



**HAL**  
open science

# Valeur pronostique des IgM dans le LCR chez les patients porteurs d'une sclérose en plaques

Aurélie Siri

► **To cite this version:**

Aurélie Siri. Valeur pronostique des IgM dans le LCR chez les patients porteurs d'une sclérose en plaques. Sciences du Vivant [q-bio]. 2013. hal-01732268

**HAL Id: hal-01732268**

**<https://hal.univ-lorraine.fr/hal-01732268v1>**

Submitted on 14 Mar 2018

**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.



## AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : [ddoc-thesesexercice-contact@univ-lorraine.fr](mailto:ddoc-thesesexercice-contact@univ-lorraine.fr)

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

[http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg\\_droi.php](http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>



## **THESE**

**En vue d'obtenir le grade de**

**DOCTEUR EN MEDECINE**

Présentée et soutenue publiquement  
Dans le cadre du troisième cycle de Médecine Spécialisée

Par

**Aurélie SIRI**

Le 4 juillet 2013

**Valeur pronostique des IgM dans le LCR chez les patients porteurs  
d'une sclérose en plaques**

Examineur de la thèse :

M. H. VESPIGNANI	Professeur	Président
M. M. DEBOUVERIE	Professeur	Juge
Mme C. MALAPLATE-ARMAND	Maître de conférence	Juge
Mme C. LATARCHE	Docteur	Juge



**Président de l'Université de  
Lorraine : Professeur Pierre  
MUTZENHARDT**

**Doyen de la Faculté de Médecine  
Professeur Henry COUDANE**

**Vice-Doyen « Pédagogie » : Mme la Professeure Karine ANGIOI**  
**Vice-Doyen Mission « Sillon lorrain » : Mme la Professeure Annick  
BARBAUD**  
**Vice-Doyen Mission « Finances » : Professeur Marc BRAUN**

#### Assesseurs

- 1 <sup>er</sup> Cycle :	<b>Professeur Bruno CHENUÉL</b>
- 2 <sup>ème</sup> Cycle :	<b>Professeur Marc DEBOUVERIE</b>
- 3 <sup>ème</sup> Cycle :	<b>Professeur Jean-Pierre BRONOWICKI</b>
• « <i>DES Spécialités Médicales, Chirurgicales et Biologiques</i> »	
• « <i>DES Spécialité Médecine Générale</i> »	<b>Professeur Paolo DI PATRIZIO</b>
- Commission de Prospective Universitaire :	<b>Professeur Pierre-Edouard BOLLAERT</b>
- Développement Professionnel Continu :	<b>Professeur Jean-Dominique DE KORWIN</b>
- Filières professionnalisées :	<b>M. Walter BLONDEL</b>
- Formation Continue :	<b>Professeur Hervé VESPIGNANI</b>
- Recherche :	<b>Professeur Didier MAINARD</b>
- Relations Internationales :	<b>Professeur Jacques HUBERT</b>
- Universitarisation des études paramédicales et gestion des mono-appartenants :	<b>M. Christophe NEMOS</b>
- Vie Étudiante :	<b>Docteur Stéphane ZUILY</b>
- Vie Facultaire :	<b>Mme la Docteure Frédérique CLAUDOT</b>
- Étudiants :	<b>M. Xavier LEMARIE</b>

#### DOYENS HONORAIRES

Professeur Adrien DUPREZ - Professeur Jean-Bernard DUREUX - Professeur Jacques ROLAND - Professeur Patrick NETTER

=====

#### PROFESSEURS HONORAIRES

Jean-Marie ANDRE - Daniel ANTHOINE - Alain AUBREGE - Gérard BARROCHE - Alain BERTRAND - Pierre BEY  
 Patrick BOISSEL Jacques BORRELLY - Michel BOULANGE - Jean-Claude BURDIN - Claude BURLET - Daniel BURNEL  
 Claude CHARDOT - François CHERRIER - Jean-Pierre CRANCE - Gérard DEBRY - Jean-Pierre DELAGOUTTE  
 Emile de LAVERGNE - Jean-Pierre DESCHAMPS - Jean DUHEILLE - Adrien DUPREZ - Jean-Bernard DUREUX  
 Gérard FIEVE - Jean FLOQUET - Robert FRISCH - Alain GAUCHER - Pierre GAUCHER - Hubert GERARD  
 Jean-Marie GILGENKRANTZ - Simone GILGENKRANTZ - Oliéro GUERCI - Pierre HARTEMANN - Claude HURIET  
 Christian JANOT - Michèle KESSLER - Jacques LACOSTE - Henri LAMBERT - Pierre LANDES - Marie-Claire LAXENAIRE  
 Michel LAXENAIRE - Jacques LECLERE - Pierre LEDERLIN - Bernard LEGRAS - Jean-Pierre MALLIÉ - Michel MANCIAUX  
 Philippe MANGIN - Pierre MATHIEU - Michel MERLE - Denise MONERET-VAUTRIN - Pierre MONIN - Pierre NABET  
 Jean-Pierre NICOLAS - Pierre PAYSANT - Francis PENIN - Gilbert PERCEBOIS - Claude PERRIN - Guy PETIET  
 Luc PICARD - Michel PIERSON - Jean-Marie POLU - Jacques POUREL - Jean PREVOT - Francis RAPHAEL  
 Antoine RASPILLER - Michel RENARD - Jacques ROLAND - René-Jean ROYER - Daniel SCHMITT - Michel SCHMITT

Michel SCHWEITZER - Claude SIMON - Danièle SOMMELET - Jean-François STOLTZ - Michel STRICKER - Gilbert THIBAUT  
Augusta TREHEUX - Hubert UFFHOLTZ - Gérard VAILLANT - Paul VERT - Colette VIDAILHET - Michel VIDAILHET  
Michel WAYOFF - Michel WEBER

=====

## PROFESSEURS ÉMÉRITES

Professeur Daniel ANTHOINE - Professeur Gérard BARROCHE Professeur Pierre BEY - Professeur Patrick BOISSEL  
Professeur Michel BOULANGE - Professeur Jean-Pierre CRANCE - Professeur Jean-Pierre DELAGOUTTE  
Professeur Jean-Marie GILGENKRANTZ - Professeure Simone GILGENKRANTZ - Professeure Michèle KESSLER  
Professeur Pierre MONIN - Professeur Jean-Pierre NICOLAS - Professeur Luc PICARD - Professeur Michel PIERSON  
Professeur Michel SCHMITT - Professeur Jean-François STOLTZ - Professeur Michel STRICKER - Professeur Hubert UFFHOLTZ - Professeur Paul VERT - Professeure Colette VIDAILHET - Professeur Michel VIDAILHET - Professeur Michel WAYOFF

=====

## PROFESSEURS DES UNIVERSITÉS - PRATICIENS HOSPITALIERS

*(Disciplines du Conseil National des Universités)*

### 42<sup>ème</sup> Section : MORPHOLOGIE ET MORPHOGENÈSE

#### 1<sup>ère</sup> sous-section : *(Anatomie)*

Professeur Gilles GROSDIDIER - Professeur Marc BRAUN

#### 2<sup>ème</sup> sous-section : *(Cytologie et histologie)*

Professeur Bernard FOLIGUET

#### 3<sup>ème</sup> sous-section : *(Anatomie et cytologie pathologiques)*

Professeur François PLENAT – Professeur Jean-Michel VIGNAUD

### 43<sup>ème</sup> Section : BIOPHYSIQUE ET IMAGERIE MÉDECINE

#### 1<sup>ère</sup> sous-section : *(Biophysique et médecine nucléaire)*

Professeur Gilles KARCHER – Professeur Pierre-Yves MARIE – Professeur Pierre OLIVIER

#### 2<sup>ème</sup> sous-section : *(Radiologie et imagerie médecine)*

Professeur Denis REGENT – Professeur Michel CLAUDON – Professeure Valérie CROISÉ-LAURENT

Professeur Serge BRACARD – Professeur Alain BLUM – Professeur Jacques FELBLINGER - Professeur René ANXIONNAT

### 44<sup>ème</sup> Section : BIOCHIMIE, BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLÉCULAIRE, PHYSIOLOGIE ET NUTRITION

#### 1<sup>ère</sup> sous-section : *(Biochimie et biologie moléculaire)*

Professeur Jean-Louis GUÉANT – Professeur Jean-Luc OLIVIER – Professeur Bernard NAMOUR

#### 2<sup>ème</sup> sous-section : *(Physiologie)*

Professeur François MARCHAL – Professeur Bruno CHENUÉL – Professeur Christian BEYAERT

#### 3<sup>ème</sup> sous-section : *(Biologie Cellulaire)*

Professeur Ali DALLOUL

#### 4<sup>ème</sup> sous-section : *(Nutrition)*

Professeur Olivier ZIEGLER – Professeur Didier QUILLIOT - Professeure Rosa-Maria RODRIGUEZ-GUEANT

### 45<sup>ème</sup> Section : MICROBIOLOGIE, MALADIES TRANSMISSIBLES ET HYGIÈNE

#### 1<sup>ère</sup> sous-section : *(Bactériologie – virologie ; hygiène hospitalière)*

Professeur Alain LE FAOU - Professeur Alain LOZNIÉWSKI – Professeure Evelyne SCHVOERER

#### 3<sup>ème</sup> sous-section : *(Maladies infectieuses ; maladies tropicales)*

Professeur Thierry MAY – Professeur Christian RABAUD

### 46<sup>ème</sup> Section : SANTÉ PUBLIQUE, ENVIRONNEMENT ET SOCIÉTÉ

#### 1<sup>ère</sup> sous-section : *(Épidémiologie, économie de la santé et prévention)*

Professeur Philippe HARTEMANN – Professeur Serge BRIANÇON - Professeur Francis GUILLEMIN

Professeur Denis ZMIROU-NAVIER – Professeur François ALLA

#### 2<sup>ème</sup> sous-section : *(Médecine et santé au travail)*

Professeur Christophe PARIS

#### 3<sup>ème</sup> sous-section : *(Médecine légale et droit de la santé)*

Professeur Henry COUDANE

**4<sup>ème</sup> sous-section : (Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication)**

Professeur François KOHLER – Professeure Eliane ALBUISSON

**47<sup>ème</sup> Section : CANCÉROLOGIE, GÉNÉTIQUE, HÉMATOLOGIE, IMMUNOLOGIE**

**1<sup>ère</sup> sous-section : (Hématologie ; transfusion)**

Professeur Pierre BORDIGONI - Professeur Pierre FEUGIER - Professeure Marie-Christine BENE

**2<sup>ème</sup> sous-section : (Cancérologie ; radiothérapie)**

Professeur François GUILLEMIN – Professeur Thierry CONROY - Professeur Didier PEIFFERT

Professeur Frédéric MARCHAL

**3<sup>ème</sup> sous-section : (Immunologie)**

Professeur Gilbert FAURE

**4<sup>ème</sup> sous-section : (Génétique)**

Professeur Philippe JONVEAUX – Professeur Bruno LEHEUP

**48<sup>ème</sup> Section : ANESTHÉSIOLOGIE, RÉANIMATION, MÉDECINE D'URGENCE, PHARMACOLOGIE ET THÉRAPEUTIQUE**

**1<sup>ère</sup> sous-section : (Anesthésiologie - réanimation ; médecine d'urgence)**

Professeur Claude MEISTELMAN – Professeur Hervé BOUAZIZ - Professeur Gérard AUDIBERT

Professeur Thomas FUCHS-BUDER – Professeure Marie-Reine LOSSER

**2<sup>ème</sup> sous-section : (Réanimation ; médecine d'urgence)**

Professeur Alain GERARD - Professeur Pierre-Édouard BOLLAERT - Professeur Bruno LÉVY – Professeur Sébastien GIBOT

**3<sup>ème</sup> sous-section : (Pharmacologie fondamentale ; pharmacologie clinique ; addictologie)**

Professeur Patrick NETTER – Professeur Pierre GILLET

**4<sup>ème</sup> sous-section : (Thérapeutique ; médecine d'urgence ; addictologie)**

Professeur François PAILLE – Professeur Faïez ZANNAD - Professeur Patrick ROSSIGNOL

**49<sup>ème</sup> Section : PATHOLOGIE NERVEUSE ET MUSCULAIRE, PATHOLOGIE MENTALE, HANDICAP ET RÉÉDUCATION**

**1<sup>ère</sup> sous-section : (Neurologie)**

Professeur Hervé VESPIGNANI - Professeur Xavier DUCROCQ – Professeur Marc DEBOUVERIE

Professeur Luc TAILLANDIER - Professeur Louis MAILLARD

**2<sup>ème</sup> sous-section : (Neurochirurgie)**

Professeur Jean-Claude MARCHAL – Professeur Jean AUQUE – Professeur Olivier KLEIN

Professeur Thierry CIVIT - Professeure Sophie COLNAT-COULBOIS

**3<sup>ème</sup> sous-section : (Psychiatrie d'adultes ; addictologie)**

Professeur Jean-Pierre KAHN – Professeur Raymund SCHWAN

**4<sup>ème</sup> sous-section : (Pédopsychiatrie ; addictologie)**

Professeur Daniel SIBERTIN-BLANC – Professeur Bernard KABUTH

**5<sup>ème</sup> sous-section : (Médecine physique et de réadaptation)**

Professeur Jean PAYSANT

**50<sup>ème</sup> Section : PATHOLOGIE OSTÉO-ARTICULAIRE, DERMATOLOGIE ET CHIRURGIE PLASTIQUE**

**1<sup>ère</sup> sous-section : (Rhumatologie)**

Professeure Isabelle CHARY-VALCKENAERE – Professeur Damien LOEUILLE

**2<sup>ème</sup> sous-section : (Chirurgie orthopédique et traumatologique)**

Professeur Daniel MOLE - Professeur Didier MAINARD - Professeur François SIRVEAUX – Professeur Laurent GALOIS

**3<sup>ème</sup> sous-section : (Dermato-vénéréologie)**

Professeur Jean-Luc SCHMUTZ – Professeure Annick BARBAUD

**4<sup>ème</sup> sous-section : (Chirurgie plastique, reconstructrice et esthétique ; brûlologie)**

Professeur François DAP - Professeur Gilles DAUTEL - Professeur Etienne SIMON

**51<sup>ème</sup> Section : PATHOLOGIE CARDIO-RESPIRATOIRE ET VASCULAIRE**

**1<sup>ère</sup> sous-section : (Pneumologie ; addictologie)**

Professeur Yves MARTINET – Professeur Jean-François CHABOT – Professeur Ari CHAOUAT

**2<sup>ème</sup> sous-section : (Cardiologie)**

Professeur Etienne ALIOT – Professeur Yves JUILLIERE

Professeur Nicolas SADOUL - Professeur Christian de CHILLOU DE CHURET

**3<sup>ème</sup> sous-section : (Chirurgie thoracique et cardiovasculaire)**

Professeur Jean-Pierre VILLEMOT – Professeur Thierry FOLLIGUET

**4<sup>ème</sup> sous-section : (Chirurgie vasculaire ; médecine vasculaire)**

Professeur Denis WAHL – Professeur Sergueï MALIKOV

**52<sup>ème</sup> Section : MALADIES DES APPAREILS DIGESTIF ET URINAIRE**

**1<sup>ère</sup> sous-section : (Gastroentérologie ; hépatologie ; addictologie)**

Professeur Marc-André BIGARD - Professeur Jean-Pierre BRONOWICKI – Professeur Laurent PEYRIN-BIROULET

**3<sup>ème</sup> sous-section : (Néphrologie)**

Professeure Dominique HESTIN – Professeur Luc FRIMAT

**4<sup>ème</sup> sous-section : (Urologie)**

Professeur Jacques HUBERT – Professeur Pascal ESCHWEGE

**53<sup>ème</sup> Section : MÉDECINE INTERNE, GÉRIATRIE ET CHIRURGIE GÉNÉRALE**

**1<sup>ère</sup> sous-section : (Médecine interne ; gériatrie et biologie du vieillissement ; médecine générale ; addictologie)**

Professeur Jean-Dominique DE KORWIN – Professeur Pierre KAMINSKY - Professeur Athanase BENETOS  
Professeure Gisèle KANNY – Professeure Christine PERRET-GUILLAUME

**2<sup>ème</sup> sous-section : (Chirurgie générale)**

Professeur Laurent BRESLER - Professeur Laurent BRUNAUD – Professeur Ahmet AYAV

**54<sup>ème</sup> Section : DÉVELOPPEMENT ET PATHOLOGIE DE L'ENFANT, GYNÉCOLOGIE-OBSTÉTRIQUE, ENDOCRINOLOGIE ET REPRODUCTION**

**1<sup>ère</sup> sous-section : (Pédiatrie)**

Professeur Jean-Michel HASCOET - Professeur Pascal CHASTAGNER - Professeur François FEILLET  
Professeur Cyril SCHWEITZER – Professeur Emmanuel RAFFO

**2<sup>ème</sup> sous-section : (Chirurgie infantile)**

Professeur Pierre JOURNEAU – Professeur Jean-Louis LEMELLE

**3<sup>ème</sup> sous-section : (Gynécologie-obstétrique ; gynécologie médicale)**

Professeur Jean-Louis BOUTROY - Professeur Philippe JUDLIN

**4<sup>ème</sup> sous-section : (Endocrinologie, diabète et maladies métaboliques ; gynécologie médicale)**

Professeur Georges WERYHA – Professeur Marc KLEIN – Professeur Bruno GUERCI

**55<sup>ème</sup> Section : PATHOLOGIE DE LA TÊTE ET DU COU**

**1<sup>ère</sup> sous-section : (Oto-rhino-laryngologie)**

Professeur Roger JANKOWSKI – Professeure Cécile PARIETTI-WINKLER

**2<sup>ème</sup> sous-section : (Ophtalmologie)**

Professeur Jean-Luc GEORGE – Professeur Jean-Paul BERROD – Professeure Karine ANGIOI

**3<sup>ème</sup> sous-section : (Chirurgie maxillo-faciale et stomatologie)**

Professeur Jean-François CHASSAGNE – Professeure Muriel BRIX

=====

**PROFESSEURS DES UNIVERSITÉS**

**61<sup>ème</sup> Section : GÉNIE INFORMATIQUE, AUTOMATIQUE ET TRAITEMENT DU SIGNAL**

Professeur Walter BLONDEL

**64<sup>ème</sup> Section : BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE**

Professeure Sandrine BOSCHI-MULLER

=====

**PROFESSEURS DES UNIVERSITÉS DE MÉDECINE GÉNÉRALE**

Professeur Jean-Marc BOIVIN

**PROFESSEUR ASSOCIÉ DE MÉDECINE GÉNÉRALE**

Professeur associé Paolo DI PATRIZIO

=====

**MAÎTRES DE CONFÉRENCES DES UNIVERSITÉS - PRATICIENS HOSPITALIERS**

**42<sup>ème</sup> Section : MORPHOLOGIE ET MORPHOGENÈSE**

**1<sup>ère</sup> sous-section : (Anatomie)**

Docteur Bruno GRIGNON – Docteur Thierry HAUMONT – Docteure Manuela PEREZ



**2<sup>ème</sup> sous-section : (Cytologie et histologie)**

Docteur Edouard BARRAT - Docteure Françoise TOUATI – Docteure Chantal KOHLER

**3<sup>ème</sup> sous-section : (Anatomie et cytologie pathologiques)**

Docteure Aude MARCHAL

**43<sup>ème</sup> Section : BIOPHYSIQUE ET IMAGERIE MÉDECINE**

**1<sup>ère</sup> sous-section : (Biophysique et médecine nucléaire)**

Docteur Jean-Claude MAYER - Docteur Jean-Marie ESCANYE

**2<sup>ème</sup> sous-section : (Radiologie et imagerie médecine)**

Docteur Damien MANDRY

**44<sup>ème</sup> Section : BIOCHIMIE, BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLÉCULAIRE, PHYSIOLOGIE ET NUTRITION**

**1<sup>ère</sup> sous-section : (Biochimie et biologie moléculaire)**

Docteure Sophie FREMONT - Docteure Isabelle GASTIN – Docteur Marc MERTEN

Docteure Catherine MALAPLATE-ARMAND - Docteure Shyue-Fang BATTAGLIA

**2<sup>ème</sup> sous-section : (Physiologie)**

Docteur Mathias POUSSEL – Docteure Silvia VARECHOVA

**3<sup>ème</sup> sous-section : (Biologie Cellulaire)**

Docteure Véronique DECOT-MAILLERET

**45<sup>ème</sup> Section : MICROBIOLOGIE, MALADIES TRANSMISSIBLES ET HYGIÈNE**

**1<sup>ère</sup> sous-section : (Bactériologie – Virologie ; hygiène hospitalière)**

Docteure Véronique VENARD – Docteure Hélène JEULIN – Docteure Corentine ALAUZET

**2<sup>ème</sup> sous-section : (Parasitologie et mycologie)**

Madame Marie MACHOUART

**46<sup>ème</sup> Section : SANTÉ PUBLIQUE, ENVIRONNEMENT ET SOCIÉTÉ**

**1<sup>ère</sup> sous-section : (Epidémiologie, économie de la santé et prévention)**

Docteur Alexis HAUTEMANIÈRE – Docteure Frédérique CLAUDOT – Docteur Cédric BAUMANN

**2<sup>ème</sup> sous-section (Médecine et Santé au Travail)**

Docteure Isabelle THAON

**3<sup>ème</sup> sous-section (Médecine légale et droit de la santé)**

Docteur Laurent MARTRILLE

**4<sup>ère</sup> sous-section : (Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication)**

Docteur Nicolas JAY

**47<sup>ème</sup> Section : CANCÉROLOGIE, GÉNÉTIQUE, HÉMATOLOGIE, IMMUNOLOGIE**

**2<sup>ème</sup> sous-section : (Cancérologie ; radiothérapie : oncologie (type mixte : biologique))**

Docteure Lina BOLOTINE

**3<sup>ème</sup> sous-section : (Immunologie)**

Docteur Marcelo DE CARVALHO BITTENCOURT

**4<sup>ème</sup> sous-section : (Génétique)**

Docteur Christophe PHILIPPE – Docteure Céline BONNET

**48<sup>ème</sup> Section : ANESTHÉSIOLOGIE, RÉANIMATION, MÉDECINE D'URGENCE, PHARMACOLOGIE ET THÉRAPEUTIQUE**

**3<sup>ème</sup> sous-section : (Pharmacologie fondamentale ; pharmacologie clinique)**

Docteure Françoise LAPICQUE – Docteur Nicolas GAMBIER – Docteur Julien SCALA-BERTOLA

**50<sup>ème</sup> Section : PATHOLOGIE OSTÉO-ARTICULAIRE, DERMATOLOGIE ET CHIRURGIE PLASTIQUE**

**1<sup>ère</sup> sous-section : (Rhumatologie)**

Docteure Anne-Christine RAT

**3<sup>ème</sup> sous-section : (Dermato-vénéréologie)**

Docteure Anne-Claire BURSZEJN

**4<sup>ème</sup> sous-section : (Chirurgie plastique, reconstructrice et esthétique ; brûlologie)**

Docteure Laetitia GOFFINET-PLEUTRET

**51<sup>ème</sup> Section : PATHOLOGIE CARDIO-RESPIRATOIRE ET VASCULAIRE**

**4<sup>ème</sup> sous-section : (Chirurgie vasculaire ; médecine vasculaire)**

Docteur Stéphane ZUILY

**53<sup>ème</sup> Section : MÉDECINE INTERNE, GÉRIATRIE et CHIRURGIE GÉNÉRALE**

**1<sup>ère</sup> sous-section : (Médecine interne ; gériatrie et biologie du vieillissement ; médecine générale ; addictologie)**  
Docteure Laure JOLY

**54<sup>ème</sup> Section : DÉVELOPPEMENT ET PATHOLOGIE DE L'ENFANT, GYNÉCOLOGIE-OBSTÉTRIQUE, ENDOCRINOLOGIE ET REPRODUCTION**

**3<sup>ème</sup> sous-section :**  
Docteur Olivier MOREL

**5<sup>ème</sup> sous-section : (Biologie et médecine du développement et de la reproduction ; gynécologie médicale)**  
Docteur Jean-Louis CORDONNIER

=====

**MAÎTRE DE CONFÉRENCE DES UNIVERSITÉS DE MÉDECINE GÉNÉRALE**  
Docteure Elisabeth STEYER

=====

**MAÎTRES DE CONFÉRENCES**

**5<sup>ème</sup> Section : SCIENCES ÉCONOMIQUES**  
Monsieur Vincent LHUILLIER

**19<sup>ème</sup> Section : SOCIOLOGIE, DÉMOGRAPHIE**  
Madame Joëlle KIVITS

**40<sup>ème</sup> Section : SCIENCES DU MÉDICAMENT**  
Monsieur Jean-François COLLIN

**60<sup>ème</sup> Section : MÉCANIQUE, GÉNIE MÉCANIQUE, GÉNIE CIVIL**  
Monsieur Alain DURAND

**61<sup>ème</sup> Section : GÉNIE INFORMATIQUE, AUTOMATIQUE ET TRAITEMENT DU SIGNAL**  
Monsieur Jean REBSTOCK

**64<sup>ème</sup> Section : BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE**  
Madame Marie-Claire LANHERS – Monsieur Pascal REBOUL – Monsieur Nick RAMALANJAONA

**65<sup>ème</sup> Section : BIOLOGIE CELLULAIRE**  
Madame Françoise DREYFUSS – Monsieur Jean-Louis GELLY - Madame Ketsia HESS – Monsieur Hervé MEMBRE  
Monsieur Christophe NEMOS - Madame Natalia DE ISLA - Madame Nathalie MERCIER – Madame Céline HUSELSTEIN

**66<sup>ème</sup> Section : PHYSIOLOGIE**  
Monsieur Nguyen TRAN

=====

**MAÎTRES DE CONFÉRENCES ASSOCIÉS**  
**Médecine Générale**

Docteure Sophie SIEGRIST - Docteur Arnaud MASSON - Docteur Pascal BOUCHE

=====

## DOCTEURS HONORIS CAUSA

Professeur Charles A. BERRY (1982)  
*Centre de Médecine Préventive, Houston (U.S.A)*  
Professeur Pierre-Marie GALETTI (1982)  
*Brown University, Providence (U.S.A)*  
Professeure Mildred T. STAHLMAN (1982)  
*Vanderbilt University, Nashville (U.S.A)*  
Professeur Théodore H. SCHIEBLER (1989)  
*Institut d'Anatomie de Würzburg (R.F.A)*  
*Université de Pennsylvanie (U.S.A)*  
Professeur Mashaki KASHIWARA (1996)  
*Research Institute for Mathematical Sciences de  
Kyoto (JAPON)*

Professeure Maria DELIVORIA-  
PAPADOPOULOS (1996)  
Professeur Ralph GRÄSBECK (1996)  
*Université d'Helsinki (FINLANDE)*  
Professeur James STEICHEN (1997)  
*Université d'Indianapolis (U.S.A)*  
Professeur Duong Quang TRUNG (1997)  
*Université d'Hô Chi Minh-Ville (VIËTNAM)*  
Professeur Daniel G. BICHET (2001)  
*Université de Montréal (Canada)*  
Professeur Marc LEVENSTON (2005)  
*Institute of Technology, Atlanta (USA)*

Professeur Brian BURCHELL (2007)  
*Université de Dundee (Royaume-Uni)*  
Professeur Yunfeng ZHOU (2009)  
*Université de Wuhan (CHINE)*  
Professeur David ALPERS (2011)  
*Université de Washington (U.S.A)*  
Professeur Martin EXNER (2012)  
*Université de Bonn (ALLEMAGNE)*

## **REMERCIEMENTS**

**A Monsieur le Professeur Hervé Vespignani,  
Professeur de Neurologie  
Chevalier de l'Ordre des Palmes Académiques**

**Pour nous avoir fait l'honneur de présider cette thèse.  
Pour votre accueil bienveillant au sein de votre service et  
la confiance que vous nous avez témoignée au cours de notre formation  
Veuillez trouver ici l'expression de notre reconnaissance et de notre profond respect.**

**A Monsieur le Professeur Marc Debouverie,  
Professeur de Neurologie**

**Pour nous avoir confié ce travail audacieux.  
Pour avoir construit les bases indispensables à sa réalisation.  
Pour votre disponibilité, votre dynamisme et vos conseils,  
Veuillez trouver ici l'expression de notre reconnaissance et notre profond respect.**

**A Madame le Docteur Catherine Malaplate-Armand,  
Maitre de conférences Universitaire en Biochimie et Biologie Moléculaire**

**Pour votre soutien, votre disponibilité et votre patience.  
Ainsi que vos nombreux conseils lors de la rédaction de ce manuscrit.  
Veuillez trouver ici le témoignage de notre reconnaissance et de notre profond respect.**

**A Madame Clotilde Latarche,  
Docteur en médecine**

**Pour avoir eu la gentillesse de faire partie de notre jury.  
Pour votre disponibilité et votre patience lors des différents travaux de recherche.  
Veuillez trouver ici l'expression de notre reconnaissance et de notre profond respect.**

**A Viviane Camaetti**

**Technicienne de laboratoire**

**Pour ton aide précieuse, ta patience et ton enthousiasme.**

**A l'ensemble du personnel du laboratoire de Biochimie et Biologie Moléculaire**

**Pour votre accueil chaleureux et votre soutien.**

**A Marc Derive et son équipe**

**Pour avoir mis à notre disposition le matériel nécessaire  
à la mise au point du protocole pour les BOM**



**Au service de neuroradiologie du Pr Bracard ainsi qu'au service de neurologie du Pr Labauge**

**Pour votre accueil et la qualité de votre enseignement**

**Au docteur Louis, Pittion, Gospodaru, Sauvée, praticiens hospitaliers et professeurs de neurologie**

**Pour avoir su transmettre vos connaissances avec enthousiasme.**

**Au docteur Taillandier et Pinelli ainsi qu'à l'équipe de neurologie du 4B**

**Pour votre professionnalisme et le réconfort que vous avez su apporter à ma grand-mère.**

**Veillez trouver ici l'expression de ma profonde gratitude.**

**Aux infirmières, aides soignantes, ainsi que l'ensemble du personnel du service de neurologie**

**Pour votre disponibilité, votre enthousiasme.**

**A mes co-internes**

**A mes parents, pour m'avoir permis de réaliser ces études.**

**A mes grands-parents, pour votre affection et votre soutien tout au long de ces années.**

**A mon frère, pour ton soutien, ta patience et tes conseils toujours avisés.**

**A Philippe, pour toutes ces qualités qui te caractérisent. Merci.**

**A mes amis, pour votre amitié ainsi que votre présence indéfectible. Un grand merci.**

**A tout le reste de ma famille.**

*A ma mère,*

## SERMENT

*"Au moment d'être admise à exercer la médecine, je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité. Mon premier souci sera de rétablir, de préserver ou de promouvoir la santé dans tous ses éléments, physiques et mentaux, individuels et sociaux. Je respecterai toutes les personnes, leur autonomie et leur volonté, sans aucune discrimination selon leur état ou leurs convictions. J'interviendrai pour les protéger si elles sont affaiblies, vulnérables ou menacées dans leur intégrité ou leur dignité. Même sous la contrainte, je ne ferai pas usage de mes connaissances contre les lois de l'humanité. J'informerai les patients des décisions envisagées, de leurs raisons et de leurs conséquences. Je ne tromperai jamais leur confiance et n'exploiterai pas le pouvoir hérité des circonstances pour forcer les consciences. Je donnerai mes soins à l'indigent et à quiconque me les demandera. Je ne me laisserai pas influencer par la soif du gain ou la recherche de la gloire.*

*Admise dans l'intimité des personnes, je tairai les secrets qui me sont confiés. Reçue à l'intérieur des maisons, je respecterai les secrets des foyers et ma conduite ne servira pas à corrompre les mœurs. Je ferai tout pour soulager les souffrances. Je ne prolongerai pas abusivement les agonies. Je ne provoquerai jamais la mort délibérément.*

*Je préserverai l'indépendance nécessaire à l'accomplissement de ma mission. Je n'entreprendrai rien qui dépasse mes compétences. Je les entretiendrai et les perfectionnerai pour assurer au mieux les services qui me seront demandés.*

