, Frei B. Grape Seed and Tea Extracts and Catechin 3-Gallates Are Potent Inhibitors of  $\alpha$ -Amylase and  $\alpha$ -Glucosidase Activity. *J. Agric. Food Chem* (2012) 60(36):8924-8929.

Yong HYF, Yong VW. Mechanism-based criteria to improve therapeutic outcomes in progressive multiple sclerosis. *Nat Rev Neurol* (2022) 18(1):40-55.

Yoshida N, Yoshikawa T, Nakamura Y, Takenaka S, Sakamoto K, Manabe H, Nakagawa S, Kondo M. Methylprednisolone inhibits neutrophil-endothelial cell interactions induced by interleukin-1beta under flow conditions. *Life Sci* (1997) 60(25):2341-2347.

Yoshimura Y, Nakazawa H, Yamaguchi F. Evaluation of the NO scavenging activity of procyanidin in grape seed by use of the TMA-PTIO/NOC 7 ESR system. *J Agric Food Chem.* (2003) 51: 6409-6412.

Yousef MI, Khalil DKAM, Abdou HM. Neuro- and nephroprotective effect of grape seed proanthocyanidin extract against carboplatin and thalidomide through modulation of inflammation, tumor suppressor protein p53, neurotransmitters, oxidative stress and histology. *Toxicol Rep* (2018) 5:568-578.

Yousuf MS, Zubkow K, Tenorio G, Kerr B. The chloride co-transporters, NKCC1 and KCC2, in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *Neuroscience* (2017) 344:178-186.

Yu H, Bai S, Hao Y. Fatty acids role in multiple sclerosis as “metabokines”. *J Neuroinflammation* (2022). doi: 10.1186/s12974-022-02502-1.

## **Z**

Zajicek J, Reif M, Schnelle M. Cannabis extract in the treatment of muscle stiffness and other symptoms in multiple sclerosis-Results of the MUSEC study. 25th Congress of the European Committee for Treatment and Research in Multiple Sclerosis (2009).

Zajicek JP, Hobart JC, Slade A, Barnes D, Mattison PG. Multiple Sclerosis and Extract of Cannabis: results of the MUSEC trial. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* (2012) 83:1125-1132.

Zalc B. Sclérose en plaques (SEP) (2014) In : INSERM.

Zhang SY, Gui LN, Liu YY, Shi S, Cheng Y. Oxidative Stress Marker Aberrations in Multiple Sclerosis: A meta- Analysis study. *Front Neurosci* (2020). doi: 10.3389/fnins.2020.00823.

Zhang Y, Chi D. Overexpression of SIRT2 Alleviates Neuropathic Pain and Neuroinflammation through Deacetylation of Transcription Factor Nuclear Factor-Kappa B. *Inflammation* (2018) 41(2):569-578.

Zhao H, Dong J, Lu J, Chen J, Li Y, Shan L, Lin Y, Fan W, Gu G. Effects of extraction solvent mixtures on antioxidant activity evaluation and their extraction capacity and selectivity for free phenolic compounds in barley (*Hordeum vulgare* L.). *J Agric Food Chem* (2006) 54:7277-7286.

Zimmermann M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* (1983) 16(2): 109-115.

Zorov DB, Juhaszova M, Sollott SJ. Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release. *Physiological reviews* (2014) 94:909-950.

Zuliani C, Baroni L. Antioxidants for the Prevention and Treatment of Multiple Sclerosis: An Overview. In: *Bioactive Nutraceuticals and Dietary Supplements in Neurological and Brain Disease. Prevention and Therapy* (2015): 341-353.