*J'apporterai mon aide à mes confrères ainsi qu'à leurs familles dans l'adversité.*

*Que les hommes et mes confrères m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses ; que je sois déshonorée et méprisée si j'y manque".*

## TABLE DES MATIERES

### ABREVIATIONS

<b>1. GENERALITES SUR LA SCLEROSE EN PLAQUES (SEP)</b> .....	<b>21</b>
<b>2. INTERET DU LCR ET DU PROFIL IgG DANS LA SEP</b> .....	<b>24</b>
2.1. Le LCR en conditions physiologiques.....	24
2.2. Problématique du dosage des Ig en condition physiologique et pathologique.....	26
2.3. Intérêt de la détection d'une synthèse intrathécale d'Ig dans la SEP.....	28
2.4. Spécificité antigénique de cette production d'Ig .....	30
2.5. Problématique des bandes oligoclonales IgG dans la SEP .....	31
2.6. Analyse du LCR dans la SEP .....	33
<b>3. LYMPHOCYTES B ET SEP</b> .....	<b>34</b>
3.1. Rappel sur les immunoglobulines .....	34
3.2. Rappel immunologique sur les lymphocytes B .....	35
3.3. Rôle des immunoglobulines .....	35
3.4. Sous-type particulier de LB.....	40
3.5. Rôle des LB dans la SEP .....	43
<b>4. RESUME DE L'IMPLICATION DES LB DANS LA PHYSIOPATHOLOGIE DE LA SEP</b> .....	<b>45</b>
<b>5. IgM ET SEP</b> .....	<b>47</b>
5.1. Premiers travaux mettant en évidence l'implication des IgM dans la SEP .....	47
5.2. Les IgM anti-lipides.....	49
5.3. Profils IgM anti-lipides et atrophie cérébrale.....	54
5.4. Profils IgM anti-lipides et CIS.....	55
5.5. Profils IgM anti-lipides et génétique .....	55
5.6. Intérêt de l'index IgM .....	56
5.7. Les détracteurs .....	58
5.8. Vers un index pronostique multifactoriel ?.....	60
5.9. Les perspectives : une meilleure compréhension de la pathologie ? .....	61
<b>6. ENJEUX ET OBJECTIFS DU TRAVAIL</b> .....	<b>64</b>
<b>7. MATERIELS ET METHODE</b> .....	<b>65</b>
7.1. Méthodologie clinique : sélection des patients .....	65
7.2. Méthodologie biologique .....	67
7.2.1. Prélèvements et traitement pré-analytique .....	67
7.2.2. Immunodosages .....	67

7.2.3. Calcul des index IgG et IgM .....	68
7.3. Analyse statistique .....	68
<b>8. RESULTATS .....</b>	<b>70</b>
8.1. Description de la population étudiée.....	70
8.2. Etude des index IgM .....	73
8.3. Etude de la corrélation de l'EDSS en fonction de l'index IgG et IgM .....	74
8.4. Etude de la corrélation entre index IgM et intervalle entre la 1 <sup>ère</sup> et 2 <sup>nde</sup> poussée .....	74
8.5. Etude de la corrélation entre l'index IgM et le nombre de poussées .....	75
8.6. Recherche de profils oligoclonaux d'IgM dans le LCR par isoélectrofocalisation .....	76
<b>9. DISCUSSION .....</b>	<b>77</b>
<b>10. PERSPECTIVES .....</b>	<b>82</b>
<b>11. CONCLUSION .....</b>	<b>83</b>
<b>12. BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>84</b>
<b>13. ANNEXES .....</b>	<b>98</b>

## ABREVIATIONS

AH : haplotype ancestraux  
BHE : Barrière hémato-encéphalique  
BOC : bandes oligoclonales  
BOG : Bandes oligoclonales intrathécale d'IgG  
BOM : Bandes oligoclonales intrathécale d'IgM  
CIS : Syndrome cliniquement isolé  
EAE : Encéphalite aigue expérimentale  
Ig : Immunoglobuline  
IgG : Immunoglobuline de type G  
IgM : Immunoglobuline de type M  
IRM : Imagerie par résonance magnétique  
LB : Lymphocyte B  
LCR : Liquide céphalo-rachidien  
LT : Lymphocyte T  
PL : ponction lombaire  
RIS : Syndrome radiologiquement isolé  
SEP : Sclérose en plaques  
SEP-PP : Sclérose en plaques primaire progressive  
SEP-RR : Sclérose en plaques récurrente rémittente  
SEP-SP : Sclérose en plaques secondairement progressive  
SNC : Système nerveux central  
TNF $\alpha$  : tumor necrosis factor alpha  
VCAM-1 : Vascular cell adhesion protein 1

## 1. GENERALITES SUR LA SCLEROSE EN PLAQUES (SEP)

La sclérose en plaques (SEP) est une maladie inflammatoire du système nerveux central (SNC) dont l'étiologie reste à définir. Elle affecte 23 millions de personnes dans le monde et est la première cause de handicap non traumatique chez les adultes jeunes (<50 ans) en Europe (Pugliatti M and al, 2006).

Cette maladie neurologique chronique dépendant de façon préférentielle des lymphocytes T (LT) est causée par une réaction auto-immune spécifiquement dirigée contre des antigènes du SNC, notamment des composants de la myéline (Sospedra and Martin, 2005). L'atteinte axonale associée à la mort neuronale, est également visible au travers de l'atrophie cérébrale et des troubles cognitifs propres à cette pathologie (Riccitelli G and al., 2012).

Elle tire son nom des lésions dures (scléreuses), ou plaques, qui se développent dans la substance blanche du SNC. Ces lésions visibles en hypersignal Flair attestent de l'atteinte de la myéline ainsi que des infiltrats inflammatoires (lymphocytes et macrophages) réhaussés après injection de Gadolinium pour les lésions dites « actives ». Leur lien avec le système immunitaire périphérique est expliqué en partie par la proximité des lésions avec le système vasculaire de type capillaire (Young NP. and al., 2010 ; Sinnecker T. and al., 2013).

Sur le plan immunologique, des LT CD4 activés, autoréactifs pour des antigènes du SNC présents au niveau sérique, expriment l'intégrine  $\alpha 4\beta 1$ . Cette intégrine leur permet de se lier à une molécule d'adhésion (Vascular cell adhesion protein 1 (VCAM-1)) présente à la surface des cellules endothéliales tapissant la barrière hémato-encéphalique (BHE) et exprimée sous l'influence de l'environnement inflammatoire localement au niveau du SNC. Ces LT peuvent ainsi traverser la BHE et rencontrent à nouveau leurs auto-antigènes présentés par les molécules du CMHII exprimées à la surface des cellules microgliales. Cette rencontre engendre la libération de cytokines pro-inflammatoires (IFN- $\gamma$ , IL-17...) responsables de l'amplification de la réaction inflammatoire altérant la BHE, favorisant ainsi le recrutement d'autres cellules du SI en particulier des LB et LT naïfs (Sospedra and Martin, 2005). Nous ne connaissons pas les mécanismes initiaux de la pathologie, en particulier le



mécanisme responsable de l'activation de LT auto-réactifs à des antigènes du soi exprimé au sein du SNC alors que ceux-ci sont présents en périphérie.

L'étude des mécanismes immunologiques au sein du SNC restent également difficiles à étudier devant la grande plasticité cellulaire des populations microgliales et des monocytes/macrophages issus du SI périphérique. De plus, les études fonctionnelles in vivo sont limitées, dans ce sens, le liquide céphalo-rachidien (LCR) constitue la seule voie d'abord possible du SNC.

De façon plus générale, on isole deux mécanismes distincts : l'inflammation d'un part, caractérisée par les poussées, et la progression du handicap d'autre part, en lien avec la perte axonale présente très probablement dès les premiers temps de la maladie et évoluant pour son propre compte, influencée plus ou moins directement par les mécanismes inflammatoires. Les traitements actuellement disponibles n'agissent que sur les manifestations de type inflammatoire de la maladie. Dans ce sens, le débat reste ouvert concernant l'influence de ces thérapeutiques sur la progression du handicap (Figueira ANN 20113).

Sur le plan clinique, on caractérise 4 formes cliniques de SEP. La forme **rémittente-récurrente (SEP-RR)**, intéressant 85% des patients au début de la pathologie, où des poussées sont objectivées, suivies d'une récupération complète ou quasi-complète. Plus rarement, des formes **transitionnelles** sont observées (5%), caractérisées par une poussée initiale suivie d'une évolution progressive. La forme **secondairement progressive (SEP-SP)**, où des poussées peuvent persister sur fond de progression du handicap (**progressive récurrente**). Cette forme survient après une forme rémittente dans un délai variable selon les individus ou plus rarement d'emblée comme c'est le cas dans la forme **primaire progressive (SEP-PP)** (10 %) (Fig.1)

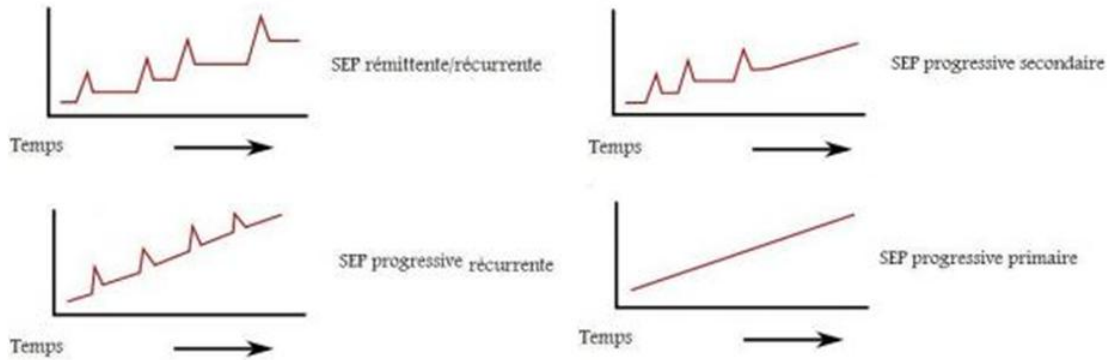


Figure 1: Différentes formes cliniques de SEP

Les facteurs sous-jacents ne sont pas complètement élucidés mais cette hétérogénéité semble être le résultat d'interactions complexes entre le fond génétique des patients, l'environnement et des infections virales chroniques. Le système immunitaire joue un rôle prépondérant dans cette variabilité clinique, en partie certainement par le déséquilibre entre les mécanismes effecteurs (cellules pro-inflammatoires) et suppresseurs des réponses immunes (cellules régulatrices) (Sospedra and Martin, 2005).

Actuellement, nous sommes en mesure d'agir sur la première phase de la pathologie *via* l'utilisation de traitements ayant une action immunosuppressive ou immuno-modulatrice. La phase progressive reste sans recours thérapeutique et est difficile à étudier du fait de sa localisation intracérébrale pure (évolution indépendante du SI périphérique).

Depuis 1965, les critères diagnostiques ont évolué. En 2010, les critères de Mac Donald ont été révisés, apportant quelques nuances aux critères de 2005 largement utilisés dans les essais cliniques et faisant référence dans les AMM des différents traitements.

Le diagnostic repose toujours sur des critères de dissémination spatiale (lésions anatomiquement distinctes) et temporelle (lésions séparées dans le temps) pouvant être issus de éléments cliniques ou radiologiques, l'imagerie occupant une place plus importante dans ces nouveaux critères diagnostiques de 2010 (Polman CH and al, 2005 ; Polman CH and al., 2011).

Les données biologiques sériques permettent d'éliminer les diagnostics différentiels à évoquer devant ce phénotype radio-clinique.

Le LCR, au travers de la recherche de bandes oligoclonales IgG (BOG), apporte un argument fort en faveur d'une SEP mais n'est en rien pathognomonique. De nombreux travaux de recherche ont été conduits sur le LCR, à la recherche de biomarqueurs permettant de définir un risque évolutif de la SEP ou des marqueurs de réponse thérapeutique, mais sans succès, à l'exception de (CXCL13), une chimiokine impliquée dans les aspects inflammatoires de la SEP *via* son rôle chemo-attractif sur les lymphocytes B (LB) (Khademi M. and al., 2011), et des neurofilaments, composant neuro-axonal et dans ce sens, reflet du handicap au long cours (Gunnarsson M. and al., 2011).

## **2. INTERET DU LCR ET DU PROFIL IgG DANS LA SEP**

L'étude du LCR, même s'il n'est plus indispensable pour poser le diagnostic de SEP, reste de pratique courante et est surtout intéressante dans un cadre de CIS ou RIS (syndrome cliniquement ou radiologiquement isolé) en permettant de définir par la présence ou non de BOG, un risque d'évolution vers une SEP cliniquement définie (Tintoré M. and al., 2008 ; David H Miller and al., 2012).

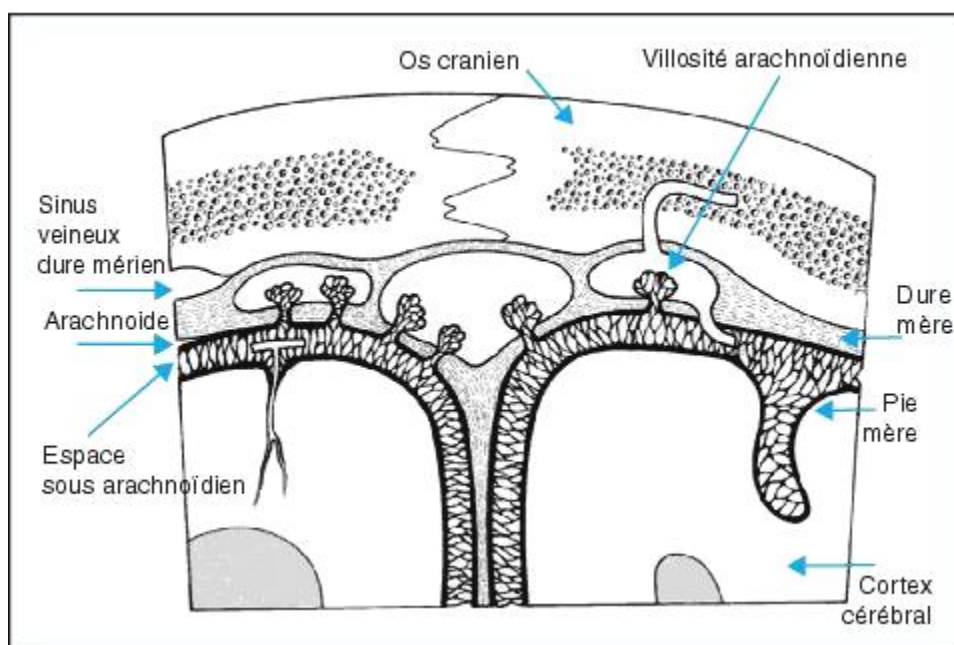
### **2.1. Le LCR en conditions physiologiques**

Le LCR est produit essentiellement au niveau des plexus choroïdes situés au niveau des ventricules cérébraux. Les vaisseaux sanguins intracérébraux et le parenchyme cérébral participent de façon beaucoup moins importante à l'élaboration du LCR. Le LCR passe des ventricules aux citernes et espaces arachnoïdiens péri-cérébraux et péri-médullaires pour se déverser finalement dans le système veineux, aux travers des villosités arachnoïdiennes, appelées granulations de Pacchioni, situées au niveau du sinus supérieur et de la moelle (Fig. 2).

La production de LCR varie avec l'âge : elle est de l'ordre de 500 ml/j chez l'adulte jeune (0,4 ml/min) et chute à 250 ml/j chez le sujet âgé (0,19 ml/min) (Reiber H and al., 2003). Le LCR se déplace sous l'influence d'une force qui résulte d'un gradient de pression artéri-

veineuse. Ce gradient varie naturellement avec l'âge expliquant les variations de flux. Le flux de LCR peut être diminué suite à une diminution de sa production, une baisse du flux dans l'espace sous arachnoïdien ou un obstacle à l'écoulement dans les villosités arachnoïdiennes (Reiber H. and Peter JB., 2001 ; Reiber H. and al., 2003).

En l'absence de pathologie susceptible d'altérer le flux direct du LCR, sa concentration en protéines est approximativement 200 fois plus faible que celle du plasma. Cette composition se modifie en permanence lors du trajet du LCR au niveau cérébral et péri-médullaire (Reiber H and al., 2003). La composition du LCR résulte à la fois d'une sécrétion active par l'épithélium des plexus choroïdes et d'une filtration des protéines plasmatiques à travers des cellules endothéliales des capillaires des plexus choroïdes. Les protéines d'origine cérébrale diffusent également du SNC vers le LCR mais la majorité des protéines du LCR comme l'albumine et les immunoglobulines sont transsudées à partir du sang. Les différences observées au niveau des concentrations du LCR en albumine et en immunoglobulines s'expliquent par la différence entre leur poids moléculaires et leurs tailles qui modifient leur coefficient de diffusion (Reiber H and al., 1994 ; Reiber H and al., 2003 ; Reiber H and al., 2001).



**Figure 2** : Résorption du LCR au niveau des villosités arachnoïdiennes qui se projettent dans les sinus veineux dure-mériens (d'après D. Hasboun, Enseignement de Neuroanatomie, Université Pierre et Marie Curie).

## 2.2. Problématique du dosage des Ig en condition physiologique et pathologique

Le gradient sang/LCR régissant la concentration d'albumine et d'Ig au sein du LCR est influencé par différents paramètres physiques (taille des molécules, concentration sérique/LCR de la molécule d'intérêt, perméabilité de la BHE) et biologiques (paramètres médicaux influençant l'état de la BHE et/ou la concentration sérique/LCR de chacun des composants d'intérêt).

La théorie établie par Reiber sur les bases de données expérimentales met en relation le QIgG (IgG LCR/IgG sérique) et Qalbumine (albumine LCR/albumine sérique). L'index IgG a été proposé en 1977 (Tibbling G and al., 1977), il s'agit du rapport entre QIgG et Qalbumine.

$$\text{Index IgG} = (\text{IgG LCR/IgG sérum}) / (\text{Albumine LCR/Albumine Sérum})$$

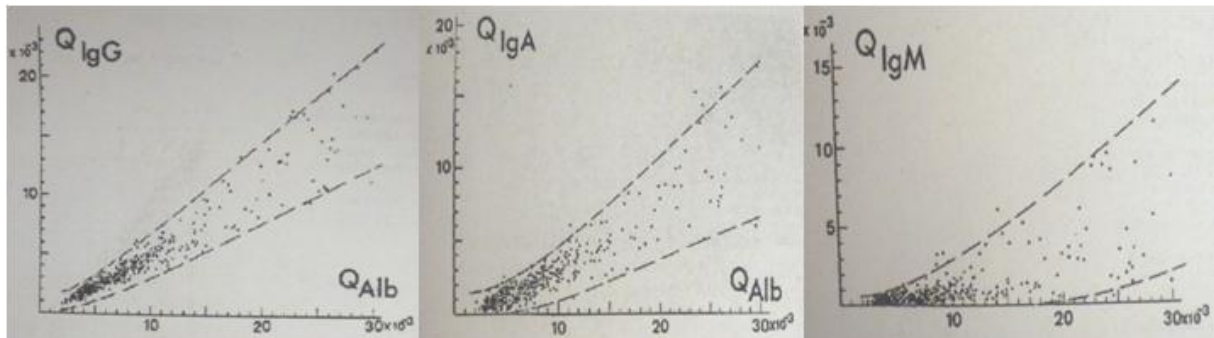
$$\text{Index IgG} = (\text{Quotient IgG}) / (\text{Quotient Albumine})$$

$$\text{Index IgG} = (\text{QIgG}) / (\text{QAlbumine})$$

QIgG est une estimation de la concentration des IgG dans le LCR en fonction de leur concentration dans le sérum. Qalbumine est un marqueur de l'intégrité de la barrière. Cette protéine étant synthétisée exclusivement au niveau hépatique, une augmentation de sa concentration dans le LCR ne peut qu'être d'origine sanguine, donc provoquée par une diminution de l'intégrité de la BHE. QIgG augmente proportionnellement à Qalbumine et, théoriquement, le rapport entre ces deux quotients reste constant quel que soit le niveau d'altération de la BHE. Normalement, l'index IgG est de l'ordre de 0,4 – 0,6. Un index IgG > 0,7 évoque une synthèse *in situ* d'IgG plutôt qu'un passage à travers la BHE.

Cependant, un index IgG > 0,7 peut être observé en dehors de toute synthèse intrathécale lorsque la BHE est fortement altérée. En observant la relation entre QIgG et Qalbumine chez les patients présentant des altérations diverses de la BHE mais chez qui aucune synthèse intrathécale n'avait pu d'être démontrée, Reiber a constaté que la relation entre ces 2 quotients n'était pas linéaire mais hyperbolique (Fig.3) (Reiber H and al., 1987). La limite à partir de laquelle une augmentation de l'index IgG démontre l'existence d'une synthèse intrathécale augmente avec Qalbumine. Elle est de 0,64 pour un Qalbumine de l'ordre de 0,005, de 0,74 pour un Qalbumine élevée de 0,05 et de 0,79 pour un Qalbumine très élevée

de 0,1. La même relation hyperbolique est observée entre QIgA et Qalbumine ainsi que QIgM et Qalbumine, mais l'allure des courbes est différente en raison de la variation du coefficient de diffusion entre ces différentes protéines (Fig.3).



**Figure 3** : Evolution du QIgG, QIgA et QIgM de 361 patients en fonction du Qalb au cours de pathologies entraînant des altérations diverses de la barrière sang/LCR, mais pas de synthèse intrathécale (N.Gillain and al., 2009).

En définitive, le diagramme de Reiber permet de délimiter différentes zones permettant *in fine* de faciliter l'interprétation des dosages d'Ig obtenus et de définir si ces dosages sont évocateurs d'une synthèse intrathécale d'immunoglobuline ou non.

Ainsi ce diagramme (Fig 4.) définit différentes zones :

1. Valeur normale
2. Altération de la BHE sans synthèse intrathécale
3. Synthèse intrathécale sans altération de la BHE
4. Synthèse intrathécale et altération de la BHE
5. Zone de valeur physiologiquement impossible

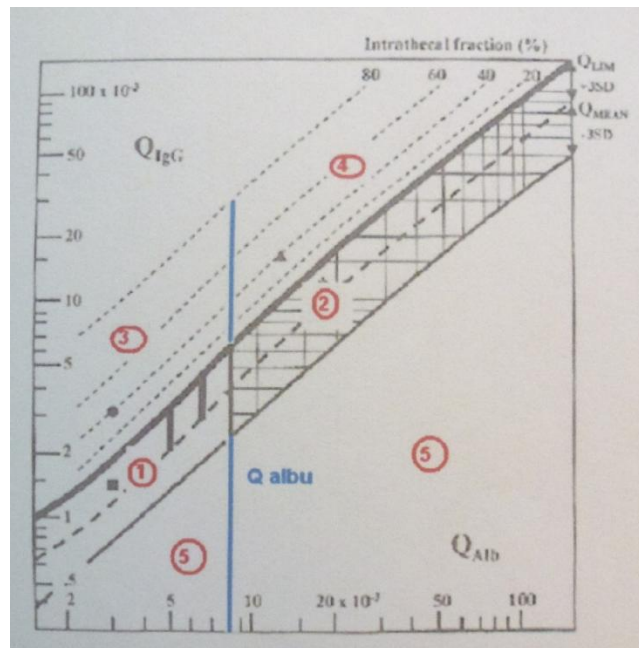


Figure 4 : Diagramme de Reiber pour les IgG

Ce nouveau critère permet de classer les index IgG comme :

- normaux (pas de synthèse, pas d'altération de la BHE)
- correspondant à une synthèse sans altération de la BHE
- correspondant à une altération de la BHE sans synthèse
- correspondant une altération de la BHE avec synthèse intrathécalle

### 2.3. Intérêt de la détection d'une synthèse intrathécalle d'Ig dans la SEP

Dans le cas de la SEP, seule une synthèse intrathécalle d'IgG présente un intérêt diagnostic de par la sensibilité de ce test (Sindic C and al., 2001 ; Luxton RW and al., 1990). Mais, la présence de BOG peut être observée dans de nombreuses maladies inflammatoires (neuro-lupus, sarcoïdose, maladies de Behçet, syndrome paranéoplasique avec atteinte du SNC) ainsi que dans des pathologies tumorales (lymphome du SNC, méningite carcinomateuse) affectant le SNC (Sindic C and al., 2001). Au cours des maladies infectieuses, qu'elles soient de nature virale, bactérienne, fongique ou parasitaire, l'atteinte du SNC entraîne de façon spécifique une réponse immunitaire *in situ* visible au travers de BOG (Sindic C and al., 2001 ; Kuhle J and al., 2007 ; Reiber H, Peter JB. and al., 2001 ; Reiber H, Otto M. and al., 2001).

Mais, bien que les BOG ne soient pas pathognomoniques de la SEP, associées à des critères cliniques et radiologiques de dispersion spatio-temporelle, elles aident à conforter le diagnostic ou à prédire un risque. En effet, pour les CIS, la présence de BOG lors du premier évènement augmente le risque de survenue d'un second épisode (Sandberg-Wollheim M. and al., 1975 ; Moulin D. and al., 1983 ; Tintoré M. and al., 2001 ; Tintoré M. and al., 2008). Les patients sans BOG présentent dans ce contexte un faible risque de développer une SEP (valeur prédictive négative de 88%) soit un risque comparable aux patients qui ne remplissent que 3 des 4 critères de Barkhof (Barkhof F. and al., 1997). La fréquence des BOG est de 60% dans le cadre des CIS (Kelly S. and al., 2012), contre plus de 90% chez les patients présentant une SEP cliniquement définie (Deisenhammer F. and al., 2013) et en lien avec la charge lésionnelle (27% de BOG chez les patients présentant une IRM normale, 64% pour les patients présentant entre 1 et 9 lésions à l'IRM et 83% pour les patients présentant plus de 10 lésions à l'IRM)( Kelly S. and al., 2012). Cependant, l'aide à la prise en charge du patient tout comme les réponses qui pourront lui être apportées sont considérables. En effet, la présence de BOG double le risque d'avoir un second épisode dans les 50 mois. Plus particulièrement, la recherche de BOG aide la prise en charge des patients présentant peu ou pas de lésion à l'IRM car leurs positivités exposent à un risque de développer une SEP de 4 à 23% (Tintoré M. and al., 2008).

Dans RIS également, l'étude du LCR peut aider au diagnostic différentiel de SEP au travers de la recherche de BOG en association avec l'étude de la cellularité et de l'index d'albumine entre autre.

Des travaux ont mis en évidence un lien entre BOG et la présence de structure subarachnoidienne de type folliculaire-like. Ces structures sont retrouvées dans les SEP évoluées, particulièrement les formes SP (Howell OW. and al., 2011) et expliquent l'augmentation du taux de BOG chez les SEP-SP en comparaison aux SEP-RR débutantes (Lourenco P. and al., 2013).

Pour les SEP-PP, la problématique des BOG est différente. Dans cette forme, l'aggravation clinique est insidieuse, associée à une faible charge lésionnelle en IRM. L'étude du LCR apporte une aide considérable au diagnostic même s'il ne fait plus partie des critères diagnostiques depuis 2005 (Polman CH., and al., 2005 ; Polman CH., and al., 2011).



En conclusion, bien que tous les neurologues n'étudient pas le LCR lors du diagnostic de SEP et que beaucoup de présentations clinico-radiologiques initiales restent typiques, il est important de garder à l'esprit qu'il n'existe pas de marqueur spécifique de la maladie. Le diagnostic reposant sur un faisceau d'arguments et entraînant une prise en charge médicale à vie, il est nécessaire de collecter le plus d'arguments possibles. L'étude du LCR reste donc une aide non négligeable à la confirmation ou non du diagnostic (Hutchinson M., 2013). Les BOG sont actuellement mises en évidence chez 90-95% des patients porteurs d'une SEP cliniquement définie (Imrell K and al., 2006 ; Mero IL and al., 2013), leur absence doit conduire à une remise en cause du diagnostic.

Par ailleurs, une enquête auprès de spécialistes de la SEP a permis de mettre en évidence que 95% d'entre eux comptaient au moins 1 patient non porteur de SEP et diagnostiqué à tort durant l'année écoulée incitant à la prudence lors de l'interprétation des IRM. En effet, les diagnostics différentiels comprenaient des anomalies aspécifiques de la substance blanche, des maladies des petits vaisseaux ainsi que des migraines (Solomon AJ., 2012).

#### **2.4. Spécificité antigénique de cette production d'Ig**

De nombreux travaux ont été conduits sur la spécificité de ces IgG intrathécales. Certaines sont dirigées contre la rougeole, la rubéole et le virus varicelle zona (séroconversion partielle ou total chez environ 89 % des patients porteurs d'une SEP), mais une réactivité contre d'autres agents pathogènes est également possible comme *Borrelia burgdorferi* (Bednarova J and al., 2005), *Chlamydia pneumoniae* (Meinl E and al., 2006) et HHV-6 (Human herpesvirus 6) (Meinl E and al., 2006).

Plus classiquement, il a été mis en évidence une spécificité antigénique contre des protéines majeures de la myéline (Owens G.P. and al., 2009) ou des composants non myéliniques (Ousman S.S. and al., 2007; Silber E. and al., 2002; Bartos A. and al., 2007). Cependant les antigènes reconnus par les IgG restent globalement inconnus.

En parallèle, la persistance au long cours de BOG et les réponses anticorps polyspécifiques indiquent que le SNC des patients porteurs d'une SEP fournit aux LB un environnement stimulant.

## 2.5. Problématique des bandes oligoclonales IgG dans la SEP

Classiquement, le profil IgG présent dans le LCR est polyclonale. Lorsque le sang du patient contient une ou plusieurs IgG monoclonales (tracé oligoclonal dans le sérum), ces composés monoclonaux diffusent dans le LCR et la bande monoclonale observée dans le LCR est alors sans lien avec une éventuelle synthèse intrathécale : les bandes oligoclonales présentes au niveau du LCR ont le même aspect que les bandes du sérum, on parle alors de profil en miroir (Andersson M and al., 1994).

Dans certaines maladies inflammatoires du SNC, comme la SEP, il a pu être mis en évidence différents clones lymphocytaires B en constante mutation, capables de proliférer et de synthétiser des immunoglobulines (Frohman EM. And al., 2006 ; Mehling M and al., 2008). Ces clones sont responsables de l'aspect oligoclonal du LCR puisque ces lymphocytes ne sont pas présents en périphérie.

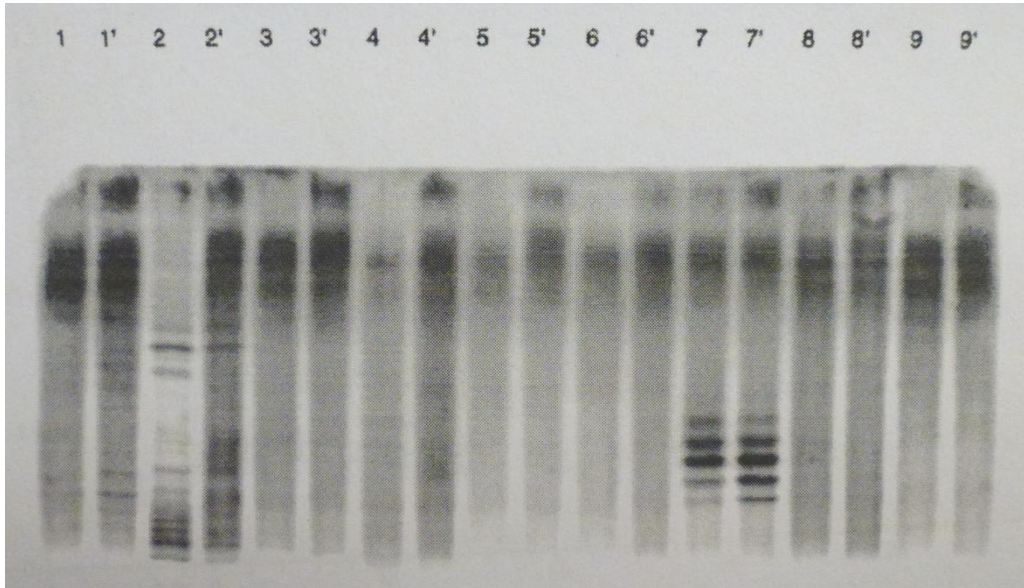
La mise en évidence de ces BOG doit répondre à des critères analytiques définis par un consensus : analyse qualitative des profils IgG utilisant un LCR et un sérum prélevé au même moment et amené à la même concentration pour la protéine d'intérêt (IgG), LCR non concentré, LCR et sérum déposés côte à côte pour comparaison aisée des profils IgG, quantité déposée d'IgG sang et d'IgG LCR identique, volume de LCR et de sérum déposé identique, séparation des immunoglobulines par électrofocalisation, mise en évidence des IgG par des techniques immuno-enzymatiques (Andersson M and al., 1994 ; Freedman M and al., 2005).

La technique d'isoélectrofocalisation consiste en une séparation des protéines en fonction de leur charge et de leur point isoélectrique. Le gradient de pH est créé par des ampholytes. Au point isoélectrique, la charge globale des molécules est nulle. Elles s'immobilisent alors dans le gel en bandes plus ou moins fines. La révélation des IgG se fait dans un second temps par immunodétection.

Les IgG varient très peu en structure, elles sont donc difficiles à séparer en fonction de leur poids. Par contre, leur spécificité antigénique entraîne des compositions en acides aminés sensiblement différentes. Or, ces acides aminés présentent tous une charge, leur somme attribuant une charge globale spécifique à chaque IgG découlant de cette spécificité antigénique. Les IgG migrent alors en fonction de cette charge globale au sein d'un gel

d'ampholyte réparti de façon à composer un gradient de pH permettant une migration des IgG jusqu'à leur point d'équilibre (pHi).

L'interprétation des tracés est bien codifiée (Sindic C and al., 2001 ; Kuhle J and al., 2007 ; Andersson M and al., 1994 ; Freedman M and al., 2005). La présence d'un profil oligoclonal est affirmée sur base de la présence de bandes oligoclonales dans le LCR et de leurs absences dans le sérum ou sur la présence d'un nombre plus élevé de bandes oligoclonales dans le LCR que dans le sérum. L'absence de bande oligoclonale est affirmée sur l'absence de bande oligoclonale dans le LCR, sur un nombre équivalent de bande oligoclonale dans le LCR et le sérum (bande miroir), un cas particulier étant la présence d'un composé monoclonal qui donne une image assez caractéristique en barreaux d'échelle (Fig. 5). En effet, un composé monoclonal se présente sous la forme d'au moins 4 bandes oligoclonales plus épaisses que les bandes oligoclonales habituelles et très proche les unes des autres. Cet aspect s'explique vraisemblablement par des modifications post-traductionnelles de la structure glycosylée de ce composé monoclonal (Mehling M and al., 2008).



**Figure 5 :** Gel d'électrofocalisation (LCR en première position) ; 1/1' : négative, bandes en miroir ; 2/2' : positive, plus de bandes dans le LCR que dans le sérum, 4/4' : positive, bandes uniquement dans le LCR ; 6/6' : négative ; 7/7' : composé monoclonal.

La présence d'une seule bande oligoclonale spécifique au LCR est considérée comme négatif. Néanmoins, les patients qui présentent cette anomalie doivent faire l'objet d'une

surveillance particulière. En effet, chez certains de ces patients, on observera plusieurs bandes oligoclonales lors d'une ponction ultérieure et généralement le diagnostic de SEP ou d'une autre maladie démyélinisante sera établi. Un tel diagnostic ne sera jamais établi chez les patients pour lesquels cette bande unique disparaît ou persiste seule. En revanche, une bande oligoclonale isolée peut être associée aux lymphomes cérébraux (Davies G and al., 2003 ; Franciotta D and al., 2004).

## **2.6. Analyse du LCR dans la SEP**

Le LCR présente peu d'anomalies dans la SEP (Andersson M and al., 1994 ; Freedman M and al., 2005). Classiquement, les patients porteurs d'une SEP présentent un liquide « eau de roche » avec une protéinorachie normale (dans 75% des cas, dans tout les cas, strictement inférieur à 1g/l) et moins de 25 éléments/mm<sup>3</sup> (rarement supérieur (<1%), classiquement inférieur à 4 éléments, mais toujours inférieur à 50 éléments/mm<sup>3</sup>). Les cellules retrouvées sont de type mononucléé avec plus de 80% de LT (prédominance LT CD4+ activés). En revanche, la présence de bandes oligoclonales de type IgG est observée chez plus de 95 % des patients (Sindic c and al., 2001). Ces bandes oligoclonales spécifiques restent présentes dans le LCR tout au long de la maladie (Link H and al., 2006).

Chez les 5 % de patients sans bande oligoclonale, on peut observer des bandes de types IgA, IgM ou Kappa ou lambda (Sindic c and al., 2001 ; Sindic CJM and al., 1991). La signification de ces bandes n'est pas établie. En revanche, chez un patient qui présente des bandes IgM, la mise en évidence de bandes de types IgM serait de mauvais pronostic (Villar LM and al., 2003 ; Mandriolo J and al., 2008). Des études ne confirment pas ses observations (Schneider R and al., 2007). Nous reviendrons sur ce point.

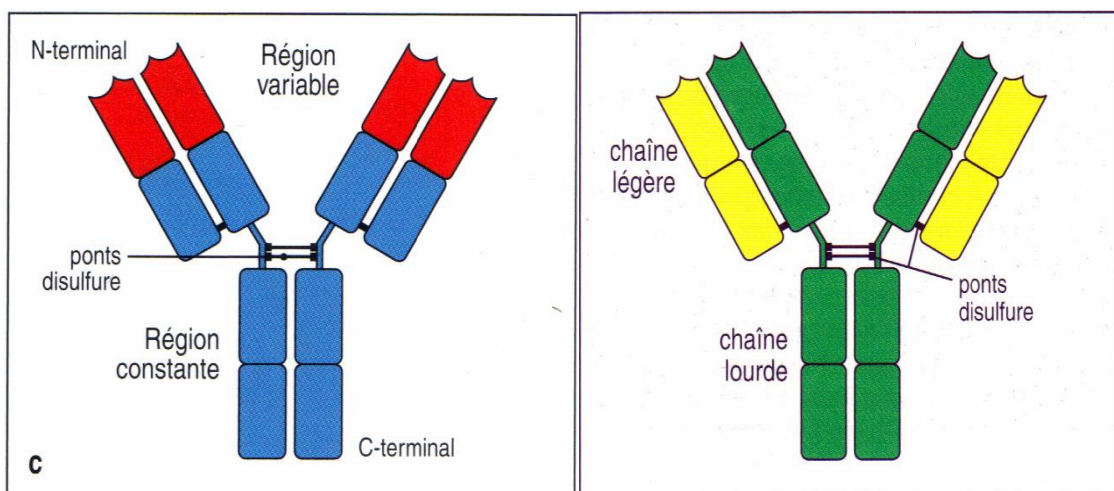
Mais tout d'abord nous allons faire le point sur les lymphocytes B (LB) afin de préciser leurs rôles dans la réponse immunitaire.

### 3. LYMPHOCYTES B ET SEP

#### 3.1. Rappel sur les immunoglobulines

Les récepteurs lymphocytaires d'antigène, sous la forme d'immunoglobuline de surface pour les LB, permettent à ces derniers de réagir à la présence d'antigènes dans leur environnement. Chaque lymphocyte produit des récepteurs avec une spécificité antigénique unique, déterminée par la structure de son site de liaison à l'antigène. Chaque individu possède des milliards de lymphocytes, l'ensemble des ces cellules le rend capable de réagir à de nombreux antigènes différents. Le vaste répertoire de récepteurs d'antigène s'explique par la variation de la séquence en acides aminés dans le site de liaison de l'antigène constituant les régions variables (V) des chaînes protéiques du récepteur. Pour chaque chaîne, la région (V) est liée à une partie constante (C) invariable qui assure les fonctions effectrices ou de signalisation (Fig. 6).

Les immunoglobulines peuvent être synthétisées sous la forme de récepteurs transmembranaires (récepteur des LB ou BCR) ou d'anticorps sécrétés.



**Figure 6** : Structure d'une molécule d'anticorps. Schéma de gauche illustre en rouge les régions variables sujettes à des évolutions génétiques au long de la « maturation » du LB en parallèle de la commutation de classe qui intéresse les régions constantes de la chaîne lourde. Le schéma de droite représente les chaînes lourdes (vert) et légères (jaune) (d'après Janeway and al., 2009).

### **3.2. Rappel immunologique sur les lymphocytes B**

Il existe deux populations principales de lymphocytes : les lymphocytes B (LB) et les lymphocytes T (LT), chacun chargé de rôles immunitaires différents et porteurs de types distincts de récepteurs d'antigènes (BCR ou TCR : *B or T Cell Receptor*) (FIG). Après la liaison d'un antigène au récepteur présent à la surface des LB (BCR), les LB prolifèrent et se différencient en plasmocytes plus ou moins indépendamment des LT.

Les plasmocytes constituent la forme effectrice du LB ; ils produisent chacun des anticorps présentant une spécificité antigénique identique, forme sécrétée du BCR. Ainsi, l'antigène qui active un LB devient la cible des anticorps produits par la descendance de ces cellules. Les molécules d'anticorps sont aussi appelées immunoglobulines, d'où les dénominations d'immunoglobuline membranaire ou d'immunoglobuline de surface parfois utilisées pour désigner les récepteurs antigéniques des LB.

Au cours d'une réponse immunitaire, certains LB activés par l'antigène se différencient en cellules mémoire avec l'aide des LT CD4+ généralement. Ces cellules sont responsables de l'immunité de longue durée qui se développe après une infection ou une vaccination. Les cellules mémoire se différencieront facilement en cellules effectrices lors d'une seconde rencontre avec l'antigène spécifique.

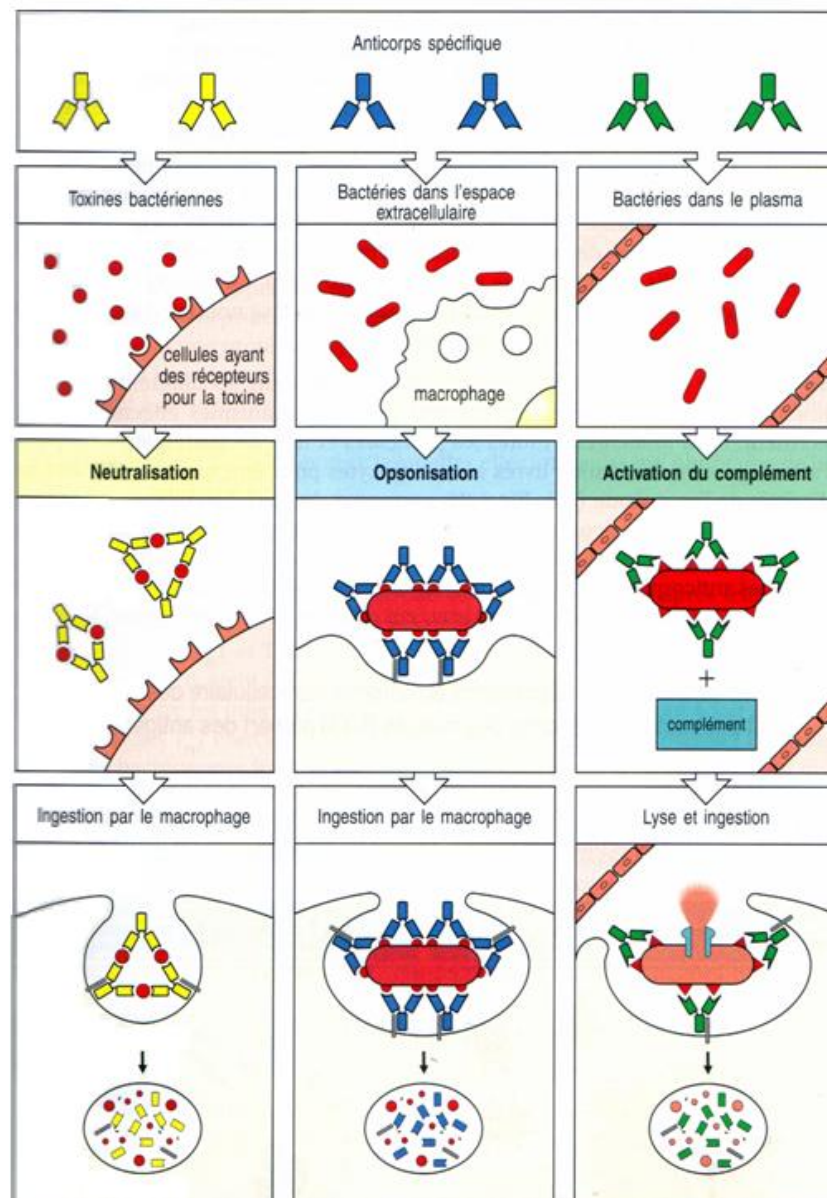
### **3.3. Rôle des immunoglobulines**

Les immunoglobulines contribuent à l'immunité de trois manières principales. La première est appelée neutralisation. Pour pénétrer dans les cellules, les virus et les bactéries intracellulaires se lient à des molécules spécifiques présentes à la surface de la cellule cible. Les anticorps qui s'attachent aux pathogènes peuvent empêcher cette liaison ; on dit alors qu'il neutralise l'agent pathogène. La neutralisation par les anticorps est aussi très importante pour empêcher l'entrée des toxines bactériennes dans la cellule.

Les anticorps ont également un rôle protecteur contre les agents pathogènes qui se multiplient à l'extérieur des cellules en favorisant leur capture par les phagocytes. Recouvrir la surface d'un pathogène pour en faciliter la phagocytose est appelée opsonisation. Les

anticorps attachés aux pathogènes sont reconnus par des cellules phagocytes au moyen de récepteurs dits de Fc qui se lient à la région constante des anticorps (région C).

Enfin, les anticorps liés à la surface du pathogène peuvent également activer le système du complément. L'activation du complément est déclenchée par la fixation de certains de ses composants à la surface du pathogène opsonisé. Certains composants du complément attirent les cellules phagocytaires sur le site de l'affection. La phase terminale de l'activation du complément permet quand à elle, la lyse du pathogène en formant des pores dans leur membrane. (Fig. 7)

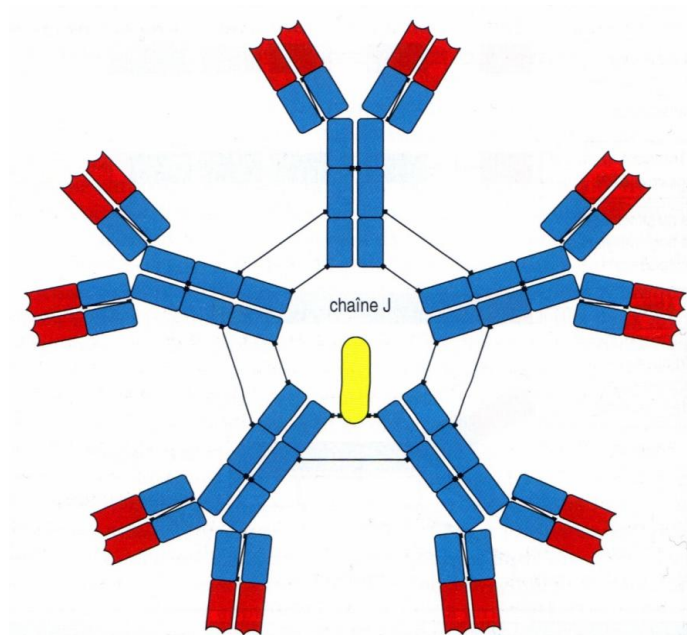


**Figure 7** : Résumé des 3 mécanismes d'action des immunoglobulines dans le processus de défense de l'hôte (d'après Janeway and al., 2009).

Le type de mécanismes effecteurs utile à une réponse particulière est défini par la classe d'Ig produites (IgG, IgM, IgA, IgE, IgD). Les différentes chaînes lourdes qui définissent la classe ou isotype sont désignées par les lettres grecques minuscules  $\mu$ ,  $\delta$ ,  $\gamma$ ,  $\epsilon$ , et  $\alpha$ . Les régions C des chaînes lourdes définissent les classes d'immunoglobulines. Elles forment un ensemble situé en 3' des segments géniques V et J. Un exon de régions V réarrangée de manière productive est d'abord exprimé en association avec les régions C<sub>H</sub> $\mu$  et  $\delta$  qui sont co-exprimées dans les cellules B naïves par épissage alternatif d'un transcrite d'ARN messenger qui contient les exons C<sub>H</sub> $\mu$  et  $\delta$ . De plus, les cellules peuvent exprimer toutes classes d'immunoglobulines comme récepteurs d'antigènes membranaires ou anticorps sécrétés. Ceci est réalisé par un épissage différentiel de l'ARN messenger afin d'inclure les exons qui codent soit une séquence d'ancrages membranaires hydrophobes ou une queue permettant la sécrétion. L'anticorps que le LB sécrète lors de son activation reconnaît ainsi l'antigène qui a activé au départ le LB par son BCR. Le même exon de régions V peut ensuite être associé à l'un des autres isotypes pour diriger la production d'immunoglobulines des différentes classes.

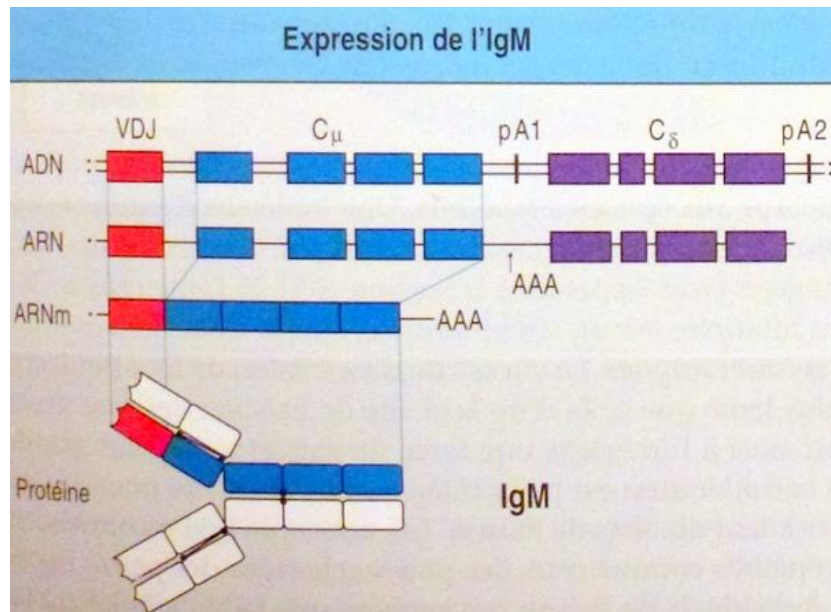
Bien que toutes les immunoglobulines soient construites à partir d'une unité de base de deux chaînes lourdes et de deux chaînes légères, les IgM peuvent former des polymères de ces sous unités de base (Fig. 8). Les régions C des IgM possèdent une queue de 18 acides aminés qui contient un résidu cystéine essentiel pour la polymérisation. Une chaîne polypeptidique additionnelle de 15 kDa appelés chaîne J favorise la polymérisation en liant les cystéines de la queue, qui ne se trouve que dans les formes sécrétées des chaînes  $\mu$ . Les molécules d'IgM du plasma sont des pentamères, occasionnellement des hexamères (sans chaîne J).





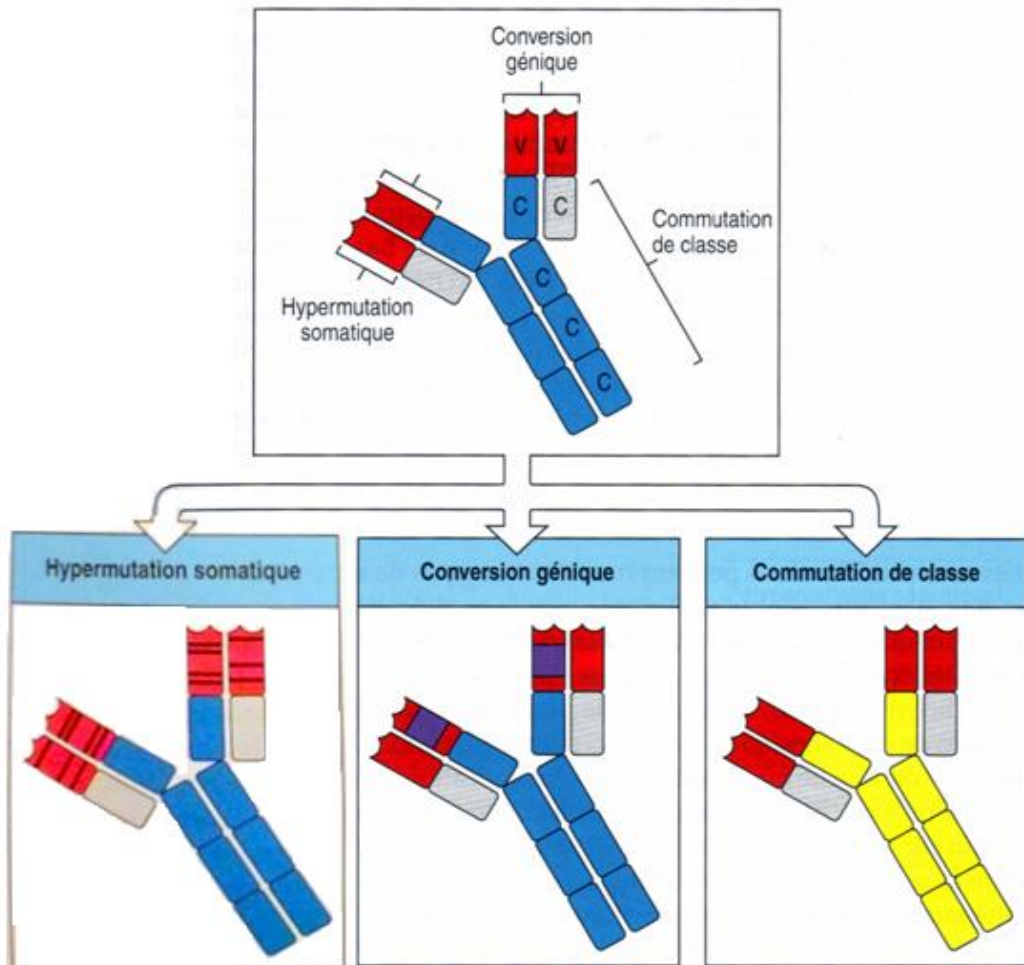
**Figure 8** : IgM pentamérique (d'après Janeway and al., 2009).

La polymérisation des molécules d'immunoglobuline est importante pour la liaison de l'anticorps aux épitopes répétitifs (comme à la surface des agents pathogènes). Une molécule d'anticorps a au moins deux sites de liaison identiques et chacun a une affinité donnée, ou une force de liaison, pour un anticorps. Si l'anticorps se lie à des épitopes identiques multiples sur un antigène cible, il ne se détachera que lorsque toutes les liaisons seront rompues. La vitesse de dissociation de tout l'anticorps sera donc beaucoup plus lente que celle d'un seul site de liaison ; des sites multiples de liaison donnent ainsi à l'anticorps une force de liaison totale plus grande, appelée avidité. Cette considération est particulièrement pertinente pour les IgM pentamériques, qui possèdent 10 sites de liaison. Les IgM reconnaissent souvent des épitopes répétitifs comme ceux des polysaccharides des parois bactériennes, mais les sites de liaison ont souvent une faible affinité car ces IgM interviennent au début de la réponse immune avant l'hypermutation somatique et la maturation d'affinité. La liaison par de multiples sites permet donc de compenser cette faiblesse et d'améliorer considérablement la force de liaison globale.



**Figure 9** : Expression des IgM : Dans les LB matures, la transcription débute au promoteur V<sub>H</sub> et s'étend au travers des exons C<sub>μ</sub>. Ce long transcrit primaire est ensuite apprêté par clivage, polyadénylation (AAA), puis épissage. Le clivage et la polyadénylation au site μ (pA1) et l'épissage entre exons C<sub>μ</sub> produit un ARNm codant la chaîne lourde (d'après Janeway and al., 2009).

Les premiers anticorps produits au cours d'une réponse immunitaire humorale sont de nature IgM, car cette classe peut être produite sans commutation de classe (Fig. 9). Les IgM sont produites avant que les LB aient subi d'hypermutation somatique, et n'ont par conséquent qu'une faible affinité pour l'antigène. Par la suite, l'hypermutation somatique, la conversion génique et la commutation de classe modifient la séquence de l'Ig de manière distincte (Fig. 10). La recombinaison de commutation de classe ne concerne que la région C ; elle remplace la région C originale de la chaîne lourde C<sub>μ</sub> par une autre région C, ce qui augmente la diversité fonctionnelle du répertoire de l'Ig. L'hypermutation somatique et la conversion génique affectent les régions V. L'hypermutation somatique diversifie le répertoire de l'Ig par l'introduction de mutation ponctuelle dans les régions V des 2 chaînes, ce qui modifie l'affinité de l'Ig pour l'antigène. La conversion génique diversifie le répertoire primaire des anticorps en remplaçant des blocs de séquence dans la région V par des séquences dérivées de régions V de pseudogènes.



**Figure 10** : Diversification du répertoire primaire d'Ig via 3 processus modifiant le gène d'Ig. (d'après Janeway and al., 2009).

### 3.4. Sous-type particulier de LB

Un sous-type lymphocytaire appelé LB CD5+ ou B de type 1 (LB-1) présente une diversité restreinte de récepteurs d'antigènes. Ces LB se distinguent par la présence de la protéine CD 5 (*Cluster de différenciation*) à leur surface et représentent 5% des LB chez l'homme.

Ces LB-1 apparaissent tôt au cours de l'embryogenèse et utilisent un nombre limité de récepteurs. Elles sont appelés LB-1 parce que leur développement précède celui des LB classiques, appelés LB-2 (Fig.11). Ces LB répondent à un certain nombre d'antigènes microbiens ubiquistes et peuvent parfois produire des auto-anticorps. Le CD5 a pour rôle d'atténuer les signaux d'activation induits par le BCR. Les LB-1 sont absents des ganglions et constituent 5% des LB présents au niveau de la rate. Ils sont importants dans l'immunité

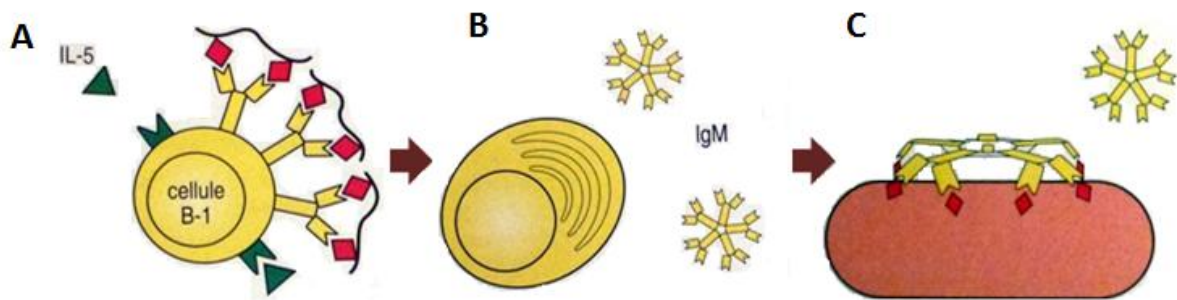
mucosale et prédominant dans des environnements particuliers, comme la cavité péritonéale et pleurale ou le LCR (Mix E and al., 1990 ; Bongioanni P and al, 1996).

Propriété	Cellules B-1	Cellules B-2 conventionnelles
Production initiale	Fœtus	Après la naissance
Régions N dans les jonctions VDJ	Peu	Beaucoup
Répertoire de régions V	Restreint	Diversifié
Localisation primaire	Cavités du corps (péritonéales, pleurales)	Organes lymphoïdes secondaires
Mode de renouvellement	Autorenouvellement	Remplacement à partir de la moelle osseuse
Production spontanée d'immunoglobuline	Forte	Faible
Isotypes sécrétés	IgM >> IgG	IgG > IgM
Réponse aux antigènes glucidiques	Oui	Peut-être
Réponse aux antigènes protéiques	Peut-être	Oui
Nécessité de T auxiliaire	Non	Oui
Hypermutation somatique	Faible ou nulle	Importante
Développement de la mémoire	Faible ou nulle	Oui

**Figure 11** : Comparaison des propriétés des LB-1 et des LB-2 (d'après Janeway and al., 2009).

Les LB-1 n'interviennent pas dans le cadre d'une réponse immune adaptative spécifique d'antigène étant donné qu'ils sont capables de produire des Ig sans l'aide des LT (Fig. 12). Bien que ces réponses puissent être amplifiées par les LT, elles apparaissent trop précocement pour que les LT soient impliqués.

Ce manque d'interaction avec les LT CD4 peut expliquer l'absence de mémoire immunologique : les expositions répétées aux mêmes antigènes activent des réponses similaires voir diminuées à chaque exposition. Donc, ces réponses, bien que générées par des lymphocytes suite à des réarrangements de leurs récepteurs, ressemblent à des réponses immunitaires innées plutôt qu'à des réponses immunitaires adaptatives.



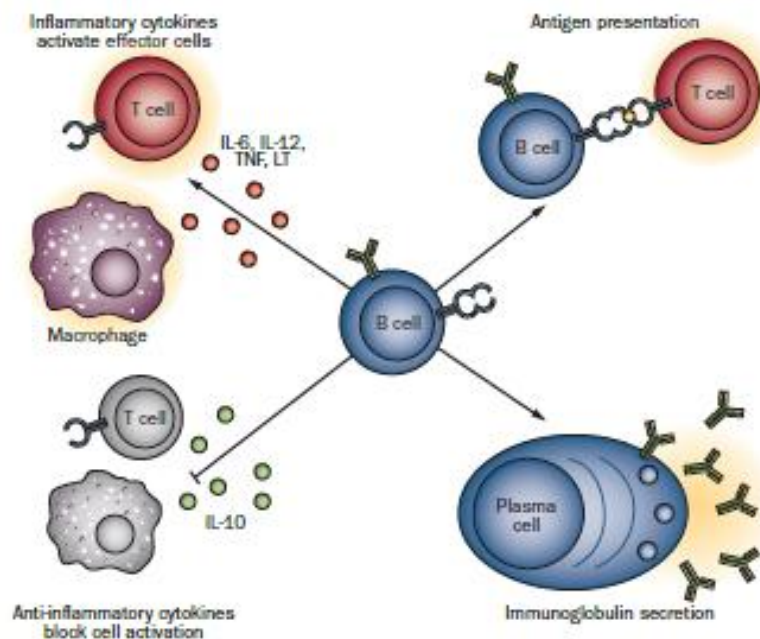
**Figure 12 :** Les LB-1 CD5+ jouent un rôle important dans la réponse à des antigènes glucidiques comme les polysaccharides bactériens. **A-** Le LB-1 se lie aux polysaccharides bactériens ou aux composants de la paroi cellulaire et reçoit un signal (IL-5) à partir de cellules auxiliaires. **B-** Le LB-1 sécrète des IgM anti-polysaccharides. **C-** L'IgM se lie à la capsule polysaccharidique (d'après Janeway and al., 2009).

L'origine de ces LB-1 est encore controversée. On ne sait pas encore s'ils sont développés sous forme d'une lignée distincte à partir de précurseurs uniques ou acquièrent leur phénotype à partir d'un précurseur, qui pourrait également donner naissance aux LB-2. Chez la souris, le foie fœtal produit principalement des LB-1, alors que la moelle osseuse adulte génère principalement des LB-2, ce qui a été interprété comme un argument faveur du caractère unique des précurseurs. Toutefois, d'autres arguments favorisent l'idée que l'orientation B-1 ou B-2 est due à un processus de sélection, plutôt qu'à une différence de lignée.

La localisation particulière des LB-1 suggère un rôle dans la défense des cavités corporelles. Le répertoire limité de leurs récepteurs semble les destiner à une fonction au cours de la phase précoce et non adaptative de la réponse immunitaire. En effet, les segments géniques V qui sont utilisés pour coder les récepteurs de LB-1 pourraient avoir évolué par sélection naturelle afin que ces lymphocytes reconnaissent des antigènes bactériens communs, leur permettant ainsi de contribuer aux phases très précoces de la réponse immunitaire adaptative. En particulier, on constate que ces lymphocytes contribuent peu à la réponse immunitaire adaptative contre la plupart des antigènes protéiques, et contribuent fortement à certaines réponses humorales contre des antigènes glucidiques. L'existence de ces Ig naturelles réagissant fréquemment de manière croisée et présentant une affinité relativement faible pour les antigènes microbiens et des auto-antigènes supporte l'idée que les LB-1 sont partiellement activés parce qu'ils sont destinés à s'auto-renouveler au contact d'auto-antigènes ubiquitaires et d'antigènes de l'environnement.

### 3.5. Rôle des LB dans la SEP

La production d'Ig par les LB joue un rôle particulièrement important dans la réponse immunitaire effectrice au sein d'un environnement inflammatoire comme dans la SEP. Récemment, un sous type de LB producteur d'IL-10 a été mis en évidence chez l'homme. En fonction du modèle d'EAE (encéphalite aigue expérimentale) utilisé, les LB potentialisent ou modulent l'inflammation au sein du SNC (Fig. 13).



**Figure 13 : Effet pro-inflammatoire et régulateur des LB.** Les LB peuvent devenir des plasmocytes, grands producteurs d'Ig, être activés après présentation antigénique par les LT, et sécréter des cytokines pro-inflammatoires qui auront pour rôle d'activer les LT et les macrophages. En parallèle, les LB peuvent également sécréter des cytokines à action anti-inflammatoires qui auront pour rôle de bloquer l'activation des LT et des macrophages (Krumbholz M. and al., 2012).

L'implication des LB dans la SEP est évidente. D'un part, le rôle délétère des LB a été mis en évidence dans cette pathologie à différents niveaux au sein du SNC. La présence de LB résidant dans les espaces périvasculaires et dans le parenchyme a été constatée dans des plaques actives de SEP (Meinl E and al., 2006). Les études moléculaires révèlent que les LB persistent à ce niveau et se répandent également au sein du SNC et du LCR (Lovato L and al., 2011 ; Obermeier B and al., 2011). Des agrégats de LB ont été mis en évidence au niveau des méninges de patients présentant une SEP secondaire progressive ainsi que chez des patients porteurs de SEP récemment diagnostiquée (Serefini B and al., 2004 ; Lucchinetti CF

and al., 2011). L'inflammation des méninges associée à l'atteinte corticale implique également des LB (Lucchinetti CF and al., 2011 ; Howell OW and al., 2011).

De plus, le LCR contient une chimiokine attractive pour les LB (CXCL13) dont la production est en lien avec l'inflammation au sein du SNC, la production locale IgG, le nombre de LB ainsi que dans le développement et la maintenance des organes lymphoïdes, preuve indirecte du rôle joué par le SNC dans le recrutement des LB chez les patients SEP (Charo IF and al., 2006 ; Krumbholz M and al., 2006 ; Kowarik M and al., 2012).

En parallèle, les astrocytes produisent un facteur de survie des LB (BAFF : *B cell activating factor of the TNF family*) (Krumbholz M and al., J Exp Med. 2005).

Enfin, les lésions actives mesurées en I.R.M. sont corrélées avec le nombre de plasmoblastes et de LB présents dans le LCR (Cepok S and al., 2005 ; Kuenz B and al., 2008).

De façon plus générale, des anomalies de la réponse cytokinique des LB ont été rapportées chez des patients porteurs de SEP (Duddy M. and al., 2007).

Par ailleurs, la délétion en LB est une thérapeutique intéressante dans la SEP (rituximab, ocrelizumab =antiCD20). Ces thérapeutiques, en agissant spécifiquement sur la population LB, entraînent une réduction du nombre de poussées ainsi que de l'apparition de nouvelles lésions prenant le contraste (Hauser SL and al., 2008 ; Kappos L and al., 2011 ; Frohman EM and al., 2006). Il en va de même pour les échanges plasmatiques dont l'efficacité en pratique clinique est reconnue. De plus, beaucoup de traitements immunomodulateurs utilisés dans la SEP affectent le compartiment lymphocytaire. Enfin, l'identification et la validation de nouveaux auto-anticorps dans la SEP est un axe de recherche important avec en particulier la découverte récente des anticorps anti-canaux potassiques KIR4.1.

Des études récentes ont, en effet, pu mettre en évidence que 47 % des patients SEP présentent une réactivité antigénique aux récepteurs KIR4.1 contre aucun témoin sain. L'injection de ces anticorps anti-KIR4.1 issus des patients porteurs d'une SEP, dans le cerveau de souris entraîne des dommages structuraux sur les cellules gliales. Ce canal potassique est une protéine présente à la surface des oligodendrocytes et des astrocytes. Les IgG anti-KIR4.1 sont ici des isotypes permettant l'activation du complément (IgG1 et

IgG3) à l'inverse d'autres isotypes non capables de cette activation (IgG2 et IgG4) (Rajneesh Srivastava and al., 2012).

#### **4. RESUME DE L'IMPLICATION DES LB DANS LA PHYSIOPATHOLOGIE DE LA SEP**

Les BOG constituent l'anomalie principale mise en évidence au niveau du LCR de patients SEP et sont dépendantes de la lignée lymphocytaire B. Ces bandes sont présentes chez environ 90 % des SEP cliniquement définies. Chez les patients présentant un CIS, la présence de BOG indique un haut risque d'évoluer vers une SEP cliniquement définie (Tintore M and al., 2001).

La stabilité au long cours du profil IgG au niveau du LCR est remarquable et ce, même dans un contexte de thérapie agressive où seuls quelques changements mineurs ont pu être observés jusqu'à récemment (Correale J and Molinas MMB. 2002). En effet, une étude conduite chez des patients traités par natalizumab (10 perfusions) a mis en évidence une disparition des bandes oligoclonales chez 4 des 6 patients. L'influence de ce paramètre sur l'évolution de la SEP ou le risque de LEMP reste à étudier (Felipe von Glehn and al., 2012).

Ainsi, un faisceau d'arguments est en faveur d'une implication des LB dans la physiopathologie de la SEP :

- La stabilité au cours du profil oligoclonal, en dépit des thérapeutiques agressives, ainsi que la persistance des mêmes clones de LB et de plasmocytes.
- La production intrathécale d'IgG dirigée contre de multiples pathogènes qui ne sont pas censés être impliqués dans la pathogénie de la SEP, indique une niche au sein du SNC permettant la persistance de certains clones de cellule de la lignée B productrice d'immunoglobuline.
- La persistance, l'extension et la pénétration de LB dans le LCR et au sein du SNC.
- Les LB mémoires et les plasmoblastes sont les principales cellules de la lignée B présentes dans le LCR de patient SEP; leur nombre est corrélé à la maladie.
- La présence de follicule B-like au niveau de la méninge de certains patients.



- La production de facteur de survie des LB (BAFF) et de facteur chimio-attractant (CXCL13) par les cellules résidentes du SNC.

Dans ce contexte, où le rôle des LB dans la SEP ne peut être nié, et devant la stabilité du profil IgG, les travaux conduits actuellement par l'équipe de Villar principalement sur l'intérêt des IgM dans la SEP suscitent un intérêt certain. En effet, 95% des patients présentent des BOG et environ 40% des bandes oligoclonales de type IgM (BOM) (Villar L.M. and al., 2002a) et cette présence de BOM serait en lien avec l'évolution clinique de la SEP (Villar L.M. and al., 2003 ; Perini P. and al., 2006 ; Jongen P.J. and al., 2007 ; Mandrioli J. and al., 2008).

Si le profil IgM est aussi stable que le profil IgG et qu'il présente un intérêt pronostique, il serait pertinent de maîtriser les techniques permettant de le mettre en évidence afin d'orienter la décision thérapeutique dès les premières années du diagnostic.

La recherche de facteur pronostique de la pathologie n'est pas récente. Depuis de nombreuses années, des facteurs pronostiques de la progression du handicap sont recherchés. Mais les quelques marqueurs potentiels d'évolution comme l'âge de début avancé, le sexe masculin, les symptômes pyramidaux ou cérébelleux à la première poussée (Runmarker B and al., 1993 ; Trojano M and al., 2002) ne sont pas applicables à des cas particuliers. De plus, le terme de formes bénignes de SEP (EDSS<3 après 10 ans d'évolution) n'est parfois applicable de façon intra-individuelle qu'un temps donné de la pathologie et ne présage en rien de l'évolution au long cours de la SEP.

Nous allons donc dans un premier temps exposer les données actuelles de la littérature concernant l'index et le profil IgM intrathécale chez les patients SEP puis nous exposerons les enjeux d'une telle découverte. Enfin nous présenterons les premiers résultats, constituant la mise au point technique autour de la détection des IgM dans le LCR. En effet, des problèmes méthodologiques en rapport avec la détection des BOM mais également de l'interprétation des résultats restent à surmonter (Sharief MK and Thompson EJ. 1991 ; Villar LM and al., 2005 ; Stauch C and al., 2011).

## 5. IgM ET SEP

### 5.1. Premiers travaux mettant en évidence l'implication des IgM dans la SEP

L'implication des IgM dans les lésions de SEP est connue depuis plusieurs années avec un rôle pathologique mis en évidence en 1981 par l'observation de lésions démyélinisantes après injection d'IgM au sein du SNC chez l'animal (Lassmann H. and al., 1981). Depuis, l'étude anatomopathologique de tissus de patients atteints de SEP a permis de mettre en évidence la colocalisation d'IgM et de fragments de compléments activés aux limites de lésions démyélinisantes de SEP. Au niveau du LCR, une corrélation a pu être faite entre le taux d'IgM, la concentration de C<sub>3</sub>, de MBP (myelin basic protein) et l'index de démyélinisation (Frequin STFM and al., 1992 ; Gay FW and al., 1997 ; Genain CP. and al., 1999). Le mécanisme de la phagocytose, médié par les Ig et le complément, est présent dans le processus démyélinisant dès les premiers stades de la pathologie (Breij EC. and al., 2008). En parallèle, la maturation de LB au sein de structures lymphoïdes-like localisées au niveau des méninges de patients porteurs d'une SEP (Corcione A. and al., 2004 ; Magliozzi R. and al., 2007) a été mis en évidence.

A l'inverse, il a été mis en évidence l'existence de récepteurs capables de fixer spécifiquement la partie Fc des IgM (Fc $\alpha$ / $\mu$ R) sur les oligodendrocytes et leurs précurseurs ainsi que sur la myéline attestant d'un lien entre ces différentes entités. Ces récepteurs ne sont pas présents sur les astrocytes (Nakahara J and al., 2002).

C'est à partir de 2002 que l'on trouve dans la littérature les premières données sur la valeur pronostique des IgM chez les patients SEP. Ces travaux conduits par l'équipe de Villar (2002) ont recherché des profils IgM (ou bandes oligoclonales IgM : BOM) dans le LCR chez les patients atteints de différentes pathologies neurologiques :

- i. Infections du système nerveux central (SNC),
- ii. SEP,
- iii. Affections inflammatoires neurologiques autres (Guillain-barré (GB), vascularite, myélite, Behçet, sarcoïdose),

- iv. Affections neurologiques autres (pathologies neurodégénératives, syndromes paranéoplasiques, épilepsie, polyneuropathies et accidents vasculaires cérébraux (AVC)).

Des BOM ont été mis en évidence chez 71,4% des patients porteurs d'infections du SNC ainsi que chez 46,2% des patients porteurs de SEP.

Au sein des 46,2% de patients SEP avec BOM, on retrouve 32,4% de patients avec une SEP-RR (43,8% dès la 1<sup>ère</sup> poussée), 87,5% de SEP-SP et 71,4% de SEP-PP.

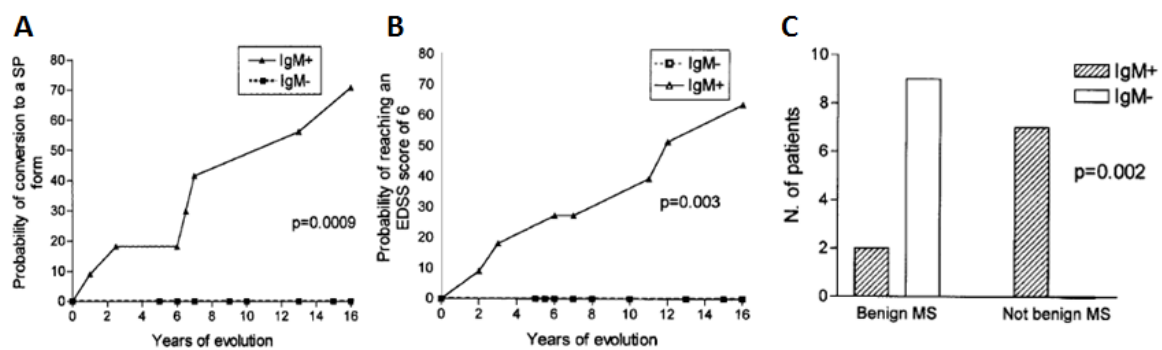
La même étude, menée sur un groupe de 29 patients SEP évoluant depuis plus de 2 ans, a retrouvé des BOM chez 87,5% de forme SP (7/8), 60% de forme PP (3/5) et 18,8% de forme RR (3/16) avec une différence significative entre le groupe de SEP-RR et celui de SEP-SP. Il n'y a pas de corrélation entre la présence de BOM et le sexe, l'âge, l'âge de début de la maladie, le nombre de poussées antérieures, l'index IgG et le nombre de cellules dans le LCR. Une association est par contre mise en évidence avec le taux d'albumine bien que beaucoup aient un taux d'albumine dans les normes ( $p=0,04$ ), l'EDSS (plus élevé chez les patients BOM+) ( $p=0,017$ ) et le type de SEP (plus fréquemment de type SP) ( $p=0,013$ ).

Le faible pourcentage de patient BOM+ au premier épisode démyélinisant ne semble pas être corrélé à l'intensité de la poussée (Villar LM. And al., 2002a). Dans ce sens, on peut se poser la question d'un risque d'évolutivité vers une forme SP (plus sévère qu'une forme RR) plus important chez les patients BOM+ plutôt que d'un lien direct et éphémère imputable à l'évènement démyélinisant en cours.

Les travaux de Villar portant sur 22 patients dont 10 BOM+ démontrent que ces derniers présentent une évolution plus péjorative. En effet, les patients BOM+ présentent un risque plus élevé de convertir leur CIS en SEP cliniquement définie (90% de conversion après 8 mois de suivi contre 51% après les 36 mois de suivi pour les patients BOM-) ( $p=0,0001$ ). De plus, au terme de la période de suivi, les patients BOM+ ont présenté un risque de poussées et un score EDSS plus élevé (respectivement : 2 contre 0,58 ( $p=0,02$ ) et 1.7 contre 0,79 ( $p=0,02$ )) (Villar LM and al., 2002b).

Un second travail conduit sur 29 patients SEP avec un recul de 5 à 16 ans après le premier évènement démyélinisant montre que 70,8% des patients BOM+ évoluent vers une SEP-SP

contre aucun patient BOM-. De plus, 63,6% des patients BOM+ atteignent l'EDSS 6, alors qu'aucun patient BOM- n'a atteint l'EDSS 3. A la fin de l'étude, les patients BOM+ ont un EDSS moyen de 4,64, contre 1,31 pour les patients BOM-. Dans 82% des cas, les patients porteurs d'une SEP bénigne (EDSS  $\leq 3$  pendant les 10 premières années de la pathologie) n'ont pas de BOM. A l'inverse, les patients ne remplissant pas les critères de SEP bénigne présentent tous des BOM (Villar LM and al., 2003) (Fig. 14)



**Figure 14** : Lien entre BOM et évolution de la SEP **A-** Effet de la présence de BOM ou non sur la conversion SEP-RR/SEP-SP. **B-** Effets de la présence de BOM ou non sur l'EDSS. **C-** Effets de la présence de BOM ou non sur la forme de SEP (bénigne ou non). D'après Villar LM and al., 2003

Il semble donc y avoir une corrélation entre la présence de BOM et une évolution péjorative. De plus, des travaux ont permis de mettre en évidence la stabilité des BOM dans le temps, tout comme les IgG permettant de confirmer qu'il s'agit bien d'un mécanisme stable dans le temps (deuxième ponction lombaire réalisée avec plus d'un an d'écart) (Walsh and al., 1986 ; Villar LM and al., 2003).

## 5.2. Les IgM anti-lipides

Des travaux plus spécifiques sur les IgM mises en évidence dans la SEP ont permis de constater que certaines étaient dirigées contre des composants lipidiques comme les gangliosides (Sadatipour BT and al., 1998) ou les sulfatides (Mata S and al., 1999).

L'effet délétère des IgM dirigées contre des composants lipidiques dans le processus de démyélinisation/remyélinisation a été objectivé *via* des travaux utilisant des cellules hybrides (O1) produisant des IgM anti-galactocérobroside implantées au niveau de la moelle

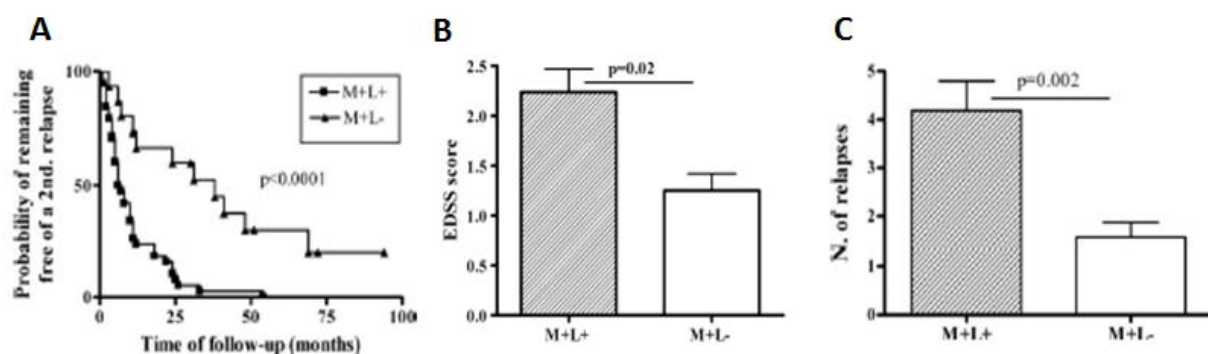
épinière chez des rats. Ces IgM sont responsables chez l'animal de lésions démyélinisantes suivies d'une remyélinisation sans implication évidente des LT (Rosenbluth and al., 1999). Leur toxicité est dépendante de l'antigène reconnu. En effet, les galactocérobrosides sont des lipides entrant dans la composition de la myéline mais également des oligodendrocytes matures, par contre les précurseurs cellulaires des oligodendrocytes n'en contiennent pas, permettant une remyélinisation. A l'opposé, l'utilisation d'IgG3 anti-galactocérobrosides n'entraîne pas de démyélinisation (Rosenbluth and al., 1994). Par contre, les IgM anti-sulfatides entraînent une démyélinisation sans remyélinisation secondaire sauf en cas de dégénérescence des cellules hybrides (Rosenbluth and al, 2003) car les sulfatides entrent dans la composition de la myéline et des oligodendrocytes mais également dans celle des précurseurs oligodendrogliales.

Quarante-quatre pourcents des patients SEP présentent des IgM réactifs contre la myéline et les oligodendrocytes, particulièrement chez les patients porteurs d'une SEP-SP. Une recherche plus spécifique d'IgM anti-gangliosides a permis de mettre en évidence 30% d'IgM anti-GD2-like et 10% d'IgM anti- GD1a et/ou GD3. Plus de 85% des patients SEP avec des IgM anti-GD2-like présentent une réactivité envers la myéline et les oligodendrocytes. De plus ces patients présentent un score EDSS plus élevé que les patients séronégatifs (Marconi S and al, 2006).

Ces IgM anti-lipides sont très probablement produits par un sous-type particulier de LB : les LB CD5+ ou LB de type 1. Pour rappel, ces LB présentent la particularité de produire une réponse IgM persistante (très peu de commutation de classe). Ils produisent des anticorps dit « naturels » dirigés contre des antigènes non protéiques et spécialisés dans les réponses directes à des antigènes comportant des motifs répétitifs (typiquement des constituants d'origine bactérienne tels que les polysaccharides). Les IgM alors produits sont peu spécifiques et de par leurs propriétés, plus adaptés à ce type de réponse que les IgG (Berland R and al., 2002, Boes M and al., 2000).

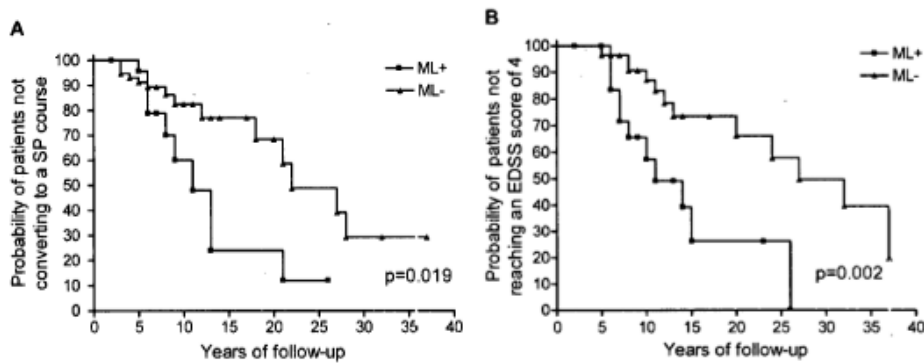
Dans des conditions normales, les motifs répétitifs ne sont pas capables d'activer les LB immatures, à l'exception des LB-1 qui répondent directement à ce type de stimulation.

La constatation de BOM fait suspecter, comme pour les IgG, la persistance d'un clone spécifique capable de produire de façon constante ces IgM. Chez les patients SEP, il a été constaté que ce type lymphocytaire était plus important dans le LCR en comparaison à d'autres pathologies neurologiques (Mix E and al., 1990 ; Bongioanni P and al, 1996). Leur augmentation est particulièrement mise en évidence dans les formes agressives (Bongioanni P and al, 1996) et une corrélation a pu être faite entre une forte augmentation des LB-1 et la présence de BOM (Villar LM. and al., 2005) puis quelques années plus tard avec la présence d'IgM anti-lipides (Villar LM. and al., 2007). En effet, une étude portant sur 54 SEP BOM+ suivies pendant 61,1 mois $\pm$ 2,7, a mis en évidence chez les patients BOM+ une seconde poussée plus précoce, un nombre plus important de poussées et un score EDSS plus élevé. De plus, 8 de ces patients ont bénéficié d'une seconde PL à plus d'un an d'écart permettant de mettre en évidence la persistance des BOM anti-lipides (BOM-L+) dans le temps à la différence des patients BOM-L- c'est à dire présentant des IgM non spécifiques de lipides (Villar LM. and al., 2007) (Fig.15).



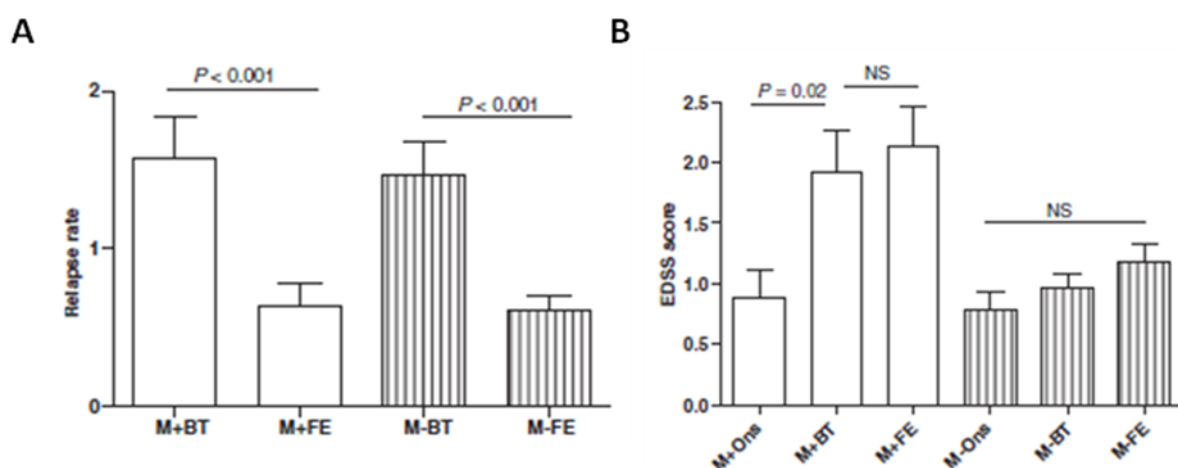
**Figure 15** : Lien entre BOM anti-lipides et évolution de la SEP **A-** Intervalle libre entre la 1<sup>ère</sup> et la 2<sup>nd</sup> poussées en fonction du profil IgM (spécificité anti-lipide (L+) ou non (L-)). **B-** Variation de l'EDSS en fonction de la spécificité des IgM (L+ ou L-). **C-** Nombre de poussées en fonction de la spécificité des IgM (L+ ou L-). D'après Villar LM and al., 2007.

Une seconde étude menée sur 81 patients comprenant 24 patients BOM-L+ (dont 14 avec des IgM monoréactives contre la phosphatidylcholine) parmi les 32 patients BOM+ (soit 40% BOM+ dont 75% de BOM-L+) confirme une évolution plus péjorative des patients BOM-L+ associée à des évolutions secondairement progressives plus rapides que chez les patients BOM-L- (11 ans contre 22 ans) ainsi qu'un EDSS 4 atteint plus rapidement (14 ans contre 24 ans) (Thangarajh M. and al. 2008) (Fig.16).



**Figure 16 :** Lien entre BOM anti-lipides et évolution vers une forme SP **A-** Risque d'évolution vers une forme SP en fonction de la présence (ML+) ou non (ML-) d'IgM anti-lipide. **B-** Probabilité d'atteindre l'EDSS 4 en fonction de la présence (ML+) ou non (ML-) d'IgM antilipides. D'après Thangarajh M. and al. 2008

Concernant la réponse au traitement, sur une cohorte de 75 patients, les 18 patients BOM-L+ traités dès obtention des critères par un traitement immunomodulateur présentent une réduction significative du nombre de poussées ainsi que de la progression du handicap en comparaison à la période avant traitement. Cette significativité a été mise en évidence chez 25 des 57 patients BOM-L- traités (soit 31,6%) concernant le nombre de poussées mais pas sur la progression du handicap. Cependant, les patients BOM-L- ne présentent pas de changement significatif de leur EDSS qu'ils soient traités ou non, corroborant une évolution moins sévère de ce groupe. En définitive, la présence de BOM-L+ pourrait servir de marqueur pronostique et influencer la décision thérapeutique voir justifier l'utilisation de traitement actuellement de 2<sup>ème</sup> ligne (Garcia-Barragan N. and al., 2009) (Fig 17).

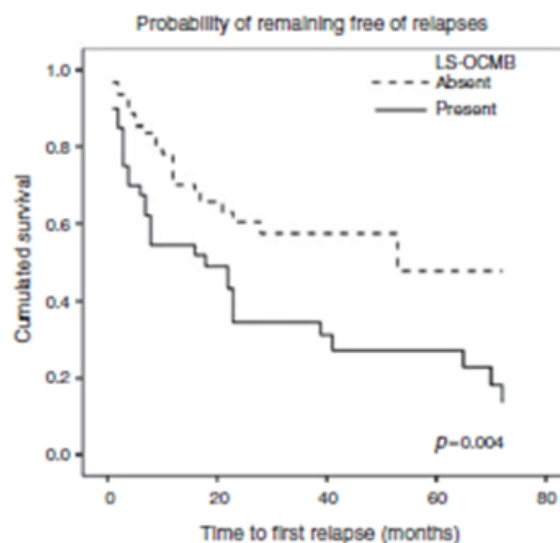


**Figure 17 :** Influence des BOM sur la réponse thérapeutique **A-** taux de poussée chez des patients SEP BOM+ avec (M+) ou sans (M-) IgM anti-lipide, avant (BF) et après 3-4 ans (FE) de traitement immunomodulateur. **B-** Score EDSS chez des patients SEP BOM+ avec (M+) ou sans (M-) profil IgM anti-lipide, au début de la pathologie (Ons), avant (BF) et après 3-4 ans (FE) de traitement immunomodulateur. D'après Garcia-Barragan N. and al., 2009.

Une autre étude, toujours en collaboration avec Villar, portant sur 102 patients traités par immunomodulateur a permis de mettre en évidence que les patients BOM-L+ répondent moins bien aux traitements que les patients n'exprimant pas ces IgM anti-lipides. La présence d'IgM anti-lipides (BOM-L+) constitue donc un marqueur pronostique pouvant permettant de justifier un traitement de 2<sup>ème</sup> ligne d'emblée devant l'hypothèse d'une activité inflammatoire plus importante chez ces patients (Bosca I and al., 2010).

En effet, cette cohorte comprenant 46,1% de BOM-L+ (dont 39,2% BOM-L+) suivi pendant près de 3 ans, objective, chez les patients BOM-L+, un risque de poussées 2 fois plus élevé, une diminution plus faible du taux de poussées (51,8% contre 80,8% ( $p < 0,0001$ )), un taux de poussées plus élevé la 1<sup>ère</sup> année (0,8 contre 0,2 ( $p = 0,001$ )) et une plus faible proportion de patients libres de poussées (25% contre 61,3% ( $p = 0,0003$ )).

Il n'y a pas de différence significative au moment de l'instauration du traitement entre patients BOM-L+ et BOM-L- ayant reçu un traitement immunomodulateur après la 1<sup>ère</sup> poussée (soit 22,5% des patients), ni de différence entre ces 2 groupes concernant la production d'anticorps neutralisant anti-IFN (Fig. 18).



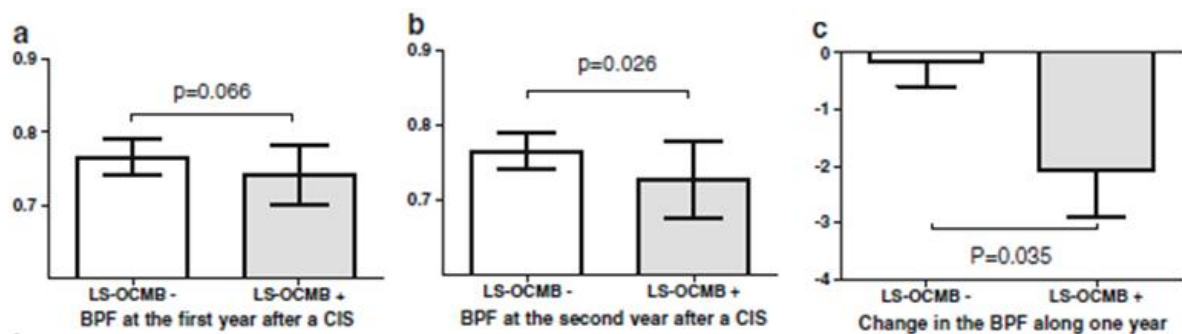
**Figure 18** : Courbe de Kaplan-meier du taux de poussée en fonction de la présence ou non d'IgM anti-lipide au sein d'une population traité par immunomodulateur. D'après Bosca I and al., 2010.

Par ailleurs, une étude de l'équipe de Di Pauli F. publiée en 2010, met également en évidence une corrélation entre la production d'IgM intrathécale et la charge lésionnelle T2 observable en IRM.



### 5.3. Profils IgM anti-lipides et atrophie cérébrale

Une cohorte de 24 CIS a été suivie pendant 2 ans, afin d'évaluer la charge lésionnelle T2 et l'atrophie cérébrale (rapport entre le pourcentage de changement de volume cérébral (PCBV) évalué en T1 et la fraction de parenchyme cérébrale (BPF) évaluée en T2). A la fin de la période de suivi, la charge lésionnelle T2 a augmenté 3 fois plus chez les patients BOM-L+ en comparaison aux patients BOM-L- ( $p=0,001$ ) et l'atrophie cérébrale est plus importante dans le groupe BOM-L+ ( $p=0,03$ ). Durant ces 2 ans de suivi, l'ensemble des patients BOM-L+ ont évolué vers une SEP cliniquement définie contre 35,3% des patients BOM-L-. Un traitement immunomodulateur a été débuté chez 85,7% des patients BOM-L+ contre 35,3% des patients BOM-L- (Magraner M.J. and al., 2012) (Fig. 19).



**Figure 19** : Evolution de l'atrophie cérébrale chez des patients présentant un CIS à 1 (A) et 2 ans (B) de suivi. Le différentiel de BPF (fraction de parenchyme cérébrale) est plus faible chez les patients sans IgM anti-lipides (LS-OCMB-) avec une différence significative avec les patients IgM anti-lipides (LS-OCMB+) (C). D'après Magraner M.J. and al., 2012.

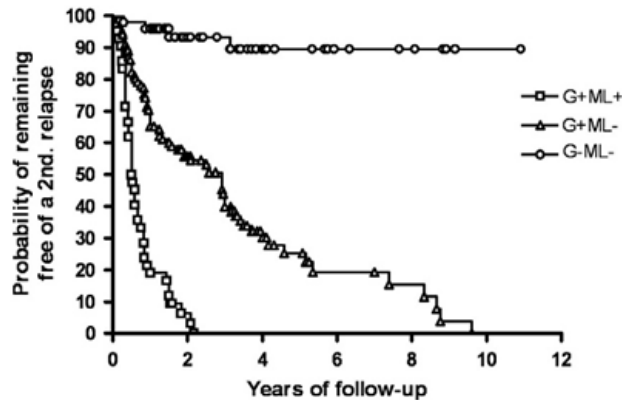
De plus, la comparaison des 7 patients BOM-L+ et des 17 patients BOM-L- (comportant 9 patients sans profil IgG) n'a pas mis en évidence de différence significative entre les 2 groupes à l'exception des symptômes initiaux (pas de neuropathie optique (NO) dans le groupe BOM-L+) (Magraner M.J. and al., 2012). Or, les CIS se manifestant par une NO présentent une plus faible fréquence de BOM-L+ (14%) (Bosca I and al., 2010) ce qui est concordant avec une évolution moins sévère des SEP débutant par une NO (Tintoré M and al., 2010).

Cette étude présente cependant des limites : un nombre faible de patients et une faible durée de suivi pouvant expliquer l'absence de différence mise en évidence sur l'un des

marqueurs de l'atrophie cérébrale (PCBV) et donc la discordance entre deux paramètres d'atrophie cérébrale. De plus, l'impact du traitement immunomodulateur, pris par un plus grand nombre de patients BOM-L+, peut entraîner des modifications de la charge lésionnelle et de l'évolution de l'atrophie cérébrale pouvant expliquer une significativité plus difficile à mettre en évidence entre les 2 groupes. Enfin, la présence de patients sans profil IgG peut être contestable et représente ici 37,5%.

#### 5.4. Profils IgM anti-lipides et CIS

L'étude de l'évolution des CIS chez 192 patients en fonction de la présence (BOM-L+) ou non (BOM-L-) d'IgM anti-lipides a mis en évidence une seconde poussée 3,3 ans après le CIS pour les patients BOM-L- (52,4%) contre 0,7 ans pour les patients BOM-L+ (22%). De façon générale, les patients BOM-L+ ont un risque de poussées 9,3 fois plus élevé que les patients BOM-L- et 39,6 fois plus élevé que les patients sans BOG. En définitive, le profil IgM pourrait permettre d'évaluer le risque de seconde poussée (Bosca I and al., 2010) (Fig.20).



**Figure 20:** Estimation du risque de seconde poussée après un CIS en fonction de la présence d'un profil IgG et IgM anti-lipide (G+ML+) (42 patients), IgG sans IgM anti-lipide (G+ML-) (101 patients) et en l'absence d'IgG et d'IgM anti-lipide (G-ML-) (49 patients). D'après Bosca I and al., 2010.

#### 5.5. Profils IgM anti-lipides et génétique

Un lien entre un haplotype de DRB1\*03 :01 et la présence d'IgM anti-lipides a été mis en évidence *via* un travail conduit sur 1068 patients SEP (Emilio G. de la Concha and al., 2012).

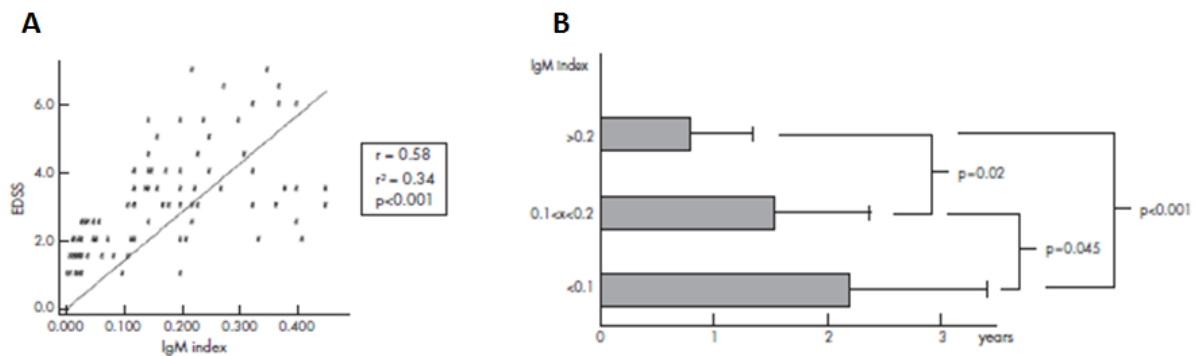
L'association entre DRB1\*03 :01 et la SEP est bien connue en Sardaigne (Marrosu M.G. and al., 1997 ; Marrosu M.G. and al., 2001) mais les données sont hétérogènes pour d'autres populations (Lincoln M.R. and al., 2009 ; Marrosu M.G. and al., 1997 ; Masterman T. and al., 2000 ; Benedek G. and al., 2010 ; Ramagopalan S.V. and al., 2007 ; Barcellos L.F. and al., 2006). Dans le système HLA, des combinaisons spécifiques d'allèles au sein de larges régions sont conservées à travers les générations et appelés haplotype ancestraux (AH). Dans le cas de DRB1\*03 :01, deux haplotypes ancestraux sont connus : AH : 18,2 et 8,1. L'haplotype ancestral 18,2 a pu être associé à un risque plus élevé de production d'IgM anti-lipides (OR=2,98 95% IC 1,36-6,39) et ce, de façon indépendante de la présence de HLA DRB1\*15 :01 (Emilio G. de la Concha and al., 2012).

Seulement 4% des patients avec l'haplotype 18,2 ne présentent pas de BOM. En parallèle, cet haplotype est retrouvé chez 12% des patients avec BOM sous-entendant l'existence d'autres facteurs influençant la production de ces IgM (Emilio G. de la Concha and al., 2012). Au sein de la population espagnole, un groupe de travail a décrit une association entre le risque de SEP et un polymorphisme du promoteur du gène du TNF $\alpha$  (*tumor necrosis factor alpha*) (TNF-376) (Fernandez-Arquero M. and al., 1999 ; Martinez A. and al., 2004). Par la suite, une association entre TNF-376 et la présence d'IgM anti-lipides a été rapportée et mise en relation avec une évolution plus péjorative de la SEP (Villar L.M. and al., 2010). Dans un troisième temps, un lien entre ces constatations et HA 18,2 a pu être fait.

## 5.6. Intérêt de l'index IgM

La mise en évidence d'un profil IgM dans le LCR n'est pas simple, et sa fiabilité voire sa reproductibilité est débattue par certains auteurs (Stauch C. and al. 2011). L'index IgM a notamment été étudié et un lien avec la sévérité de la SEP a conduit à des résultats similaires avec une 2<sup>ème</sup> poussée survenant d'autant plus tôt que l'index IgM est élevé.

Les patients avec un index IgM>0,2 présentent en moyenne une 2<sup>nde</sup> poussée dans les 9 mois contre 2,2 ans pour les patients sans IgM (index IgM<0,1). Concernant la progression de l'EDSS à 15 ans, on retrouve également une corrélation avec l'index IgM mesuré au moment du diagnostic (p<0,001 ; r=0,58) (Perini P. and al., 2006) (Fig. 21).



**Figure 21** : Lien entre index IgM et évolution de la SEP **A-** Corrélation entre index IgM et le score EDSS après 14,4 ans (SD 2,1) de suivi chez 80 patients. **B-** Intervalle libre entre la 1<sup>ère</sup> et la 2<sup>nde</sup> poussée en fonction de l'index IgM. D'après Perini P. and al., 2006.

Cependant dans cette étude, les patients avec index IgM élevé présentent des évolutions moins péjoratives en comparaison aux travaux de Villar (Villar LM and al., 2003) possiblement dûes aux traitements immunomodulateurs dispensés à 66,6% des patients (index IgM>0,2 et EDSS<3).

Des travaux visant à étudier l'influence de l'index IgM sur l'évolution IRM ont également été conduits permettant de mettre en évidence des évolutions radiologiques d'autant plus défavorables que l'index IgM est élevé.

Le premier travail conduit sur 33 patients porteurs d'une SEP cliniquement définie (17 SEP-RR et 16 SEP-SP) permet de suspecter un lien entre index IgM et charge lésionnelle T2 dans les SEP-RR et -SP, ainsi qu'entre l'index IgM et la charge lésionnelle T1/atrophie cérébrale dans les SEP-RR. Cela n'est pas retrouvé dans le cas de l'index IgG (Jongen Peter J.H. and al., 2007). Ces résultats doivent être interprétés avec précaution au vu du nombre limité de patients et de la présence de SEP-SP. En effet, les formes SP sont plus souvent BOM+ suggérant un index plus élevé également. De plus, la charge lésionnelle est souvent plus élevée dans les formes SP que RR tout comme l'atrophie cérébrale.

Une autre étude conduite chez 57 patients a mis en évidence une corrélation entre l'index IgM et le nombre de lésions prenant le contraste à la phase initiale ( $p=0.01$ ) ainsi qu'entre l'index IgM et l'augmentation de la charge lésionnelle pendant la période de suivi (49 mois en moyenne (36-60mois)) ( $p=0,02$ ). L'étude par sous-région a mis en évidence une corrélation entre l'augmentation de la charge lésionnelle périventriculaire et l'index IgM ( $p=0,004$ ). Il n'a cependant pas été mis en évidence de corrélation entre l'index IgM et l'EDSS

d'inclusion ( $p=0,6$ ), la progression de l'EDSS ( $p=0,9$ ) ou l'EDSS à la fin de la période de suivi ( $p=0,99$ ) ni entre l'index IgM et le nombre de poussées durant la période de suivi ( $p=0,34$ ). Les patients présentant les critères Mac Donald 2010 à la fin de la période de suivi ont un index IgM plus élevé que les patients ne remplissant pas ces critères ( $p=0,001$ ). Il n'a pas été mis en évidence de corrélation entre l'index IgG et les données IRM (Durante L. and al., 2012).

### **5.7. Les détracteurs**

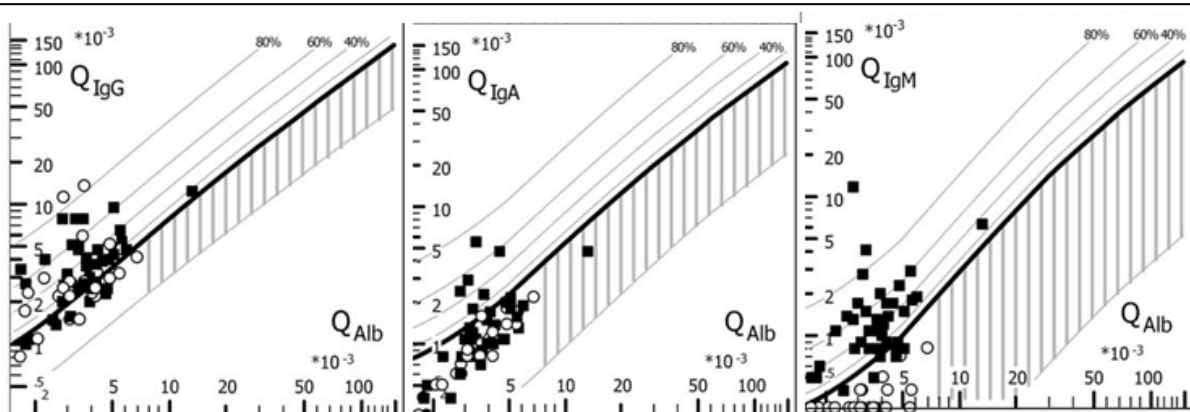
Des études viennent contredire les résultats mis en évidence dans les publications précédentes.

Le premier travail publié démentant la valeur pronostique des IgM dans le LCR chez les patients SEP présente les biais d'un recueil téléphonique directement auprès du patient. En effet, dans ce contexte des variables interindividuelles sont à prendre en compte comme l'appréciation personnelle de la pathologie ou le vécu de la pathologie sur un recul pouvant aller jusque 8 ans. Conduite sur 42 patients ayant présenté un CIS avec BOG, elle a permis de mettre en évidence des BOM chez 74% d'entre eux. L'enquête téléphonique dans les 21 à 106 mois suivant le CIS à la recherche du nombre de poussées n'a pas permis de mettre en évidence une corrélation entre la présence de BOM et une évolution plus défavorable (évaluée par le nombre de poussées) (Schneider R. and al., 2007).

Une seconde étude conduite sur une cohorte pédiatrique de SEP (Stauch C. and al. en 2011) n'a pas mis en évidence de corrélation entre index IgM et progression du handicap. Un lien inverse est même retrouvé avec une évolution moins sévère chez les patients avec un index IgM pathologique et ce en l'absence d'autres facteurs pronostiques péjoratifs (Fig. 22).

EDSS score, median (range)				
	All children	Group 1 IgM positive	Group 2 IgM negative	p-value
1 <sup>st</sup> year	0.0 (0.0–4.0) (n = 70)	0.0 (0.0–3.5) (n = 44)	0.0 (0.0–4.0) (n = 26)	0.939
2 <sup>nd</sup> year	0.00 (0.0–7.0) (n = 62)	0.0 (0.0–6.0) (n = 36)	0.3 (0.0–7.0) (n = 26)	0.695
5 <sup>th</sup> year	0.5 (0.0–6.5) (n = 60)	0.0 (0.0–6.0) (n = 34)	2.3 (0.0–6.5) (n = 26)	0.242
10 <sup>th</sup> year	1.0 (0.0–5.5) (n = 26)	1.0 (0.0–3.5) (n = 13)	3.0 (0.0–5.5) (n = 13)	0.258

**Figure 22** : Lien entre BOM et progression du handicap au sein d'une cohorte pédiatrique de SEP. Evolution de l'EDSS chez 70 SEP pédiatriques à 1 an, 2 5 et 10 ans en fonction de la présence ou non d'IgM intrathécale. D'après Stauch C. and al. en 2011.



**Figure 23** : Données BOM d'une cohorte pédiatrique de SEP vérifiées par le diagramme de Reiber. Comparaison de 70 enfants SEP avec (carré) et sans (cercle) IgM intrathécale (d'après le diagramme de Reiber). D'après Stauch C. and al. en 2011.

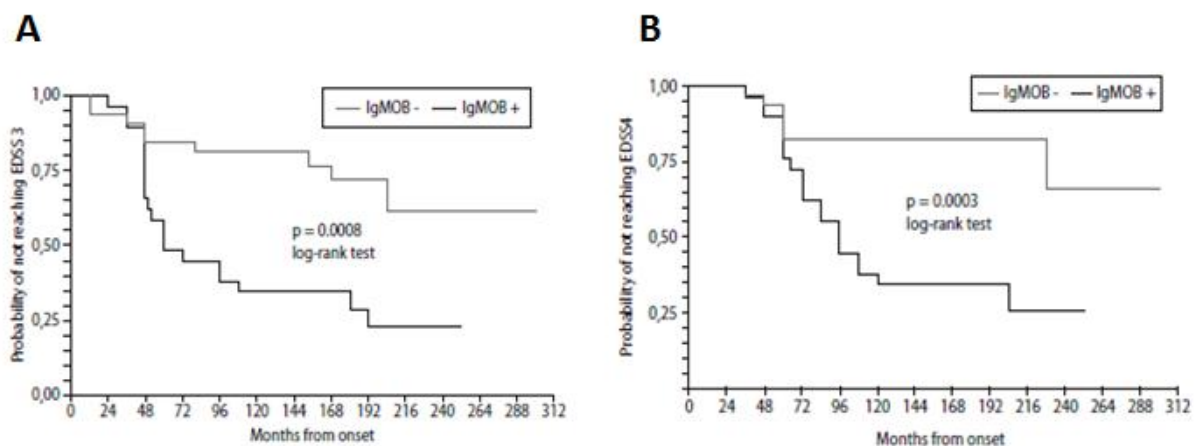
Leur travail se base sur le diagramme de Reiber pour l'interprétation des résultats afin de définir la présence ou non d'une synthèse intrathécale d'IgM. Il met également en évidence un possible biais de détection quantitative et/ou qualitative des IgM et des problèmes de faux positifs et de faux négatifs dans la détection des BOM en reprenant les travaux de l'équipe de Villar. Il soulève également les difficultés techniques liées à la structure pentamérique des IgM (Fig. 23).

En 2012, l'équipe de Villar publie une lettre en réponse au papier de Stauch C. and al ; permettant de refaire un point méthodologique sur la préparation des IgM (Villar LM. And al., 2012). L'importance de la dénaturation des IgM en pH alcalin y est soulignée, permettant ainsi une réduction complète des ponts disulfures (nécessaires à la formation de pentamères des IgM) (Villar LM. And al., 2001). Cette technique étant plus efficace que les méthodes en

pH neutre ou la dégradation incomplète entraîne des artéfacts pouvant être confondus avec des BOM (Schneider R. and al., 2007).

### 5.8. Vers un index pronostique multifactoriel ?

Le travail de l'équipe de Mandrioli J and al. paru en 2008 et portant sur 64 patients SEP confirme le lien entre BOM et score EDSS avec des patients BOM+ atteignant l'EDSS 3 en 48 mois contre 168 mois pour les patients BOM-. Cependant, l'index IgM ne présente pas de valeur prédictive dans cette étude. Cela peut être dû à la sensibilité des BOM plus importante (méthode qualitative) que l'index IgM (méthode quantitative) (Fig. 24).



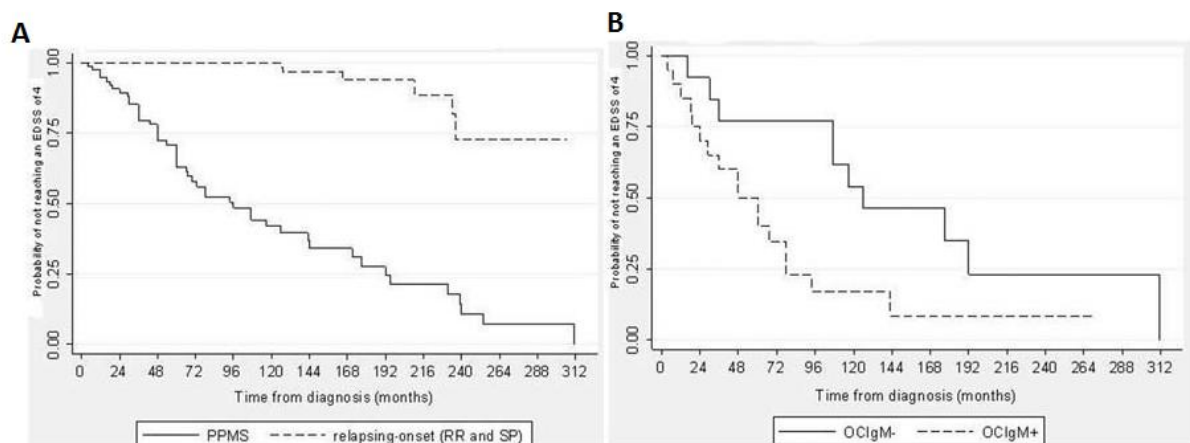
**Figure 24** : Lien entre BOM et progression du handicap **A**- Temps pour atteindre l'EDSS 3 en fonction de la présence ou non de BOM chez des patients SEP. **B**- Temps pour atteindre l'EDSS 4 en fonction de la présence ou non de BOM chez des patients SEP. D'après Mandrioli J and al., 2008.

La recherche de marqueur pronostique individuel a été étudiée dans ce travail et a permis de mettre en évidence que l'étude d'éléments cliniques (syndrome pyramidal, symptômes sensitifs, nombre de mois avant la 2<sup>nde</sup> poussée) ainsi que de paramètres biologiques (comme la présence ou non de BOM) permettaient de définir un risque individuel d'évolution péjorative chez 58 des 64 patients étudiés, soit un risque d'erreur de 9,4%. La même étude sur une cohorte de 65 SEP-RR retrouve un risque d'erreur globale de 12,3% soit 4 patients sur 45 classés SEP bénigne (EDSS≤3 après 10 ans d'évolution) et 4 patients sur 20 classés SEP sévère (soit un EDSS≥4 après 10 ans d'évolution).

## 5.9. Les perspectives : une meilleure compréhension de la pathologie ?

Les travaux de Villar de 2009 remettent en cause la vision uniciste de la SEP. En effet, l'étude des profils oligoclonaux de patients SEP a permis de mettre en évidence un *distingo* entre les SEP-PP et les SEP-RR/SP. Beaucoup de SEP-PP présentent un profil IgG dans le sang et le LCR avec quelques bandes surnuméraires dans le LCR. A l'inverse, les SEP-RR et SP présentent un profil IgG exclusivement dans le LCR. Concernant les profils IgM, les SEP-PP n'en présentent pas alors qu'ils sont retrouvés chez 31% des SEP-RR et 60% des SEP-SP (Villar LM. and al, 2009).

Une étude sans collaboration avec l'équipe de Villar, publiée en 2010 par l'équipe de Sola P., conclut également à un mécanisme pathologique différent entre SEP-PP et SEP-RR avec la constatation de BOM chez 13% des SEP-PP sans influence sur la progression de l'EDSS contre 46% des SEP-RR avec une évolution plus péjorative pour ces derniers (Sola P. and al., 2010). Ils retrouvent également une évolution plus péjorative dans le cas de formes PP en comparaison aux formes RR et SP. Cependant la différence d'évolution des courbes de Kaplan Meier entre les 2 graphiques concernant les formes RR et SP est assez surprenante (Fig.25).



**Figure 25 :** A- Probabilité d'atteindre l'EDSS 4 pour les SEP-PP (PPMS) et les SEP à début RR (RR et SP). B- Probabilité d'atteindre l'EDSS 4 pour les SEP à début RR (RR et SP) en fonction de la présence (OCIGM+) ou non (OCIGM-) de BOM. D'après Sola P. and al., 2010.

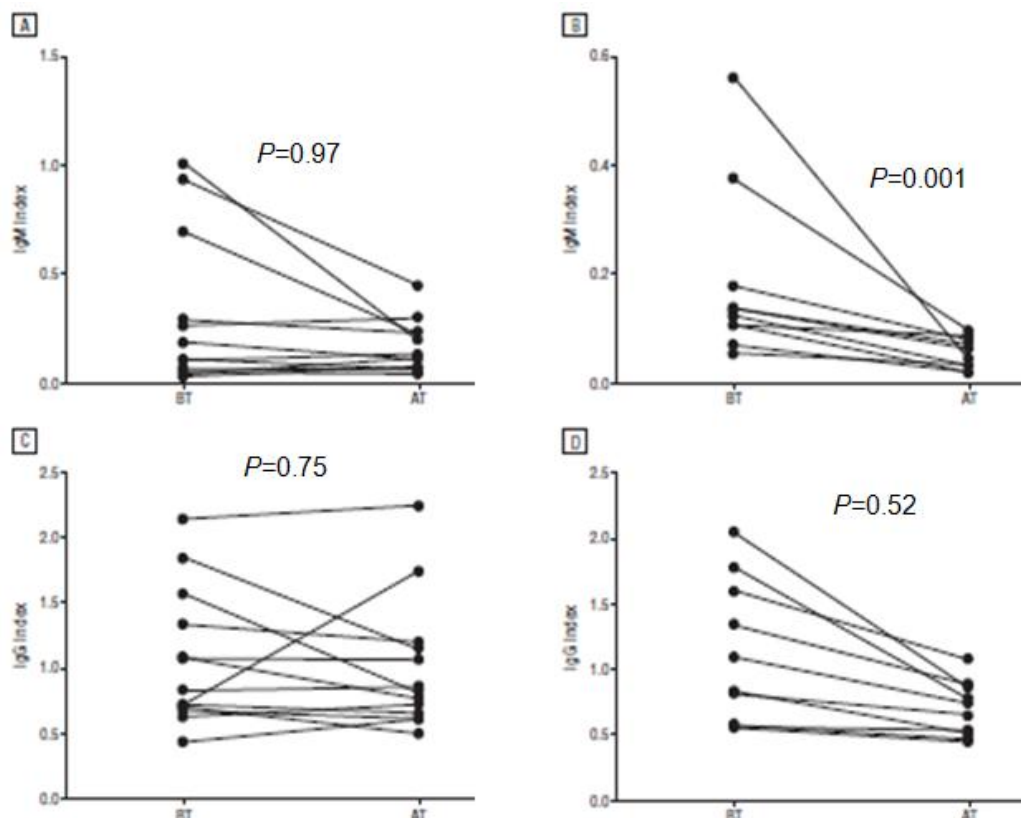
Plus récemment, des travaux conduits par l'équipe de L.M. Villar sur 23 patients SEP traités par natalizumab ont mis en évidence un lien entre réponse thérapeutique et BOM. Dix



patients (43,5%) étaient libres d'activité durant le suivi (médiane de 24 mois). Treize patients (56,5%) ont présenté des poussées ou de nouvelles lésions sous traitement.

La comparaison des 2 groupes n'a pas retrouvé de différence significative tant sur le plan clinique que radiologique avant le début du traitement.

Dans le groupe libre d'activité, l'index IgM diminue de façon significative ( $p=0,001$ ) pour atteindre des valeurs inférieures à 0,1 (valeur seuil limite définissant une synthèse intrathécale d'IgM) et chez 70% des patients une disparition de BOM est objectivée à la seconde ponction lombaire ( $p=0,003$ ). Un changement du profil IgG est également objectivé dans ce groupe avec une disparition de certaines bandes IgG associée à une diminution significative de l'index IgG ( $p=0,52$ ). Ces effets ne sont pas mis en évidence avec d'autres traitements (A. and al., 2001 ; Confavreux C and al., 1986) où le profil IgG est considéré comme un marqueur stable de la pathologie (Confavreux C and al., 1986). Ces constatations ne sont pas retrouvées dans le groupe où une activité persiste, que ce soit clinique, radiologique ou radio-clinique. En effet, même si 50% des patients « actifs » présentent une diminution de l'index IgG, IgM et/ou du profil IgM intrathécal, aucune de ces diminutions n'est significative (Villar L.M. and al., 2012) (Fig. 26).



**Figure 26 :** Lien entre index IgM et efficacité du natalizumab **A et C-** Evolution de l'index IgM et IgG chez des patients actifs sous natalizumab. **B et D-** Evolution de l'index IgM et IgG chez des patients non actifs sous natalizumab. D'après Villar L.M. and al., 2012.

L'étude cellulaire conduite sur le LCR de 12 patients (6 dans chaque groupe) présentant un profil IgM avant et après 1 an de traitement a mis en évidence une diminution significative du taux de LB ( $p=0,01$ ) intéressant les LB CD5+ (ou LB-1) ( $p=0,007$ ), LB CD5- ( $p=0,01$ ) et CD38+ (plasmoblastes) ( $p=0,009$ ) avec une disparition quasi-complète des CD5+ et CD38+ chez les patients « non actifs ». Les patients « actifs » ne présentent pas de diminution significative des LB que ce soit sur le plan général ou au niveau des différents sous-types.

Par contre, une diminution de la chimiokine CXCL13 est objectivée de façon significative et ce quel que soit le groupe ( $p=0,002$ ). Pour rappel, CXCL13 est une chimiokine attirant les LB sur le site d'intérêt *via* son récepteur le CXCR5 exprimé à la surface des LB.

De même, une diminution significative du taux de LT CD4+ est objectivée (actif :  $p=0,008$  ; non actif :  $p=0,002$ ), associée à une augmentation du taux de LT CD8+ (actif :  $p=0,004$  ; non actif :  $p=0,002$ ) (Villar L.M. and al., 2012).

Les raisons de la différence d'influence du natalizumab sur ces populations de LB ne sont pas expliquées mais différentes hypothèses ont été émises comme une différence d'expression de VLA-4 au niveau des LB consécutive à un niveau d'activation cellulaire différent entre les 2 groupes (Postigo A. A. and al., 1991) , ce qui pourrait affecter l'inhibition de la migration des LB par le natalizumab (Niino M and al., 2006). Plus récemment, différents travaux ont été conduits objectivant des mécanismes d'action plus large que la simple inhibition de la fixation du LT à la BHE, ouvrant des perspectives sur une meilleure compréhension de la pathologie au travers de mécanismes neuro-immunologiques encore inconnus dans la SEP (Ransohoff RM. and al., 2007 ; Lindberg RL. And al., 2008 ; Rossi S. and al., 2013).

## 6. ENJEUX ET OBJECTIFS DU TRAVAIL

Actuellement, de nombreux traitements sont ou vont être mis à la disposition des patients, en particulier dans les formes rémittentes. Leur efficacité sur le nombre de poussées annuelles et la progression du handicap entre autres est variable.

L'importance d'un traitement efficace et précoce dans la SEP a été démontrée à travers différents travaux avec en particulier une absence d'influence des traitements une fois l'EDSS 3 atteint (Leray E. and al., 2010).

Dans ce contexte, nous sommes en droit de nous poser la question de l'intérêt de revoir notre schéma thérapeutique actuel. En effet, nous procédons par escalade en fonction de l'évolution clinique du patient. Mais au vu de ces travaux une démarche inverse peut être discutée avec l'utilisation de thérapeutique moins agressive dans un second temps afin de maintenir un contrôle sur la pathologie.

Cependant ce type de prise en charge thérapeutique présente des risques d'effets indésirables non négligeables et ne peut être entrepris qu'après une justification clinique d'un risque d'évolution péjorative.

A l'heure actuelle, nous ne disposons pas de marqueurs pronostiques permettant de présager d'une évolution sévère ou non à l'échelle du patient. Les travaux récents menés sur les IgM dans le LCR, que ce soit sous forme d'index ou de profil, pourraient nous permettre d'adapter notre prise en charge de la SEP sous réserve de vérification par d'autres équipes.

Notre travail a pour but de vérifier l'hypothèse de l'équipe de Villar en analysant le LCR de patients diagnostiqués et prélevés au moment du diagnostic et pour lesquels nous disposons des données relatives à l'évolution de leur pathologie sur plusieurs années. Ainsi, nous avons les moyens théoriques de vérifier que l'index et ou le profil IgM dans le LCR présentent une valeur pronostique à l'échelle individuelle. La LCRthèque dont nous disposons, en association avec la base de données EDMUS permet ce type de travail rétrospectif avec un temps de suivi important.

## **7. MATERIELS ET METHODE**

### **7.1. Méthodologie clinique : sélection des patients**

La population de l'étude a été recrutée parmi les patients suivis au sein du service de neurologie du CHU de Nancy depuis 2002 suite à une première manifestation clinique compatible avec un premier évènement démyélinisant d'une part et ayant accepté d'intégrer la cohorte LORSEP (réseau lorrain pour la prise en charge de la sclérose en plaques) d'autre part. Le LORSEP est un réseau ville-hôpital régional créée en 2002 et qui a entre autres pour objectifs de coordonner et d'assurer la continuité des soins à proximité du lieu de vie des patients, d'uniformiser la prise en charge et de faciliter la recherche sur la SEP. Les caractéristiques démographiques des patients ainsi que de leurs données cliniques, radiologiques et biologiques au moment du diagnostic, de leurs thérapeutiques de fonds et des données concernant leur suivi clinique et radiologique sont collectées grâce au logiciel EDMUS (European Database of Multiple Sclerosis) permettant la constitution du registre lorrain de la SEP (ReLSEP).<sup>37</sup> Ce logiciel largement utilisé dans les centres français (essentiellement les CHRU) et européens permet l'adoption d'un langage commun pour la description médicale des patients atteints de SEP. En mettant en exergue les informations décisives et pertinentes, elle facilite le suivi médical et l'échange des informations entre médecins.

Au cours de leur prise en charge, ces patients ont entre autres, bénéficié d'une PL et d'une prise de sang dans le but de rechercher la présence de bandes oligoclonales (BOC) dans le LCR, signature biologique d'une réaction neuro-inflammatoire. Les prélèvements de sérum et de LCR effectués chez ces patients ont été conservés à -80 °C et constituent aujourd'hui une collection de plus de 2000 échantillons déclarée aux autorités de santé (responsable : Dr Catherine Malaplate-Armand, Laboratoire de Biochimie - Biologie Moléculaire, Hôpital central, CHU de Nancy).

Parmi les patients appartenant à la cohorte LORSEP et ayant bénéficié d'une recherche de BOC dans le LCR au laboratoire de biochimie du CHU de Nancy, nous avons établi une première sélection de patients ayant présenté soit une évolution favorable soit une évolution défavorable selon les critères décrits ci-dessous.

Les patients sélectionnés ont signé un consentement dans le cadre du registre lorrain de la SEP.

- Critères d'inclusion :

Présence de BOC au moment du diagnostic initial

- Critères d'exclusion :

Absence de BOC au moment du diagnostic initial

Refus de signature du consentement éclairé *a posteriori*

Des critères d'évolution favorable et défavorable ont été appliqués sur un groupe de patients dont le diagnostic de SEP avait été posé entre 2001 et 2003. Ainsi, 15 patients ont été retenus dans le groupe dit d'évolution favorable (FAV) et 3 patients ont été sélectionnés pour le groupe dit d'évolution défavorable (DEF).

Critères d'évolution dit «favorable» :

- EDSS considéré comme stable (aggravation strictement  $< 1$  point comparativement à l'EDSS effectué 6 mois après l'épisode initial);
- EDSS  $\leq 2$ ;
- Absence de poussées au cours des 2 dernières années;

Critères d'évolution dit « défavorable » (les patients doivent avoir les 3 critères suivants associés):

- EDSS aggravé d'au moins 2 points comparativement à l'EDSS effectué 6 mois après l'épisode initial;
- EDSS  $\geq 4$ ;
- Au moins une poussée dans l'année précédente

## **7.2. Méthodologie biologique**

### **7.2.1. Prélèvements et traitement pré-analytique**

Le sérum et le LCR ont été prélevés simultanément dans le cadre des soins. Après acheminement des tubes selon le circuit classique du CHU de Nancy et réception au laboratoire, les prélèvements sont centrifugés, fractionnés et conservés au maximum 5 jours à 4 °C avant d'être congelés à -20 °C dans l'attente des immuno-dosages et de la recherche de BOC. Après réalisation des différentes analyses biologiques, les échantillons sont conservés à -80 °C.

### **7.2.2. Immunodosages**

#### **7.2.2.1. Dosages de l'albumine et des IgG**

L'albumine et les IgG dans le sérum et le LCR ont été dosées par immunoturbidimétrie à l'aide de l'automate Delta Koné en utilisant les kits réactifs dédiés (Coffret albumine MST Thermo Fisher scientific Oy Réf 981927, Coffret Immunoglobuline G Thermo Fisher scientific Oy Réf 981937) et les kits de calibration (SPECICAL Thermo Fisher scientific Oy Réf 981937) fournis par Thermoficher Scientific. Chaque série est validée à l'aide des contrôles Biorad Lyphocheck assayed chemistry control niveaux 1 et 2 (Réf C320-5).

La technique d'immunoturbidimétrie est basée sur l'immunoprécipitation facilitée par le polyéthylène glycol en présence d'un excès d'anti-sérum spécifique à la protéine à doser. Elle permet de comparer l'intensité lumineuse transmise par le précipité en suspension dans le milieu liquide à celle du faisceau incident. L'augmentation de l'absorbance est mesurée en point final à 340 nm et est proportionnelle à la quantité de protéines spécifiques (albumine ou IgG) dans le prélèvement.

### 7.2.2.2. Dosage des IgM

Les IgM dans le sérum et le LCR ont été dosées par immunonéphélométrie (BNII, Siemens Dade Behring) à l'aide des kits réactifs dédiés (Coffret albumine MST Thermo Fisher scientific Oy Réf 981927, Coffret Immunoglobuline G Thermo Fisher scientific Oy Réf 981937) et les kits de calibration (SPECICAL Thermo Fisher scientific Oy Réf 981937) fournis par Thermofischer Scientific. Il s'agit d'une technique plus sensible que l'immunoturbidimétrie. Elle représente la technique de référence pour le dosage des immunoglobulines dans le LCR car les concentrations attendues peuvent être très basses. Le sérum dilué ou le LCR est incubé en présence d'un anti-sérum spécifique des IgM permettant de faire précipiter le complexe ainsi formé. La néphélométrie permet de mesurer la diffusion de la lumière par le précipité grâce à une cellule photoélectrique. L'intensité du rayonnement dévié est proportionnelle à la concentration de la protéine d'intérêt.

### 7.2.3. Calcul des index IgG et IgM

Le calcul de l'index IgG ou IgM est obtenu à partir des concentrations d'immunoglobulines et d'albumine dans le sérum et le LCR selon les formules suivantes :

$$\frac{[(\text{IgG})_{\text{LCR}}/(\text{IgG})_{\text{sérum}}]}{[(\text{Albumine})_{\text{LCR}}/(\text{Albumine})_{\text{sérum}}]}$$

Soit : quotient IgG/quotient Albumine

$$\frac{[(\text{IgM})_{\text{LCR}}/(\text{IgM})_{\text{sérum}}]}{[(\text{Albumine})_{\text{LCR}}/(\text{Albumine})_{\text{sérum}}]}$$

Soit : quotient IgM/quotient Albumine

### 7.3. Analyse statistique

La saisie des données a été réalisée à l'aide du logiciel Excel.

L'analyse statistique a été réalisée à l'aide du logiciel SigmaPlot 12.0.

Elle a comporté une description des caractéristiques de l'échantillon. Pour cette partie descriptive, les variables quantitatives ont été exprimées par leur moyenne et leur écart-type, leur valeur minimale et maximale, les variables qualitatives ont été exprimées par leur effectif et leur fréquence.

Une comparaison des caractéristiques de la SEP des patients a été réalisée selon que l'évolution est jugée favorable ou défavorable, par des tests non paramétriques (Mann et Whitney) ou paramétrique (*t*-test) lorsque la loi Normale était respectée.

Une comparaison des caractéristiques biologiques des patients a été réalisée selon que l'évolution est jugée favorable ou défavorable, par des tests non paramétriques (Mann et Whitney) ou paramétrique (*t*-test) lorsque la loi Normale était respectée.

Des corrélations clinico-biologiques ont été étudiées par une régression linéaire.

Le seuil de signification ( $p$ ) retenu était de 5 %.



## 8. RESULTATS

### 8.1. Description de la population étudiée

Selon les critères d'évolution favorable ou défavorable décrits dans le matériel et méthodes, nous avons pu sélectionner au sein de la base EDMUS et de façon randomisée, 3 patients d'évolution défavorable et 15 patients d'évolution favorable. Notre cohorte de 18 patients a présenté un premier évènement démyélinisant entre 2001 et 2003 permettant un recul de 11 à 9 ans. La PL a été réalisée en moyenne à 19 mois du diagnostic ou de la confirmation diagnostique de la pathologie (-3 ; 48 mois).

Concernant le groupe d'évolution favorable (FAV), sur les 15 patients initialement sélectionnés, nous avons retenus 10 patients (8 femmes et 2 hommes), les 5 patients exclus correspondent à des patients perdus de vue (durée de suivi inférieure à 2 ans). Le suivi moyen est de 96 mois ( $\pm 21,7$ ) soit 8 ans environ. L'âge de ces patients au moment du diagnostic est de 35 ans ( $\pm 11$ ). Sur l'ensemble de ces patients, 8 ont bénéficié d'un traitement immunomodulateur (type interféron et acétate de glatiramère). Deux patients sont restés sans traitement de fond. Aucun n'a bénéficié de traitement immunosuppresseur. L'EDSS médian au moment du diagnostic est de 1,2 ( $\pm 1$ ). L'EDSS à la fin de la période de suivi était de 1,8 ( $\pm 0,9$ ). La première poussée (tableau récapitulatif : figure 29) est survenue sous forme de névrite optique rétrobulbaire (NORB) chez 3 patients, de troubles sensitifs purs chez un patient ou associé à une NORB (1 patient), de troubles vésico-sphinctériens (1 patient) ou bien associant NORB, troubles sensitifs et troubles vésico-sphinctériens (1 patient). Des troubles vestibulo-cochléaires ont été retrouvés chez un patient. Deux patients ont présenté une poussée motrice en association à des troubles sensitifs (1 patient) ou des troubles sensitifs et vésico-sphinctériens (1 patient). Un des patients ayant présenté une première poussée associant NORB, troubles sensitifs et troubles vésico-sphinctériens ne présente pas de seconde poussée après un suivi de 6 ans et demi. Pour les 9 autres patients, l'intervalle entre la première et la seconde poussée était de 19,4 mois ( $\pm 11,3$ ). Aucun de ces patients n'a évolué vers une forme SP (Tableau I).

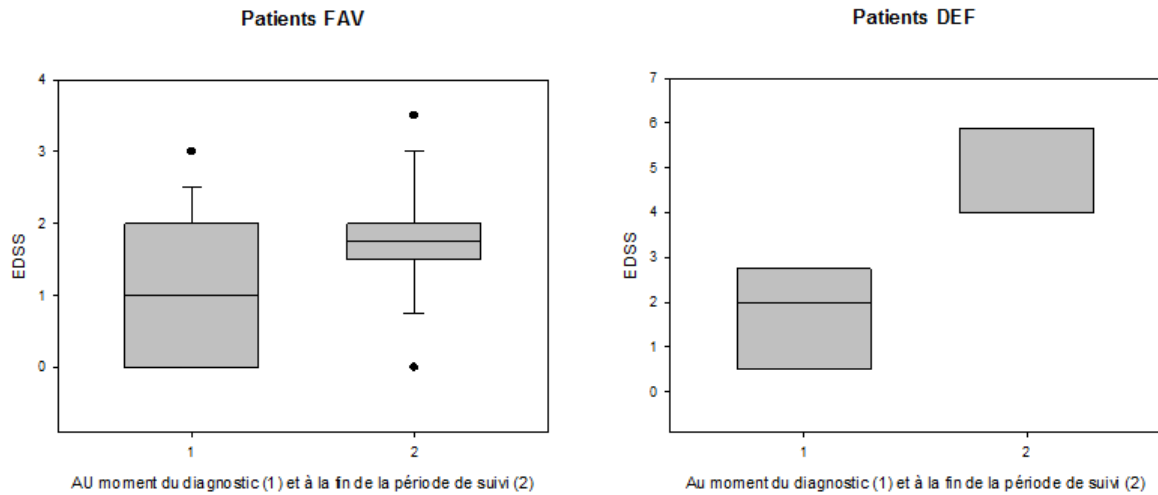
Patients FAV	NORB	Déficit sensitif	Déficit moteur	Troubles vésico-sphinctériens	Troubles cochléo-vestibulaire
1	X				
2	X				
3	X				
4	X	X			
5	X	X		X	
6		X	X	X	
7		X		X	
8		X	X		
9					X
10		X			

**Tableau I :** Tableau récapitulatif des symptômes associés à la première poussée dans la cohorte d'évolution favorable

En raison des critères de sélection drastiques, seulement deux hommes et une femme ont été inclus dans le groupe « évolution défavorable » (DEF). Le diagnostic de SEP a été posé pour la femme à l'âge de 50 ans et pour les deux hommes à l'âge de 21 et 22 ans. Le suivi moyen est de 92 mois ( $\pm 22,5$ ) soit 7,6 ans environ. L'âge moyen de ces patients au moment du diagnostic est de 32 ans ( $\pm 16$ ). L'ensemble de ces patients a bénéficié d'un traitement dans le cadre de leur SEP. Pour deux d'entre eux, un traitement immunomodulateur a été prescrit initialement relayé par un traitement immunosuppresseur pour un des patients. Le troisième patient a bénéficié d'emblée d'un traitement immunosuppresseur. L'EDSS initial médian pour ces patients est de 1,7 ( $\pm 1,5$ ), l'EDSS à la fin de la période de suivi étant de 4,8 ( $\pm 1,4$ ). La première poussée a été respectivement pour chacun des trois patients, une NORB, un déficit sensitivo-moteur des membres inférieurs avec troubles vésico-sphinctérien et des troubles sensitifs d'un membre supérieur. L'intervalle entre la première et la seconde poussée était de 17,7 mois ( $\pm 11,9$ ). L'ensemble de ces patients a évolué vers une forme SP (avec poussées surajoutées pour deux d'entre eux) en moyenne après 51,7 mois ( $\pm 44,8$ ) (Tableau II).

Patients DEF	NORB	Déficit sensitif	Déficit moteur	Troubles vésico-sphinctériens	Troubles cochléo-vestibulaire
1	X				
2		X	X	X	
3		X			

**Tableau II** : Tableau récapitulatif des symptômes associés à la première poussée dans la cohorte d'évolution défavorable



**Figure 27** : Comparaison de la progression du handicap au sein des groupes d'évolution défavorable et favorable.

Nous avons comparé les deux groupes en terme d'âge de début de la pathologie, la période de suivi, de progression du handicap, de délais entre la première et la seconde poussée et de nombre de poussées les trois premières années. Il n'a pas été mis en évidence de différence significative entre ces deux groupes que ce soit en termes d'âge de début de la SEP ( $p=0,7$ ) ou de durée de suivi ( $p=0,8$ ). Si nous comparons l'EDSS au moment du diagnostic entre les deux groupes, aucune différence significative n'est observée ( $p=0,5$ ). A la fin de la période de suivi, une évolution plus péjorative pour le groupe DEF est objectivée en comparaison au groupe FAV ( $p<0,001$ ) (Fig.27). Concernant l'intervalle entre la première et la seconde poussée, il n'y a pas de différence significative entre les deux groupes ( $p=0,8$ ). Concernant le nombre de poussées sur les trois premières années, aucune différence significative n'a été mise en évidence ( $p=1$ ).

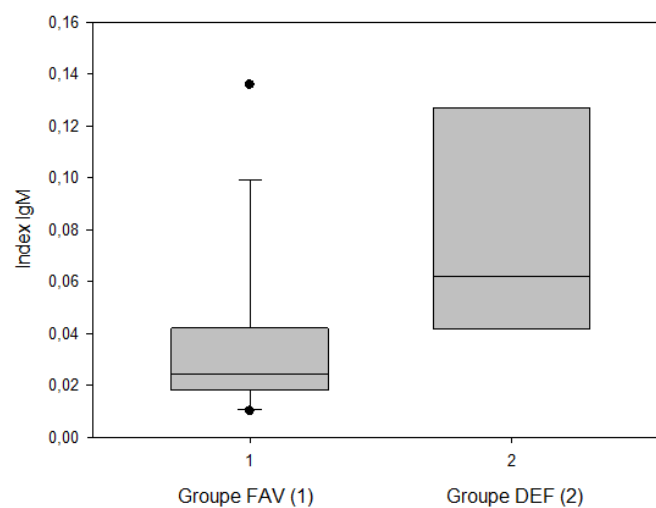
Nous constatons donc que, bien que les patients du groupe DEF présentent une évolution plus péjorative à travers l'aggravation de leur handicap au cours de la période de suivi, l'activité inflammatoire initiale de la pathologie (intervalle entre la première et la deuxième poussée, nombre de poussées les trois premières années) ne semble pas expliquer cette différence d'évolutivité.

## 8.2. Etude des index IgM

Pour chacun de ces patients, le bilan biologique a été complété par un dosage des IgM dans le sérum et le LCR à partir d'échantillons conservés dans la collection biologique.

Au sein du groupe FAV, l'index IgM moyen est de 0,025 avec des index s'étendant de 0,01 à 0,136. La médiane est de 0,04 ( $\pm 0,04$ ).

Au sein du groupe DEF, l'index IgM moyen est de 0,062 avec des index s'étendant de 0,035 à 0,149. La médiane est de 0,08 ( $\pm 0,06$ ) (Fig. 28).



**Figure 28** : Comparaison des Index IgM entre les groupes FAV et DEF.

En raison de l'effectif trop faible et du déséquilibre entre les 2 groupes, il n'est pas possible d'appliquer une analyse statistique au vu de la taille de nos 2 groupes. Cependant, une

tendance semble se dégager qu'il serait intéressant de confirmer ou infirmer en augmentant la taille des différents groupes.

### 8.3. Etude de la corrélation de l'EDSS en fonction de l'index IgG et IgM

Concernant l'index IgG, la régression linéaire ne met pas en évidence de corrélation entre l'EDSS à la fin de la période de suivi et l'index IgG ( $r=0,19$ ,  $r^2=0,036$ ) (Fig. 29A).

Concernant l'index IgM, la régression linéaire ne met pas en évidence de corrélation entre l'EDSS à la fin de la période de suivi et l'index IgM ( $r=0,19$ ,  $r^2=0,036$ ) (Fig. 29B).

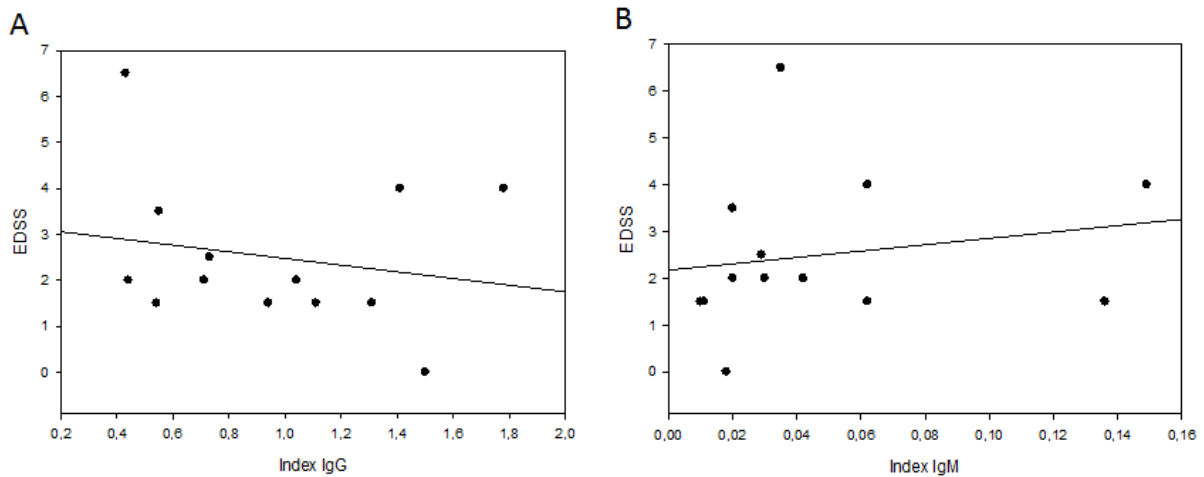
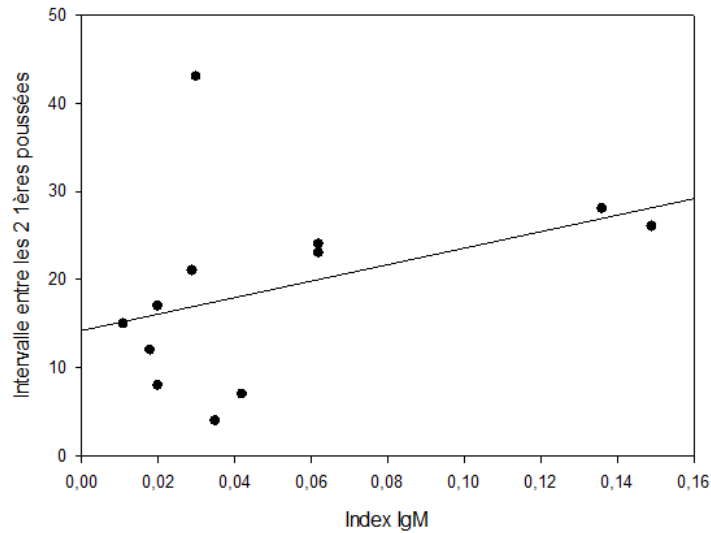


Figure 29 : A- Corrélation entre EDSS et index IgG. B- Corrélation entre EDSS et index IgM.

### 8.4. Etude de la corrélation entre index IgM et intervalle entre la 1<sup>ère</sup> et 2<sup>nde</sup> poussée

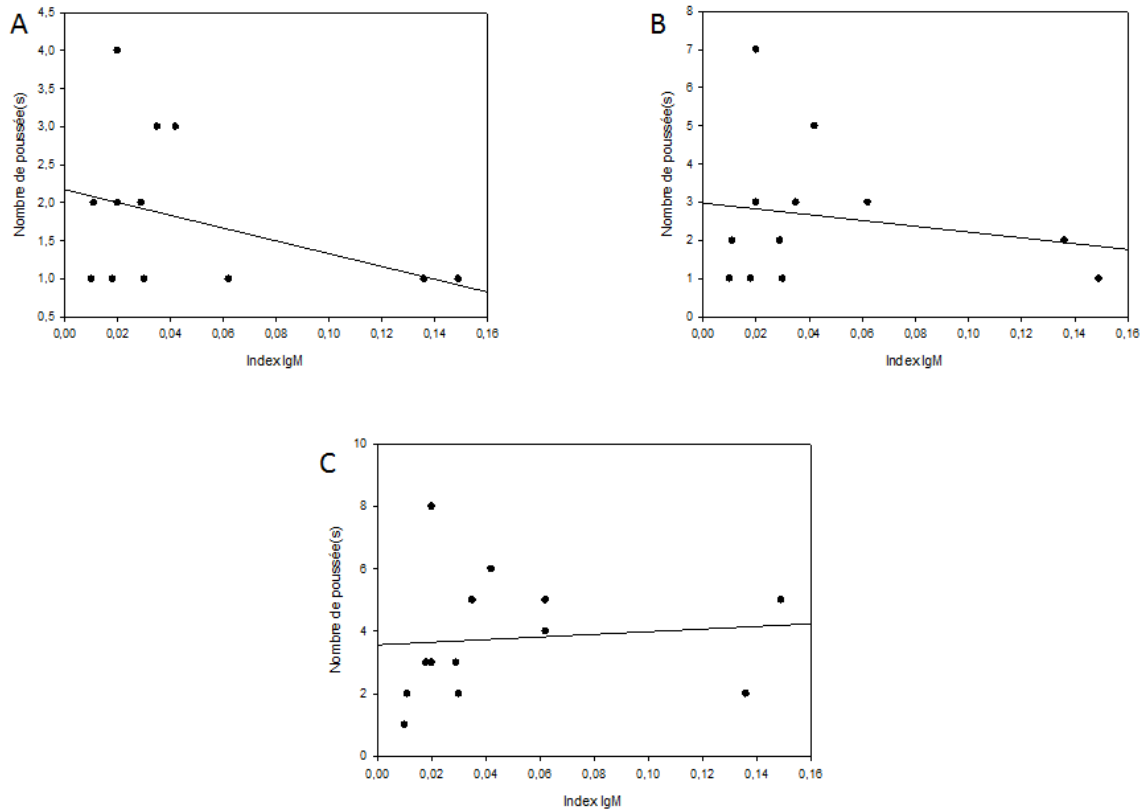
Parmi les 13 patients observés, un patient n'a pas présenté de seconde poussée clinique. L'étude des 12 patients restant n'objective pas de corrélation entre index IgM et intervalle entre première et la seconde poussée ( $r=0,39$ ,  $r^2=0,15$ ) (Fig. 30).



**Figure 30** : Corrélation entre index IgM et intervalle entre la 1<sup>ère</sup> et la 2<sup>ème</sup> poussées (en mois).

### 8.5. Etude de la corrélation entre l'index IgM et le nombre de poussées

L'étude de la corrélation entre l'index IgM et le nombre de poussées durant les deux premières années ne met pas en évidence de lien ( $r=0,38$ ,  $r^2=0,14$ ), tout comme l'étude du nombre de poussées dans les trois premières années ( $r=0,195$ ,  $r^2=0,038$ ). L'étude de l'activité inflammatoire de la pathologie à travers le nombre de poussées cliniques pendant la durée du suivi ne retrouve pas non plus de corrélation entre index IgM et activité inflammatoire ( $r=0,097$ ,  $r^2=0,0094$ ) (Fig. 31). Cependant, ces résultats sont à pondérer avec la faible taille de notre échantillon.



**Figure 31 :** A- Corrélation entre index IgM et nombre de poussées les 2 premières années. B- Corrélation entre index IgM et nombre de poussée les 3 premières années. C- Corrélation entre index IgM et activité inflammatoire durant le suivi.

### 8.6. Recherche de profils oligoclonaux d'IgM dans le LCR par isoélectrofocalisation

L'objectif principal de ce travail était de déterminer si la présence d'un profil oligoclonal d'IgM pouvait être un indicateur pronostique de la SEP. Plusieurs difficultés techniques ont cependant été rencontrées lors de la mise au point de cette analyse. La première est liée à la sensibilité de la technique d'isoélectrofocalisation et aux faibles quantités d'IgM détectées dans les LCR. La deuxième est liée à la structure pentamérique des IgM qui nécessitent une dénaturation préalable des échantillons pour permettre leur séparation.

L'utilisation de gels précoulés en polyacrylamide a permis d'obtenir des profils oligoclonaux pour certains patients de l'étude.

Cependant, le marquage obtenu est faible et non stable dans le temps et le profil mis en évidence est identique chez plusieurs patients ce qui est très surprenant et fait suspecter une origine artificielle.

## 9. DISCUSSION

Nos résultats ne peuvent bénéficier d'une analyse statistique du fait de la faible taille de notre population. De plus, la constitution de nos deux groupes est déséquilibrée dans le sens où nous avons, de par le choix de critères d'évolution péjorative drastique, limité fortement l'inclusion de patient au sein du groupe DEF.

Cette étude préliminaire de faisabilité a pour objectif d'infirmer ou d'affirmer les résultats déjà décrits dans la littérature par l'équipe de Villar principalement, d'où la constitution de 2 groupes de patients d'évolution significativement différente en terme de handicap.

La base EDMUS a permis de sélectionner des patients remplissant ces critères d'inclusion. Nous sommes remontés au début de la constitution de la base de données (2001-2003) pour permettre un recul de 8 ans environ. Le fait d'être remonté au début de la constitution de la base de données a également entraîné des biais d'inclusion du fait de la nécessité de bénéficier d'un stock biologique suffisant pour chaque patient inclu avec les limites de durée de vie d'échantillons biologiques stockés à -80°C pendant 10 ans.

Les caractéristiques de nos deux groupes au début de la maladie ne mettent pas en évidence de différence significative (sous réserve de la taille de la population étudiée). A la fin de la période de suivi, nous retrouvons une différence significative en termes de progression du handicap ( $p < 0.001$ ). Il n'a pas été mis en évidence de différence entre les deux groupes concernant l'activité inflammatoire, basée sur des paramètres cliniques (intervalle entre la première et seconde poussée, nombre de poussées les trois premières années).

Dans la mesure où nous utilisons la technique de référence pour le dosage des IgM, que ce soit au niveau du sérum ou du LCR, la méthodologie ne peut être critiquée. Les IgM subissent le même traitement afin de doser des monomères et non des pentamères et l'ensemble de la solution est dilué, permettant d'harmoniser les propriétés de l'échantillon (le sérum et le LCR ne présentant pas les mêmes propriétés du fait de leur teneur en protéine essentiellement). Le faible nombre de patients inclus, en particulier dans le groupe DEF, ne permet pas de travailler ces résultats sur le plan statistique. Cependant, il semble se

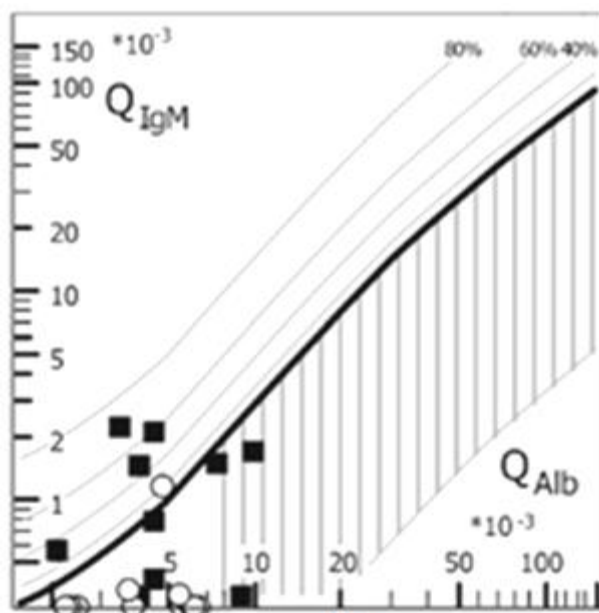


dégager une tendance concernant l'index IgM entre les groupe FAV et DEF justifiant d'augmenter l'effectif de nos deux groupes. Le but de cette augmentation d'effectif serait de réaliser également des études multivariées.

La recherche d'une corrélation entre progression du handicap (au travers de l'EDSS) et index IgM, ou entre activité inflammatoire au début de la maladie et index IgM, ne peuvent être analysées de façon fiable sur le plan statistique au vu de la taille de notre population.

On constate que les index IgM mesurés dans le LCR de nos patients en utilisant la technique de référence, sont nettement inférieurs aux taux décrits dans la littérature. En effet, nous ne retrouvons aucun patient au dessus de 0,2 et la quasi-totalité des patients (11/13) présentent des index IgM au dessous de 0,1 décrit comme le seuil de positivité dans certains travaux (Perini and al, 2006 ; Villar LM and al., 2012). Ce point soulève le problème des seuils utilisés dans la littérature où les justifications restent obscures. En effet, à la différence de l'index IgG, il n'y a actuellement aucune norme définie concernant les IgM et la littérature reste quasi-inexistante sur ce sujet.

Certaines équipes ont publié des résultats contradictoires avec ceux précédemment publiés par l'équipe de Villar. Leurs travaux sont critiquables sur le plan méthodologique du fait d'une collecte de données téléphonique, directement auprès du patient ou de sa famille (Schneider R. and al., 2007; Stauch c. and al. 2010). Cependant les travaux de l'équipe de Stauch sont intéressants et soulignent l'absence de valeur seuil concernant l'index IgM (Stauch C. and al. 2010). Leur travail s'est appuyé sur le diagramme de Reiber établi sur une base de 4 100 patients. Cette étude se base sur les index IgM au sein d'une population de SEP âgée de moins de 16 ans et ne met pas en évidence les corrélations précédemment décrites par l'équipe de Villar. Elle retrouve même une corrélation inverse. Les auteurs vont même jusqu'à reprendre les données de l'équipe de Villar afin de démontrer qu'en utilisant le diagramme de Reiber, ils modifient les attributions de groupe pour certains patients et obtiennent ainsi un faux négatif (1/12) et des faux positifs (4/10). En recalculant alors les EDSS des patients en fonction de cette nouvelle répartition, il n'est pas mis en évidence de différence entre les 2 groupes (Fig. 32).



**Figure 32** : Diagramme de Reiber. Les cercles représentent les patients de l'équipe de Villar dit sans BOM (n=12) ; les carrés représentent les patients avec BOM (n=10). D'après Stauch C. and al. 2010.

Il est important de souligner que l'équipe de Stauch a travaillé chez l'enfant. Or, il a été mis en évidence une différence des seuils pathologique pour les index IgG et IgM en fonction de l'âge, conséquence d'une augmentation du quotient Albumine en lien avec un développement physiologique normal. Cet élément est important à garder à l'esprit lors des travaux consistant à définir les valeurs seuils pour les index IgM.

Le profil IgM est retrouvé dans 57 à 67% des SEP pré-pubères ou survenant durant la puberté contre 41% chez l'adulte (le profil IgG reste stable et fiable quel que soit l'âge du patient) (Reiber H. and al., 2009). Ce point soulève la question de la stabilité du profil IgM dans le temps et du lien avec l'activité inflammatoire de la pathologie indépendamment de la progression du handicap et des mécanismes immunologiques sous-jacents.

La revue de la littérature présentée en introduction montre que les données publiées sur l'intérêt pronostique de l'index et du profil oligoclonal d'IgM émanent très majoritairement de la même équipe, celle de Villar (département d'immunologie, hôpital Ramon y Cajal, Madrid, Espagne). Si nous revenons sur ces travaux en particulier, il est gênant de constater que très peu d'équipes ont réussi à retrouver des résultats similaires concernant le profil IgM intrathécal. En effet, les quelques équipes ayant publié des résultats similaires ont travaillé

avec l'équipe de Villar, en particulier sur le plan technique (exception faite du travail de l'équipe de Sola P. en 2010). Concernant l'index IgM, plus facile à étudier car utilisant une technique de référence pour son dosage (la néphélométrie), une autre équipe a mis en évidence une corrélation entre un taux élevé d'IgM et l'évolution péjorative de la SEP (Perini P. and al., 2006) mais avec des évolutions moins péjoratives que dans les travaux de Villar. La question de la prise en charge thérapeutique des patients est une variable importante à prendre en compte dans ces études de cohorte à visée pronostique et peut expliquer, au moins en partie, les différences pronostiques mises en évidence entre ces deux travaux.

Concernant les critères d'inclusion du groupe DEF, la nécessité d'une activité inflammatoire l'année précédent l'inclusion au travers la présence d'au moins une poussée clinique peut être discutée. Ce point est responsable d'un biais thérapeutique majeur nécessitant d'augmenter la taille de l'échantillon pour s'en affranchir. De plus, les patients présentant une activité inflammatoire élevée bénéficient généralement de traitements plus agressifs entraînant une activité inflammatoire clinique moins marquée pouvant entraîner l'exclusion de ces patients cependant sévère.

Il aurait été préférable de rechercher une activité inflammatoire élevée dans les premiers temps de la pathologie. Le patient alors vierge de tout traitement, l'étude se serait située à proximité de la ponction lombaire permettant une évaluation à court et moyen terme de l'activité inflammatoire en fonction de l'index IgM. En effet, la persistance du profil IgM reste à démontrer au long cours.

Dans un second temps, une fois le lien entre index IgM et activité inflammatoire/progression du handicap confirmé (déjà mis en évidence dans la littérature (Perini P. and al., 2006)), nous aurions pu nous placer plus à distance de la ponction lombaire afin de définir si l'index IgM exerçait un influence similaire au long cours sur ces deux variables plus ou moins indépendamment via une étude multivariée.

L'ensemble des patients appartenant au groupe DEF présentait au final une forme SP de SEP à l'inverse du groupe FAV qui ne comporte que des patients présentant une forme RR.

Sur ce dernier point, nous avons réussi à séparer des patients présentant des formes distinctes de SEP connues pour leur évolution plus ou moins sévère. Cela peut cependant

constituer un troisième biais: le type de SEP influence t-il l'index IgM? Ce point n'a pas été étudié jusqu'à présent. Mais des travaux ont été publiés sur les profils IgM mettant en avant une fréquence plus élevée de BOM (60%) dans le groupe SP que dans le groupe RR (31%) (Villar LM. and al, 2009).

En définitive, les publications actuelles manquent de validations issues de travaux indépendants, indispensables à la validation de données scientifiques. De plus, l'équipe de Villar reste évasive sur la méthodologie utilisée ainsi que l'origine des valeurs seuils avancées concernant l'index IgM.

## 10. PERSPECTIVES

Nous souhaitons augmenter la taille de nos deux groupes afin de confirmer ou non la tendance qui semble se dégager entre le groupe FAV et DEF concernant les seuils d'index IgM. Pour cela nous allons revoir nos critères d'inclusion et nous concentrer sur la progression du handicap entre 2 groupes ne présentant aucune différence significative en termes de données démographique et d'activité inflammatoire clinique initiale (sur les trois 1ères années).

D'autre part, nous allons chercher à comparer les patients présentant une activité inflammatoire clinique initiale importante à un groupe de patient sans activité inflammatoire clinique initiale afin de comparer l'index IgM entre ces 2 groupes. Pour cela, nous allons considérablement augmenter l'inclusion de patients, permettant de réaliser des études multivariées et ainsi de nous affranchir au mieux des différents biais (thérapeutique entre autres).

L'étude de ces différents points permettra de définir si l'index IgM est corrélé à la progression du handicap et/ou à l'activité inflammatoire au début de la maladie et si oui sur combien de temps.

Nous avons décidé de ne pas intégrer de données d'imagerie dans un premier temps car un protocole de suivi similaire pour tous les patients est nécessaire et dans le cadre de ce travail rétrospectif cela n'est pas possible.

Dans un second temps, après avoir recruté de nouveaux patients, nous rechercherons des BOM chez ceux présentant une forte chance de synthèse intrathécale d'IgM au vu du diagramme de Reiber nous permettant ainsi de mettre au point notre technique d'isofocalisation.

## **11. CONCLUSION**

La recherche du profil oligoclonal d'IgM dans le LCR reste actuellement au stade de recherche clinique après 10 ans de travaux conduits par l'équipe de LM Villar. De nombreuses équipes ont travaillé sur la mise en évidence de ce profil. Cependant une seule a pu confirmer ces résultats (Sola P. and al., 2010) en l'absence de collaboration évidente avec l'équipe de Villar.

Les travaux s'orientent vers la recherche d'un lien entre l'index IgM et le pronostic évolutif de la pathologie à plus ou moins long terme. Mais les résultats sont encore débattus et des travaux complémentaires robustes sont indispensables en vue, entre autres, de définir des valeurs seuils actuellement non disponibles.

## 12. BIBLIOGRAPHIE

1. Andersson M, Alvarez-Cermeño J, Bernardi G, Cogato I, Fredman P, Frederiksen J, Fredrikson S, Gallo P, Grimaldi LM, Grønning M, et al. Cerebrospinal fluid in the diagnosis of multiple sclerosis: a consensus report. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1994 Aug;57(8):897-902.
2. Barcellos LF, Sawcer S, Ramsay PP, Baranzini SE, Thomson G, Briggs F, Cree BC, Begovich AB, Villoslada P, Montalban X, Uccelli A, Savettieri G, Lincoln RR, DeLoa C, Haines JL, Pericak-Vance MA, Compston A, Hauser SL, Oksenberg JR. Heterogeneity at the HLA-DRB1 locus and risk for multiple sclerosis. *Hum Mol Genet*. 2006 Sep 15;15(18):2813-24. Epub 2006 Aug 11.
3. Barkhof F, Filippi M, Miller DH, Scheltens P, Campi A, Polman CH, Comi G, Adèr HJ, Losseff N, Valk J. Comparison of MRI criteria at first presentation to predict conversion to clinically definite multiple sclerosis. *Brain*. 1997 Nov;120 ( Pt 11):2059-69.
4. Bartos A, Fialová L, Soukupová J, Kukul J, Malbohan I, Pit'ha J. Elevated intrathecal antibodies against the medium neurofilament subunit in multiple sclerosis. *J Neurol*. 2007 Jan;254(1):20-5. Epub 2007 Feb 14.
5. Bednárová J, Stourac P, Adam P. Relevance of immunological variables in neuroborreliosis and multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand*. 2005 Aug;112(2):97-102.
6. Benedek G, Paperna T, Avidan N, Lejbkowitz I, Oksenberg JR, Wang J, Brautbar C, Israel S, Miller A; Israeli MS Genetics group. Opposing effects of the HLA-DRB1\*0301-DQB1\*0201 haplotype on the risk for multiple sclerosis in diverse Arab populations in Israel. *Genes Immun*. 2010 Jul;11(5):423-31. doi: 10.1038/gene.2010.20. Epub 2010 May 13.
7. Berland R, Wortis HH. Origins and functions of B-1 cells with notes on the role of CD5. *Annu Rev Immunol*. 2002;20:253-300. Epub 2001 Oct 4.
8. Boes M. Role of natural and immune IgM antibodies in immune responses. *Mol Immunol*. 2000 Dec;37(18):1141-9.
9. Bongioanni P, Fioretti C, Vanacore R, Bianchi F, Lombardo F, Ambrogi F, Meucci G. Lymphocyte subsets in multiple sclerosis. A study with two-colour fluorescence analysis. *J Neurol Sci*. 1996 Jul;139(1):71-7.

10. Bosca I, Villar LM, Coret F, Magraner MJ, Simó-Castelló M, Alvarez-Cermeño JC, Casanova B. Response to interferon in multiple sclerosis is related to lipid-specific oligoclonal IgM bands. *Mult Scler.* 2010 Jul;16(7):810-5. doi: 10.1177/1352458510371961. Epub 2010 Jun 10.
11. Bosca I, Magraner MJ, Coret F, Alvarez-Cermeño JC, Simó-Castelló M, Villar LM, Casanova B. The risk of relapse after a clinically isolated syndrome is related to the pattern of oligoclonal bands. *J Neuroimmunol.* 2010 Sep 14;226(1-2):143-6. doi: 10.1016/j.jneuroim.2010.05.032. Epub 2010 Jun 9.
12. Breij EC, Brink BP, Veerhuis R, van den Berg C, Vloet R, Yan R, Dijkstra CD, van der Valk P, Bö L. Homogeneity of active demyelinating lesions in established multiple sclerosis. *Ann Neurol.* 2008 Jan;63(1):16-25. doi: 10.1002/ana.21311.
13. Cepok S, Rosche B, Grummel V, Vogel F, Zhou D, Sayn J, Sommer N, Hartung HP, Hemmer B. Short-lived plasma blasts are the main B cell effector subset during the course of multiple sclerosis. *Brain.* 2005 Jul;128(Pt 7):1667-76. Epub 2005 Mar 30.
14. Charo IF, Ransohoff RM. The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. *N Engl J Med.* 2006 Feb 9;354(6):610-21.
15. Confavreux C, Caudie C, Touraine F, Ventre JJ, Aimard G, Devic M. Plasma cells in cerebrospinal fluid and multiple sclerosis: diagnostic yield and clinicobiological correlations. *Acta Neurol Scand.* 1986 Dec;74(6):432-8.
16. Corcione A, Casazza S, Ferretti E, Giunti D, Zappia E, Pistorio A, Gambini C, Mancardi GL, Uccelli A, Pistoia V. Recapitulation of B cell differentiation in the central nervous system of patients with multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Jul 27;101(30):11064-9. Epub 2004 Jul 19.
17. Correale J, de los Milagros Bassani Molinas M. Oligoclonal bands and antibody responses in multiple sclerosis. *J Neurol.* 2002 Apr;249(4):375-89.
18. Davies G, Keir G, Thompson EJ, Giovannoni G. The clinical significance of an intrathecal monoclonal immunoglobulin band: a follow-up study. *Neurology.* 2003 Apr 8;60(7):1163-6.
19. Debouverie M, Louis S, Pittion S, Roederer T, Vespignani H. Multiple sclerosis with a progressive course from onset in Lorraine-Eastern France. *J. Neurol* 2007; 254(10):1370-1375



20. Deisenhammer F. Multiple sclerosis or multiple possibilities: the continuing problem of misdiagnosis. *Neurology*. 2013 Feb 19;80(8):777. doi: 10.1212/WNL.0b013e3182858cbc.
21. Duddy M, Niino M, Adatia F, Hebert S, Freedman M, Atkins H, Kim HJ, Bar-Or A. Distinct effector cytokine profiles of memory and naive human B cell subsets and implication in multiple sclerosis. *J Immunol*. 2007 May 15;178(10):6092-9.
22. Durante L, Zaaoui W, Rico A, Crespy L, Wybrect D, Faivre A, Reuter F, Malikova I, Pommier G, Confort-Gouny S, Cozzone PJ, Ranjeva JP, Pelletier J, Boucraut J, Audoin B. Intrathecal synthesis of IgM measured after a first demyelinating event suggestive of multiple sclerosis is associated with subsequent MRI brain lesion accrual. *Mult Scler*. 2012 May;18(5):587-91. doi: 10.1177/1352458511424589. Epub 2011 Sep 30.
23. de la Concha EG, Cavanillas ML, Cénit MC, Urcelay E, Arroyo R, Fernández Ó, Álvarez-Cermeño JC, Leyva L, Villar LM, Núñez C. DRB1\*03:01 haplotypes: differential contribution to multiple sclerosis risk and specific association with the presence of intrathecal IgM bands. *PLoS One*. 2012;7(2):e31018. doi: 10.1371/journal.pone.0031018. Epub 2012 Feb 17.
24. von Glehn F, Farias AS, de Oliveira AC, Damasceno A, Longhini AL, Oliveira EC, Damasceno BP, Santos LM, Brandão CO. Disappearance of cerebrospinal fluid oligoclonal bands after natalizumab treatment of multiple sclerosis patients. *Mult Scler*. 2012 Jul;18(7):1038-41. doi: 10.1177/1352458511428465. Epub 2011 Oct 31.
25. Fernandez-Arquero M, Arroyo R, Rubio A, Martin C, Vigil P, Conejero L, Figueredo MA, de la Concha EG. Primary association of a TNF gene polymorphism with susceptibility to multiple sclerosis. *Neurology*. 1999 Oct 12;53(6):1361-3.
26. Franciotta D, Zardini E, Lolli F. The clinical significance of an intrathecal monoclonal immunoglobulin band: a follow-up study. *Neurology*. 2004 Feb 24;62(4):675; author reply 675-6.
27. Freedman MS, Thompson EJ, Deisenhammer F, Giovannoni G, Grimsley G, Keir G, Ohman S, Racke MK, Sharief M, Sindic CJ, Sellebjerg F, Tourtellotte WW. Recommended standard of cerebrospinal fluid analysis in the diagnosis of multiple sclerosis: a consensus statement. *Arch Neurol*. 2005 Jun;62(6):865-70.
28. Frequin ST, Barkhof F, Lamers KJ, Hommes OR, Borm GF. CSF myelin basic protein, IgG and IgM levels in 101 MS patients before and after treatment with high-dose intravenous methylprednisolone. *Acta Neurol Scand*. 1992 Sep;86(3):291-7.

29. Frohman EM, Racke MK, Raine CS. Multiple sclerosis--the plaque and its pathogenesis. *N Engl J Med*. 2006 Mar 2;354(9):942-55.
30. García-Barragán N, Villar LM, Espiño M, Sádaba MC, González-Porqué P, Alvarez-Cermeño JC. Multiple sclerosis patients with anti-lipid oligoclonal IgM show early favourable response to immunomodulatory treatment. *Eur J Neurol*. 2009 Mar;16(3):380-5. doi: 10.1111/j.1468-1331.2008.02504.x.
31. Gay FW, Drye TJ, Dick GW, Esiri MM. The application of multifactorial cluster analysis in the staging of plaques in early multiple sclerosis. Identification and characterization of the primary demyelinating lesion. *Brain*. 1997 Aug;120 ( Pt 8):1461-83.
32. Genain CP, Cannella B, Hauser SL, Raine CS. Identification of autoantibodies associated with myelin damage in multiple sclerosis. *Nat Med*. 1999 Feb;5(2):170-5.
33. Gunnarsson M, Malmeström C, Axelsson M, Sundström P, Dahle C, Vrethem M, Olsson T, Piehl F, Norgren N, Rosengren L, Svenningsson A, Lycke J. Axonal damage in relapsing multiple sclerosis is markedly reduced by natalizumab. *Ann Neurol*. 2011 Jan;69(1):83-9. doi: 10.1002/ana.22247. Epub 2010 Dec 8.
34. Hauser SL, Waubant E, Arnold DL, Vollmer T, Antel J, Fox RJ, Bar-Or A, Panzara M, Sarkar N, Agarwal S, Langer-Gould A, Smith CH; HERMES Trial Group. B-cell depletion with rituximab in relapsing-remitting multiple sclerosis. *N Engl J Med*. 2008 Feb 14;358(7):676-88. doi: 10.1056/NEJMoa0706383.
35. Howell OW, Reeves CA, Nicholas R, Carassiti D, Radotra B, Gentleman SM, Serafini B, Aloisi F, Roncaroli F, Magliozzi R, Reynolds R. Meningeal inflammation is widespread and linked to cortical pathology in multiple sclerosis. *Brain*. 2011 Sep;134(Pt 9):2755-71. doi: 10.1093/brain/awr182. Epub 2011 Aug 11.
36. Hutchinson M. CSF oligoclonal bands are important in the diagnosis of multiple sclerosis, unreasonably downplayed by the McDonald Criteria 2010: Commentary. *Mult Scler*. 2013 May;19(6):719-20. doi: 10.1177/1352458513485496.
37. Imrell K, Landtblom AM, Hillert J, Masterman T. Multiple sclerosis with and without CSF bands: clinically indistinguishable but immunogenetically distinct. *Neurology*. 2006 Sep 26;67(6):1062-4.
38. Janeway, Murphy, Travers, Walport. *Immunobiologie*. Traduction de la 7<sup>ème</sup> édition anglaise par Pierre L. Masson. 2009. De Boeck.

39. Jongen PJ, Lycklama a Nijeholt G, Lamers KJ, Doesburg WH, Barkhof F, Lemmens WA, Klasen IS, Hommes OR. Cerebrospinal fluid IgM index correlates with cranial MRI lesion load in patients with multiple sclerosis. *Eur Neurol.* 2007;58(2):90-5. Epub 2007 Jun 12.
40. Kappos L, Li D, Calabresi PA, O'Connor P, Bar-Or A, Barkhof F, Yin M, Leppert D, Glanzman R, Tinbergen J, Hauser SL. Ocrelizumab in relapsing-remitting multiple sclerosis: a phase 2, randomised, placebo-controlled, multicentre trial. *Lancet.* 2011 Nov 19;378(9805):1779-87. doi: 10.1016/S0140-6736(11)61649-8. Epub 2011 Oct 31.
41. Kelly S, Kinsella K, Duggan M, Tubridy N, McGuigan C, Hutchinson M. A proposed modification to the McDonald 2010 criteria for the diagnosis of primary progressive multiple sclerosis. *Mult Scler.* 2012 Nov 6. [Epub ahead of print]
42. Khademi M, Kockum I, Andersson ML, Iacobaeus E, Brundin L, Sellebjerg F, Hillert J, Piehl F, Olsson T. Cerebrospinal fluid CXCL13 in multiple sclerosis: a suggestive prognostic marker for the disease course. *Mult Scler.* 2011 Mar;17(3):335-43. doi: 10.1177/1352458510389102. Epub 2010 Dec 6.
43. Kowarik MC, Cepok S, Sellner J, Grummel V, Weber MS, Korn T, Berthele A, Hemmer B. CXCL13 is the major determinant for B cell recruitment to the CSF during neuroinflammation. *J Neuroinflammation.* 2012 May 16;9:93. doi: 10.1186/1742-2094-9-93.
44. Krumbholz M, Theil D, Derfuss T, Rosenwald A, Schrader F, Monoranu CM, Kalled SL, Hess DM, Serafini B, Aloisi F, Wekerle H, Hohlfeld R, Meinl E. BAFF is produced by astrocytes and up-regulated in multiple sclerosis lesions and primary central nervous system lymphoma. *J Exp Med.* 2005 Jan 17;201(2):195-200. Epub 2005 Jan 10.
45. Krumbholz M, Theil D, Cepok S, Hemmer B, Kivisäkk P, Ransohoff RM, Hofbauer M, Farina C, Derfuss T, Hartle C, Newcombe J, Hohlfeld R, Meinl E. Chemokines in multiple sclerosis: CXCL12 and CXCL13 up-regulation is differentially linked to CNS immune cell recruitment. *Brain.* 2006 Jan;129(Pt 1):200-11. Epub 2005 Nov 9.
46. Krumbholz M, Derfuss T, Hohlfeld R, Meinl E. B cells and antibodies in multiple sclerosis pathogenesis and therapy. *Nat Rev Neurol.* 2012 Nov 5;8(11):613-23. doi: 10.1038/nrneurol.2012.203. Epub 2012 Oct 9.
47. Kuenz B, Lutterotti A, Ehling R, Gneiss C, Haemmerle M, Rainer C, Deisenhammer F, Schocke M, Berger T, Reindl M. Cerebrospinal fluid B cells correlate with early brain inflammation in multiple sclerosis. *PLoS One.* 2008 Jul 2;3(7):e2559. doi: 10.1371/journal.pone.0002559.

48. Lassmann H, Kitz K, Wisniewski HM. In vivo effect of sera from animals with chronic relapsing experimental allergic encephalomyelitis on central and peripheral myelin. *Acta Neuropathol.* 1981;55(4):297-306.
49. Leray E, Yaouanq J, Le Page E, Coustans M, Laplaud D, Oger J, Edan G. Evidence for a two-stage disability progression in multiple sclerosis. *Brain.* 2010 Jul;133(Pt 7):1900-13. doi: 10.1093/brain/awq076. Epub 2010 Apr 27.
50. Lincoln MR, Ramagopalan SV, Chao MJ, Herrera BM, Deluca GC, Orton SM, Dyment DA, Sadovnick AD, Ebers GC. Epistasis among HLA-DRB1, HLA-DQA1, and HLA-DQB1 loci determines multiple sclerosis susceptibility. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009 May 5;106(18):7542-7. doi: 10.1073/pnas.0812664106. Epub 2009 Apr 20.
51. Lindberg RL, Achtnichts L, Hoffmann F, Kuhle J, Kappos L. Natalizumab alters transcriptional expression profiles of blood cell subpopulations of multiple sclerosis patients. *J Neuroimmunol.* 2008 Feb;194(1-2):153-64. doi: 10.1016/j.jneuroim.2007.11.007. Epub 2008 Feb 21.
52. Link H, Huang YM. Oligoclonal bands in multiple sclerosis cerebrospinal fluid: an update on methodology and clinical usefulness. *J Neuroimmunol.* 2006 Nov;180(1-2):17-28. Epub 2006 Sep 1.
53. Lourenco P, Shirani A, Saeedi J, Oger J, Schreiber WE, Tremlett H. Oligoclonal bands and cerebrospinal fluid markers in multiple sclerosis: associations with disease course and progression. *Mult Scler.* 2013 Apr;19(5):577-84. doi: 10.1177/1352458512459684. Epub 2012 Sep 7.
54. Lovato L, Willis SN, Rodig SJ, Caron T, Almendinger SE, Howell OW, Reynolds R, O'Connor KC, Hafler DA. Related B cell clones populate the meninges and parenchyma of patients with multiple sclerosis. *Brain.* 2011 Feb;134(Pt 2):534-41. doi: 10.1093/brain/awq350. Epub 2011 Jan 7.
55. Lucchinetti CF, Popescu BF, Bunyan RF, Moll NM, Roemer SF, Lassmann H, Brück W, Parisi JE, Scheithauer BW, Giannini C, Weigand SD, Mandrekar J, Ransohoff RM. Inflammatory cortical demyelination in early multiple sclerosis. *N Engl J Med.* 2011 Dec 8;365(23):2188-97. doi: 10.1056/NEJMoa1100648.
56. Luxton RW, McLean BN, Thompson EJ. Isoelectric focusing versus quantitative measurements in the detection of intrathecal local synthesis of IgG. *Clin Chim Acta.* 1990 Mar 15;187(3):297-308.

57. Magliozzi R, Howell O, Vora A, Serafini B, Nicholas R, Puopolo M, Reynolds R, Aloisi F. Meningeal B-cell follicles in secondary progressive multiple sclerosis associate with early onset of disease and severe cortical pathology. *Brain*. 2007 Apr;130(Pt 4):1089-104.
58. Magraner MJ, Bosca I, Simó-Castelló M, García-Martí G, Alberich-Bayarri A, Coret F, Alvarez-Cermeño JC, Martí-Bonmatí L, Villar LM, Casanova B. Brain atrophy and lesion load are related to CSF lipid-specific IgM oligoclonal bands in clinically isolated syndromes. *Neuroradiology*. 2012 Jan;54(1):5-12. doi: 10.1007/s00234-011-0841-7. Epub 2011 Feb 16.
59. Mandrioli J, Sola P, Bedin R, Gambini M, Merelli E. A multifactorial prognostic index in multiple sclerosis. Cerebrospinal fluid IgM oligoclonal bands and clinical features to predict the evolution of the disease. *J Neurol*. 2008 Jul;255(7):1023-31. doi: 10.1007/s00415-008-0827-5. Epub 2008 Jun 13.
60. Marconi S, Acler M, Lovato L, De Toni L, Tedeschi E, Anghileri E, Romito S, Cordioli C, Bonetti B. Anti-GD2-like IgM autoreactivity in multiple sclerosis patients. *Mult Scler*. 2006 Jun;12(3):302-8.
61. Marrosu MG, Murru MR, Costa G, Cucca F, Sotgiu S, Rosati G, Muntoni F. Multiple sclerosis in Sardinia is associated and in linkage disequilibrium with HLA-DR3 and -DR4 alleles. *Am J Hum Genet*. 1997 Aug;61(2):454-7.
62. Marrosu MG, Murru R, Murru MR, Costa G, Zavattari P, Whalen M, Cocco E, Mancosu C, Schirru L, Solla E, Fadda E, Melis C, Porru I, Rolesu M, Cucca F. Dissection of the HLA association with multiple sclerosis in the founder isolated population of Sardinia. *Hum Mol Genet*. 2001 Dec 1;10(25):2907-16.
63. Martínez A, Rubio A, Urcelay E, Fernández-Arquero M, De Las Heras V, Arroyo R, Villoslada P, Montalbán X, De La Concha EG. TNF-376A marks susceptibility to MS in the Spanish population: A replication study. *Neurology*. 2004 Mar 9;62(5):809-10.
64. Masterman T, Ligers A, Olsson T, Andersson M, Olerup O, Hillert J. HLA-DR15 is associated with lower age at onset in multiple sclerosis. *Ann Neurol*. 2000 Aug;48(2):211-9.
65. Matà S, Lolli F, Söderström M, Pinto F, Link H. Multiple sclerosis is associated with enhanced B cell responses to the ganglioside GD1a. *Mult Scler*. 1999 Dec;5(6):379-88.

66. Mehling M, Kuhle J, Regeniter A. 10 most commonly asked questions about cerebrospinal fluid characteristics in demyelinating disorders of the central nervous system. *Neurologist*. 2008 Jan;14(1):60-5. doi: 10.1097/NRL.0b013e31815ac523.
67. Meinl E, Krumbholz M, Hohlfeld R. B lineage cells in the inflammatory central nervous system environment: migration, maintenance, local antibody production, and therapeutic modulation. *Ann Neurol*. 2006 Jun;59(6):880-92.
68. Mero IL, Gustavsen MW, Sæther HS, Flåm ST, Berg-Hansen P, Søndergaard HB, Jensen PE, Berge T, Bjølgerud A, Muggerud A, Aarseth JH; International Multiple Sclerosis Genetics Consortium, Myhr KM, Celius EG, Sellebjerg F, Hillert J, Alfredsson L, Olsson T, Oturai AB, Kockum I, Lie BA, Andreassen BK, Harbo HF. Oligoclonal band status in Scandinavian multiple sclerosis patients is associated with specific genetic risk alleles. *PLoS One*. 2013;8(3):e58352. doi: 10.1371/journal.pone.0058352. Epub 2013 Mar 5.
69. Miller DH, Chard DT, Ciccarelli O. Clinically isolated syndromes. *Lancet Neurol*. 2012 Feb;11(2):157-69. doi: 10.1016/S1474-4422(11)70274-5.
70. Mix E, Olsson T, Correale J, Baig S, Kostulas V, Olsson O, Link H. B cells expressing CD5 are increased in cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis. *Clin Exp Immunol*. 1990 Jan;79(1):21-7.
71. Moulin D, Paty DW, Ebers GC. The predictive value of cerebrospinal fluid electrophoresis in 'possible' multiple sclerosis. *Brain*. 1983 Dec;106 ( Pt 4):809-16.
72. Niino M, Bodner C, Simard ML, Alatab S, Gano D, Kim HJ, Trigueiro M, Racicot D, Guérette C, Antel JP, Fournier A, Grand'Maison F, Bar-Or A. Natalizumab effects on immune cell responses in multiple sclerosis. *Ann Neurol*. 2006 May;59(5):748-54.
73. Obermeier B, Lovato L, Mentele R, Brück W, Forne I, Imhof A, Lottspeich F, Turk KW, Willis SN, Wekerle H, Hohlfeld R, Hafler DA, O'Connor KC, Dornmair K. Related B cell clones that populate the CSF and CNS of patients with multiple sclerosis produce CSF immunoglobulin. *J Neuroimmunol*. 2011 Apr;233(1-2):245-8. doi: 10.1016/j.jneuroim.2011.01.010. Epub 2011 Feb 24.
74. Ousman SS, Tomooka BH, van Noort JM, Wawrousek EF, O'Connor KC, Hafler DA, Sobel RA, Robinson WH, Steinman L. Protective and therapeutic role for alphaB-crystallin in autoimmune demyelination. *Nature*. 2007 Jul 26;448(7152):474-9. Epub 2007 Jun 13.
75. Owens GP, Bennett JL, Lassmann H, O'Connor KC, Ritchie AM, Shearer A, Lam C, Yu X, Birlea M, DuPree C, Williamson RA, Hafler DA, Burgoon MP, Gilden D.

Antibodies produced by clonally expanded plasma cells in multiple sclerosis cerebrospinal fluid. *Ann Neurol*. 2009 Jun;65(6):639-49. doi: 10.1002/ana.21641.

76. Pereira-Mouriès L, Almeida MJ, Ribeiro C, Peduzzi J, Barthélemy M, Milet C, Lopez E. Soluble silk-like organic matrix in the nacreous layer of the bivalve *Pinctada maxima*. *Eur J Biochem*. 2002 Oct;269(20):4994-5003.
77. Perini P, Ranzato F, Calabrese M, Battistin L, Gallo P. Intrathecal IgM production at clinical onset correlates with a more severe disease course in multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2006 Aug;77(8):953-5. Epub 2006 Mar 30.
78. Polman CH, Reingold SC, Edan G, Filippi M, Hartung HP, Kappos L, Lublin FD, Metz LM, McFarland HF, O'Connor PW, Sandberg-Wollheim M, Thompson AJ, Weinshenker BG, Wolinsky JS. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2005 revisions to the "McDonald Criteria". *Ann Neurol*. 2005 Dec;58(6):840-6.
79. Polman CH, Reingold SC, Banwell B, Clanet M, Cohen JA, Filippi M, Fujihara K, Havrdova E, Hutchinson M, Kappos L, Lublin FD, Montalban X, O'Connor P, Sandberg-Wollheim M, Thompson AJ, Waubant E, Weinshenker B, Wolinsky JS. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria. *Ann Neurol*. 2011 Feb;69(2):292-302. doi: 10.1002/ana.22366.
80. Postigo AA, Pulido R, Campanero MR, Acevedo A, García-Pardo A, Corbi AL, Sanchez-Madrid F, De Landazuri MO. Differential expression of VLA-4 integrin by resident and peripheral blood B lymphocytes. Acquisition of functionally active alpha 4 beta 1-fibronectin receptors upon B cell activation. *Eur J Immunol*. 1991 Oct;21(10):2437-45.
81. Pugliatti M, Rosati G, Carton H, Riise T, Drulovic J, Vécsei L, Milanov I. The epidemiology of multiple sclerosis in Europe. *Eur J Neurol*. 2006 Jul;13(7):700-22.
82. Sandberg-Wollheim M. Optic neuritis: studies on the cerebrospinal fluid in relation to clinical course in 61 patients. *Acta Neurol Scand*. 1975 Sep;52(3):167-78.
83. Solomon AJ, Klein EP, Bourdette D. "Undiagnosing" multiple sclerosis: the challenge of misdiagnosis in MS. *Neurology*. 2012 Jun 12;78(24):1986-91. doi: 10.1212/WNL.0b013e318259e1b2. Epub 2012 May 11.
84. Srivastava R, Aslam M, Kalluri SR, Schirmer L, Buck D, Tackenberg B, Rothhammer V, Chan A, Gold R, Berthele A, Bennett JL, Korn T, Hemmer B. Potassium channel KIR4.1 as an immune target in multiple sclerosis. *N Engl J Med*. 2012 Jul 12;367(2):115-23. doi: 10.1056/NEJMoa1110740.

85. Ramagopalan SV, Morris AP, Dymment DA, Herrera BM, DeLuca GC, Lincoln MR, Orton SM, Chao MJ, Sadovnick AD, Ebers GC. The inheritance of resistance alleles in multiple sclerosis. *PLoS Genet.* 2007 Sep;3(9):1607-13. Epub 2007 Jul 20.
86. Ransohoff RM. Natalizumab for multiple sclerosis. *N Engl J Med.* 2007 Jun 21;356(25):2622-9.
87. Reiber H, Felgenhauer K. Protein transfer at the blood cerebrospinal fluid barrier and the quantitation of the humoral immune response within the central nervous system. *Clin Chim Acta.* 1987 Mar 30;163(3):319-28.
88. Reiber H. Flow rate of cerebrospinal fluid (CSF)--a concept common to normal blood-CSF barrier function and to dysfunction in neurological diseases. *J Neurol Sci.* 1994 Apr;122(2):189-203.
89. Reiber H. Dynamics of brain-derived proteins in cerebrospinal fluid. *Clin Chim Acta.* 2001 Aug 20;310(2):173-86.
90. Reiber H. Proteins in cerebrospinal fluid and blood: barriers, CSF flow rate and source-related dynamics. *Restor Neurol Neurosci.* 2003;21(3-4):79-96.
91. Reiber H, Otto M, Trendelenburg C, Wormek A. Reporting cerebrospinal fluid data: knowledge base and interpretation software. *Clin Chem Lab Med.* 2001 Apr;39(4):324-32.
92. Reiber H, Peter JB. Cerebrospinal fluid analysis: disease-related data patterns and evaluation programs. *J Neurol Sci.* 2001 Mar 1;184(2):101-22.
93. Riccitelli G, Rocca MA, Pagani E, Martinelli V, Radaelli M, Falini A, Comi G, Filippi M. Mapping regional grey and white matter atrophy in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Mult Scler.* 2012 Jul;18(7):1027-37. doi: 10.1177/1352458512439239. Epub 2012 Mar 15.
94. Rosenbluth J, Liu Z, Guo D, Schiff R. Inhibition of CNS myelin development in vivo by implantation of anti-GalC hybridoma cells. *J Neurocytol.* 1994 Nov;23(11):699-707.
95. Rosenbluth J, Schiff R, Liang WL, Dou WK, Moon D. Antibody-mediated CNS demyelination: focal spinal cord lesions induced by implantation of an IgM anti-galactocerebroside-secreting hybridoma. *J Neurocytol.* 1999 Apr-May;28(4-5):397-416.



96. Rosenbluth J, Schiff R, Liang WL, Dou W. Antibody-mediated CNS demyelination II. Focal spinal cord lesions induced by implantation of an IgM antisulfatide-secreting hybridoma. *J Neurocytol.* 2003 Mar;32(3):265-76.
97. Rossi S, Motta C, Studer V, Monteleone F, De Chiara V, Buttari F, Barbieri F, Bernardi G, Battistini L, Cutter G, Stüve O, Salvetti M, Centonze D. A genetic variant of the anti-apoptotic protein Akt predicts natalizumab-induced lymphocytosis and post-natalizumab multiple sclerosis reactivation. *Mult Scler.* 2013 Jan;19(1):59-68. doi: 10.1177/1352458512448106. Epub 2012 May 10.
98. Runmarker B, Andersen O. Prognostic factors in a multiple sclerosis incidence cohort with twenty-five years of follow-up. *Brain.* 1993 Feb;116 ( Pt 1):117-34.
99. Sadatipour BT, Greer JM, Pender MP. Increased circulating antiganglioside antibodies in primary and secondary progressive multiple sclerosis. *Ann Neurol.* 1998 Dec;44(6):980-3.
100. Saiz A, Carreras E, Berenguer J, Yagüe J, Martínez C, Marín P, Rovira M, Pujol T, Arbizu T, Graus F. MRI and CSF oligoclonal bands after autologous hematopoietic stem cell transplantation in MS. *Neurology.* 2001 Apr 24;56(8):1084-9.
101. Schneider R, Euler B, Rauer S. Intrathecal IgM-synthesis does not correlate with the risk of relapse in patients with a primary demyelinating event. *Eur J Neurol.* 2007 Aug;14(8):907-11.
102. Serafini B, Rosicarelli B, Magliozzi R, Stigliano E, Aloisi F. Detection of ectopic B-cell follicles with germinal centers in the meninges of patients with secondary progressive multiple sclerosis. *Brain Pathol.* 2004 Apr;14(2):164-74.
103. Sharief MK, Thompson EJ. The predictive value of intrathecal immunoglobulin synthesis and magnetic resonance imaging in acute isolated syndromes for subsequent development of multiple sclerosis. *Ann Neurol.* 1991 Feb;29(2):147-51.
104. Silber E, Semra YK, Gregson NA, Sharief MK. Patients with progressive multiple sclerosis have elevated antibodies to neurofilament subunit. *Neurology.* 2002 May 14;58(9):1372-81.
105. Sindic CJ, Laterre EC. Oligoclonal free kappa and lambda bands in the cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis and other neurological diseases. An immunoaffinity-mediated capillary blot study. *J Neuroimmunol.* 1991 Jul;33(1):63-72.

106. Sindic CJ, Van Antwerpen MP, Goffette S. The intrathecal humoral immune response: laboratory analysis and clinical relevance. *Clin Chem Lab Med.* 2001 Apr;39(4):333-40.
107. Sinnecker T, Bozin I, Dörr J, Pfueller CF, Harms L, Niendorf T, Brandt AU, Paul F, Wuerfel J. Periventricular venous density in multiple sclerosis is inversely associated with T2 lesion count: a 7 Tesla MRI study. *Mult Scler.* 2013 Mar;19(3):316-25. doi: 10.1177/1352458512451941. Epub 2012 Jun 26.
108. Sola P, Mandrioli J, Simone AM, Ferraro D, Bedin R, Annecca R, Venneri MG, Nichelli PF, Merelli E. Primary progressive versus relapsing-onset multiple sclerosis: presence and prognostic value of cerebrospinal fluid oligoclonal IgM. *Mult Scler.* 2011 Mar;17(3):303-11. doi: 10.1177/1352458510386996. Epub 2010 Nov 15.
109. Sospedra M, Martin R. Immunology of multiple sclerosis. *Annu Rev Immunol.* 2005;23:683-747.
110. Stauch C, Reiber H, Rauchenzauner M, Strasak A, Pohl D, Hanefeld F, Gärtner J, Rostásy KM. Intrathecal IgM synthesis in pediatric MS is not a negative prognostic marker of disease progression: quantitative versus qualitative IgM analysis. *Mult Scler.* 2011 Mar;17(3):327-34. doi: 10.1177/1352458510388543. Epub 2010 Dec 1.
111. Thangarajh M, Gomez-Rial J, Hedström AK, Hillert J, Alvarez-Cermeño JC, Masterman T, Villar LM. Lipid-specific immunoglobulin M in CSF predicts adverse long-term outcome in multiple sclerosis. *Mult Scler.* 2008 Nov;14(9):1208-13. doi: 10.1177/1352458508095729. Epub 2008 Aug 28.
112. Tibbling G, Link H, Ohman S. Principles of albumin and IgG analyses in neurological disorders. I. Establishment of reference values. *Scand J Clin Lab Invest.* 1977 Sep;37(5):385-90.
113. Tintoré M, Rovira A, Brieva L, Grivé E, Jardí R, Borrás C, Montalban X. Isolated demyelinating syndromes: comparison of CSF oligoclonal bands and different MR imaging criteria to predict conversion to CDMS. *Mult Scler.* 2001 Dec;7(6):359-63.
114. Tintoré M, Rovira A, Río J, Tur C, Pelayo R, Nos C, Téllez N, Perkal H, Comabella M, Sastre-Garriga J, Montalban X. Do oligoclonal bands add information to MRI in first attacks of multiple sclerosis? *Neurology.* 2008 Mar 25;70(13 Pt 2):1079-83. Epub 2007 Sep 19.
115. Tintore M, Rovira A, Arrambide G, Mitjana R, Río J, Auger C, Nos C, Edo MC, Castilló J, Horga A, Perez-Miralles F, Huerga E, Comabella M, Sastre-Garriga J, Montalban X.

Brainstem lesions in clinically isolated syndromes. *Neurology*. 2010 Nov 23;75(21):1933-8. doi: 10.1212/WNL.0b013e3181feb26f.

116. Trojano M, Liguori M, Bosco Zimatore G, Bugarini R, Avolio C, Paolicelli D, Giuliani F, De Robertis F, Marrosu MG, Livrea P. Age-related disability in multiple sclerosis. *Ann Neurol*. 2002 Apr;51(4):475-80.
117. Villar LM, González-Porqué P, Masjuán J, Alvarez-Cermeño JC, Bootello A, Keir G. A sensitive and reproducible method for the detection of oligoclonal IgM bands. *J Immunol Methods*. 2001 Dec 1;258(1-2):151-5.
118. Villar LM, Masjuan J, González-Porqué P, Plaza J, Sádaba MC, Roldán E, Bootello A, Alvarez-Cermeño JC. Intrathecal IgM synthesis in neurologic diseases: relationship with disability in MS. *Neurology*. 2002a Mar 12;58(5):824-6.
119. Villar LM, Masjuan J, González-Porqué P, Plaza J, Sádaba MC, Roldán E, Bootello A, Alvarez-Cermeño JC. Intrathecal IgM synthesis predicts the onset of new relapses and a worse disease course in MS. *Neurology*. 2002b Aug 27;59(4):555-9.
120. Villar LM, Masjuan J, González-Porqué P, Plaza J, Sádaba MC, Roldán E, Bootello A, Alvarez-Cermeño JC. Intrathecal IgM synthesis is a prognostic factor in multiple sclerosis. *Ann Neurol*. 2003 Feb;53(2):222-6.
121. Villar LM, Sádaba MC, Roldán E, Masjuan J, González-Porqué P, Villarrubia N, Espiño M, García-Trujillo JA, Bootello A, Alvarez-Cermeño JC. Intrathecal synthesis of oligoclonal IgM against myelin lipids predicts an aggressive disease course in MS. *J Clin Invest*. 2005 Jan;115(1):187-94.
122. Villar L, García-Barragán N, Espiño M, Roldán E, Sádaba M, Gómez-Rial J, González-Porqué P, Alvarez-Cermeño J. Influence of oligoclonal IgM specificity in multiple sclerosis disease course. *Mult Scler*. 2008 Mar;14(2):183-7. Epub 2007 Oct 17.
123. Villar LM, Masterman T, Casanova B, Gómez-Rial J, Espiño M, Sádaba MC, González-Porqué P, Coret F, Alvarez-Cermeño JC. CSF oligoclonal band patterns reveal disease heterogeneity in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*. 2009 Jun 25;211(1-2):101-4. doi: 10.1016/j.jneuroim.2009.03.003. Epub 2009 May 13.
124. Villar LM, Espiño M, Cavanillas ML, Roldán E, Urcelay E, de la Concha EG, Sádaba MC, Arroyo R, González-Porqué P, Alvarez-Cermeño JC. Immunological mechanisms that

associate with oligoclonal IgM band synthesis in multiple sclerosis. *Clin Immunol.* 2010 Oct;137(1):51-9. doi: 10.1016/j.clim.2010.06.007.

125. Villar LM, García-Sánchez MI, Costa-Frossard L, Espiño M, Roldán E, Páramo D, Lucas M, Izquierdo G, Álvarez-Cermeño JC. Immunological markers of optimal response to natalizumab in multiple sclerosis. *Arch Neurol.* 2012 Feb;69(2):191-7. doi: 10.1001/archneurol.2011.971.
126. Walsh MJ, Tourtellotte WW.  
Temporal invariance and clonal uniformity of brain and cerebrospinal IgG, IgA, and IgM in multiple sclerosis. *J Exp Med.* 1986 Jan 1;163(1):41-53.
127. Young NP, Weinshenker BG, Parisi JE, Scheithauer B, Giannini C, Roemer SF, Thomsen KM, Mandrekar JN, Erickson BJ, Lucchinetti CF. Perivenous demyelination: association with clinically defined acute disseminated encephalomyelitis and comparison with pathologically confirmed multiple sclerosis. *Brain.* 2010 Feb;133(Pt 2):333-48. doi: 10.1093/brain/awp321. Epub 2010 Feb 3.

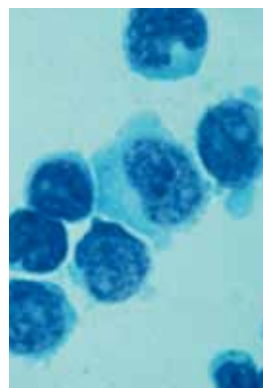
## **13. ANNEXES**

### **Articles publiés**

## Actualité sur les lymphocytes T régulateurs CD4<sup>+</sup>

Aurélié Siri<sup>1</sup>, Hubert de Boysson<sup>1</sup>, Guilaine Boursier

► Les lymphocytes T régulateurs (Treg) CD4<sup>+</sup> sont impliqués dans le maintien de la tolérance périphérique et la prévention des maladies auto-immunes. Ils régulent également les réponses immunes observées dans les allergies, les greffes, les cancers et les maladies infectieuses. Les lymphocytes T ne forment pas une population homogène, et plusieurs sous-populations de Treg ont été isolées. L'objectif de cette revue est de discuter certains aspects marquants de la biologie des Treg naturels (nTreg), concernant notamment leur caractérisation, leurs principaux rôles dans l'homéostasie physiologique et dans certaines pathologies ainsi que leurs mécanismes d'action. Enfin, nous terminerons cette synthèse par la présentation des Treg induits (iTreg). ◀



Master Immunotechnologies et biothérapies, université Pierre et Marie Curie - Paris 6 (PRES Sorbonne Universités), 4, place Jussieu, 75005 Paris, France.  
[aurelie.siri@hotmail.fr](mailto:aurelie.siri@hotmail.fr)

<sup>1</sup>A. Siri et H. de Boysson ont contribué de façon équivalente à cet article.

lymphocytes Tr1 producteurs d'interleukine (IL)-10 et les T helper de type 3 (Th3) producteurs de TGF- $\beta$  (*transforming growth factor*- $\beta$ ), également classés parmi les Treg. Il apparaît que les Treg jouent un rôle central dans les maladies auto-immunes, l'allergie, les infections chroniques, la croissance tumorale et la transplantation [2].

### Origine des Treg

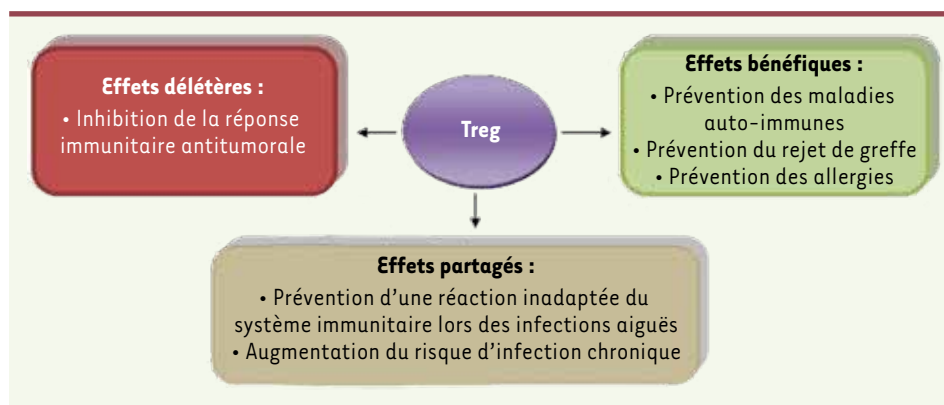
Le système immunitaire peut discriminer une grande variété d'antigènes du soi et du non-soi. Des mécanismes de contrôle sont nécessaires afin de moduler l'activité des cellules effectrices et éviter le déclenchement d'une réaction immunitaire inadaptée contre les antigènes du soi. L'existence d'un système de régulation a été suggérée dès les années 1970 [1], mais il faut attendre les années 1990 pour que soit identifiée une population de lymphocytes T (LT) CD4<sup>+</sup> dits régulateurs (Treg), capables de moduler l'activité d'une grande diversité de cellules des systèmes immunitaires inné et adaptatif. Les travaux de ces 15 dernières années ont permis d'isoler plusieurs populations de Treg, qui se distinguent par leur origine, leurs marqueurs de surface et leurs fonctions. Les Treg les mieux connus et les plus étudiés sont les lymphocytes T naturels CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> d'origine thymique. Leur implication dans de nombreux contextes physiologiques ou pathologiques a été clairement établie. Par ailleurs, on peut également citer les

L'existence des Treg a été suggérée en observant le rôle central du thymus dans le développement d'une population de lymphocytes T régulatrice [3, 4]. Les progéniteurs immatures, ancêtres des lymphocytes T et issus de la moelle osseuse, migrent dans le thymus où ils se différencient. À la fin de cette différenciation T, les cellules les plus autoréactives sont éliminées. Certaines peuvent échapper à cette sélection et coloniser la périphérie. Différents mécanismes de tolérance périphérique vont alors participer à la prévention des maladies auto-immunes et les Treg jouent un rôle majeur dans ces mécanismes. Les Treg ne sont pas une population homogène et unique. Il est admis que les Treg issus du thymus sont dits naturels (nTreg) et dépendent de l'interleukine-2 pour leur survie. De nombreuses expériences ont montré que des lymphocytes T aux fonctions régulatrices pouvaient également être induits (iTreg) en périphérie à partir de lymphocytes T conventionnels naïfs. L'environnement cytokinique (IL-10 et TGF- $\beta$  en particulier) est essentiel à la production et à l'induction de ces Treg induits (Figure 1).

### Caractéristiques des Treg naturels (nTreg)

Au fil des années, plusieurs marqueurs plus ou moins spécifiques des Treg ont été caractérisés. Historiquement, ces lymphocytes ont d'abord été identifiés par le phénotype peu spécifique CD5<sup>fort</sup> (en

Cet article et le suivant (intitulé « Utilisation thérapeutique des lymphocytes T régulateurs dans les maladies auto-immunes » qui paraîtra dans le numéro d'août/septembre de *médecine/sciences*, n°8-9, vol. 28) ont été soumis par deux étudiants en médecine (Aurélié Siri et Hubert de Boysson) et une étudiante en pharmacie (Guilaine Boursier) dans le cadre d'un projet de 2<sup>e</sup> année du master immunotechnologies et biothérapies, université Pierre et Marie Curie - Paris 6.



## Rôle physiopathologique des Treg

### Treg et maladies auto-immunes

L'absence de Treg entraîne, chez l'animal comme chez l'homme, un syndrome auto-immun témoignant du rôle central des Treg dans la prévention d'une autoréactivité pathogène [11, 12]. L'auto-immunité peut donc être définie comme une rupture de

**Figure 1.** Les lymphocytes T régulateurs, une population aux multiples facettes.

1985) ou CD45R<sup>faible</sup> (en 1990). En 1995, S. Sakaguchi *et al.* [5] ont permis un progrès décisif en identifiant à leur surface le marqueur CD25 (chaîne  $\alpha$  du récepteur de l'IL-2), marqueur plus spécifique encore utilisé aujourd'hui. En effet, les résultats montrent que la déplétion, chez la souris, des cellules CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> conduit au développement de maladies auto-immunes, suggérant que les cellules CD25<sup>+</sup> régulent la réponse inflammatoire et que l'IL-2 est indispensable au maintien de ces cellules [1, 5]. Ce marqueur fut le seul utilisé pendant près de 10 ans pour reconnaître les Treg. Son inconvénient majeur est d'être également exprimé à la surface des lymphocytes T effecteurs (Teff) activés, quoique généralement à des niveaux plus faibles que sur les Treg. Ainsi, le phénotype CD25<sup>fort</sup> est retenu pour isoler les Treg, mais un marquage plus spécifique devenait nécessaire. En 2003, plusieurs équipes montrent que le facteur de transcription FOXP3 (*forkhead box p3*) est exprimé par les Treg [6]. Le gène *FOXP3* est essentiel au développement des Treg comme en témoigne la survenue chez l'homme du syndrome IPEX<sup>1</sup>, un tableau auto-immun survenant lorsque ce facteur est muté. De fait, FOXP3 joue un rôle central dans la différenciation et le maintien des Treg. Il est admis que les nTreg sont de phénotype CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>. Chez la souris, ce marquage est spécifique des Treg. Cependant, chez l'homme, il a été montré récemment que les Teff peuvent exprimer faiblement et transitoirement FOXP3 lors de leur activation [7].

Afin d'optimiser l'identification des nTreg, de nombreux autres marqueurs peuvent être utilisés en combinaison avec CD25 et/ou FOXP3. Le CD127 (chaîne  $\alpha$  du récepteur de l'IL-7) par exemple n'est pas ou peu exprimé par les Treg [8]. De même, l'expression de CD45RA permet de différencier les Treg au repos (CD45RA<sup>+</sup>FOXP3<sup>faible</sup>) ou activés (CD45RA<sup>-</sup>FOXP3<sup>fort</sup>) de Teff exprimant faiblement FOXP3 (CD45RA<sup>-</sup>) [2, 9]. Les Treg CD4<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> présentent certains des marqueurs de LT activés : ils expriment plus fortement à leur surface des marqueurs d'activation tels que CD5, CD25, CD44, CD103, CTLA-4 ou le GITR (*glucocorticoid-induced tumor necrosis factor [TNF] receptor*). Les nTreg présentent aussi des marqueurs absents de la surface des Teff tel que GARP (*glycoprotein A repetitions predominant*) [10].

tolérance au soi, dont l'origine est probablement multifactorielle (génétique, infectieuse, environnementale). Chez l'homme, de nombreuses maladies auto-immunes seraient associées à un déficit quantitatif ou qualitatif des Treg [13]. Le nombre de Treg est un facteur essentiel au maintien de l'homéostasie, et une quantité inadaptée de ces cellules peut faire pencher la balance en faveur des Teff autoréactifs. De manière intéressante, une augmentation de Treg a été observée dans les tissus cibles de patients atteints de sclérose en plaques, de polyarthrite rhumatoïde ou de psoriasis, suggérant que le défaut de régulation dans les tissus inflammatoires serait lié à un déficit fonctionnel des Treg. L'activité et la fonctionnalité des Treg sont difficiles à évaluer et reposent le plus souvent sur des expériences de cocultures *in vitro* de Treg et de Teff. La fonction des Treg est analysée par l'inhibition de la prolifération des Teff et par la production de cytokines anti-inflammatoires, telles que l'IL-10 et le TGF- $\beta$ . Ces déficits fonctionnels des Treg sont encore mal compris et relèvent probablement de facteurs intrinsèques (contacts cellulaires insuffisants, défauts de transduction du signal ou des mécanismes de suppression), mais également extrinsèques (balance inadaptée entre cytokines pro- et anti-inflammatoires, résistance des Teff à l'action des Treg) [13]. La connaissance de ces mécanismes pourrait permettre de développer de nouvelles approches thérapeutiques visant à restaurer le phénomène de tolérance.

### Treg et cancer

L'immunologie appliquée à la cancérologie a bénéficié ces dernières années de progrès significatifs. La mise en évidence d'antigènes associés aux tumeurs pourrait ouvrir la voie à de nouvelles approches thérapeutiques visant à induire ou à majorer la réponse immunitaire contre les cellules tumorales. Des travaux récents ont confirmé que certains Treg reconnaissent

<sup>1</sup> IPEX : immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked.

spécifiquement les antigènes associés aux tumeurs et peuvent supprimer la réponse immunitaire dirigée contre les cellules tumorales. De même, un nombre anormalement élevé de Treg a été détecté dans le sang, les tumeurs et les ganglions drainants de patients atteints de mélanome, de lymphome de Hodgkin et de différents carcinomes. Cette observation est corrélée à un mauvais pronostic. Il a été montré que ces Treg sont de phénotype mémoire et inhibent très tôt la réponse immunitaire antitumorale [14]. L'implication néfaste des Treg a également été évoquée dans plusieurs modèles animaux chez lesquels la déplétion des cellules CD25<sup>fort</sup> permet d'obtenir une régression tumorale. De même, l'injection d'une suspension de cellules CD4<sup>+</sup> dont on a éliminé les Treg pourrait entraîner une réponse antitumorale efficace [15, 16]. Ces découvertes permettent d'envisager aujourd'hui de nouveaux traitements plus spécifiques ayant pour but de stimuler une réponse effectrice aux dépens de la réponse régulatrice. Cette démarche est actuellement testée dans plusieurs protocoles cliniques en cours d'essais.

### Dans la transplantation d'organe

La transplantation d'organe a également bénéficié des progrès de l'immunologie. Le contrôle du rejet reste la principale priorité et repose pour le moment surtout sur l'utilisation d'immunosuppresseurs qui minimisent la réaction des Teff allogéniques dirigée contre les antigènes du greffon. Toutefois, ces traitements occasionnent d'importants effets indésirables et n'empêchent que partiellement le rejet chronique, qui représente toujours la principale cause d'échec de greffe. Dans plusieurs modèles animaux, la déplétion des Treg entraîne une perte rapide du greffon, tandis que leur transfert adoptif permet une survie prolongée de la greffe. Chez l'homme, un nombre important de Treg a été trouvé dans des biopsies ou dans les urines de patients faisant un rejet aigu de greffe de cœur et de rein respectivement. Ces observations suggèrent que les Treg agissent en réponse à l'activité des Teff responsables du rejet. Par ailleurs, d'autres travaux rapportent un taux de Treg significativement bas dans le sang de patients ayant un rejet chronique de greffe de foie. Ainsi, le résultat de la greffe (tolérance ou rejet) dépend probablement de la balance entre Teff allogéniques et Treg [17].

### Treg et maladie du greffon contre l'hôte

Le rôle des Treg a également été caractérisé dans la maladie du greffon contre l'hôte (GVHD), complication redoutable des greffes de cellules souches hématopoïétiques [18]. Lors de cette complication, les Teff compétents du donneur déclenchent une réponse immunitaire contre les antigènes du receveur. Cette réaction peut être prévenue par le transfert de Treg. À ce titre, des stratégies d'induction ou de thérapies cellulaires semblent aujourd'hui prometteuses [18].

### Treg et infections chroniques

Dans des modèles animaux d'infections par *Candida*, *Pneumocystis*, *Leishmania* ou *Listeria*, il semble que le nombre de Treg soit augmenté dans le sang et les organes infectés. Chez l'homme, certaines infections virales (virus de l'hépatite C et de l'immunodéficience

humaine notamment) s'accompagnent d'une expansion dérégulée du compartiment des Treg ainsi que d'une augmentation des cytokines anti-inflammatoires [19]. Ainsi, les Treg semblent contrôler la balance entre une réponse anti-infectieuse efficace et une réaction inflammatoire délétère. En effet, dans les infections chroniques, la stimulation continue du système immunitaire aboutirait, en l'absence de régulation, à une expansion disproportionnée des Teff spécifiques du pathogène. Toutefois, l'origine de l'augmentation des Treg dans ces infections reste encore controversée, même si quelques études suggèrent que certains pathogènes favoriseraient l'expansion des Treg pour échapper au système immunitaire [19].

### Treg et allergie

L'allergie résulte principalement de l'action des Teff Th2, ce qui explique l'augmentation des IgE. Il a été montré que ces phénomènes étaient corrélés à une diminution fonctionnelle des Treg, expliquant le déséquilibre en faveur d'une réponse pro-inflammatoire. Plusieurs modèles ont déjà montré que la restauration de l'équilibre entre Teff et Treg permettait de diminuer le phénomène d'allergie [2, 20].

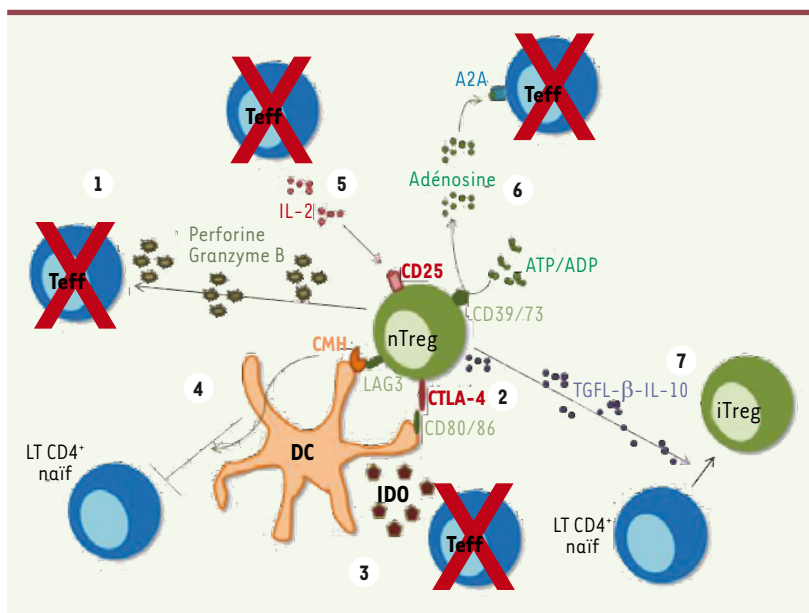
### Mécanismes des fonctions suppressives des nTreg

Les nTreg naïfs qui ont quitté le thymus vont coloniser les tissus lymphoïdes et certains tissus non lymphoïdes (graisse, peau, foie). Ils peuvent exercer leur fonction suppressive dans ces deux types de tissus. Ils représentent environ 10 % des lymphocytes T CD4 périphériques [7]. Lors de la rencontre avec un antigène, les nTreg s'activent et expriment des récepteurs de chimiokines et des molécules d'adhésion leur permettant de quitter le ganglion et de migrer vers les tissus inflammatoires où ils exercent leurs fonctions suppressives. Il existe de nombreux mécanismes suppresseurs (Figure 2), et nous allons décrire les principaux.

### Production de cytokines ou métabolites toxiques

L'IL-10 et le TGF- $\beta$  sont des cytokines essentielles aux nTreg pour l'exercice de leurs fonctions suppressives. Outre son activité suppressive, le TGF- $\beta$  est important pour le développement des iTreg (voir plus loin). Chez la souris, l'IL-35 semble également jouer un rôle suppresseur. Il s'agit d'une protéine hétérodimérique composée de la chaîne p35 de l'IL-12 et d'*Ebi3* (*Eps-tein-Barr virus induced gene 3*). Son expression par les nTreg est sous le contrôle de Foxp3 [21]. Les nTreg déficients en p35 ou *Ebi3* ont des capacités suppressives





**Figure 2. Mécanisme des fonctions suppressives des nTreg.** (1) Lyse des Teff via une production de granzyme et de perforine ; (2) liaison du CTLA-4 avec CD80/86 induisant une diminution des capacités activatrices de la cellule dendritique (DC) (diminution de la présentation antigénique, production de cytokines anti-inflammatoires, production d'IDO) ; (3) métabolite toxique pour les Teff ; (4) compétition dans la liaison au CMH II entre Treg et Teff (liaison de LAG3 au CMH II, plus stable que la liaison du TCR au CMH II) ; (5) capture de l'IL-2 via le CD25 permettant de limiter l'expansion et la survie des Teff ; (6) production d'adénosine via la dégradation de l'ATP/ADP par le CD39/73 permettant d'inhiber les Teff ; (7) induction de iTreg via la production de TGF- $\beta$ .

réduites *in vitro* et sont incapables de contrôler les pathologies inflammatoires de l'intestin.

L'HO-1 (*heme oxygenase-1*) produite par les nTreg permet de catalyser la formation de monoxyde de carbone à partir d'hème. Ceci permet de limiter la production d'IL-2, une cytokine indispensable à la prolifération des lymphocytes T [22]. De façon similaire, le CD39 et le CD73 (deux ectoenzymes qui catalysent la formation d'adénosine) exprimés à la surface des nTreg permettent la production d'adénosine à partir d'ATP et d'ADP extracellulaires [23]. L'adénosine est capable d'inhiber les Teff par l'intermédiaire du récepteur A2A de ces derniers.

### Interaction des nTreg avec les Teff

*In vitro*, il a été démontré que les nTreg sont capables de bloquer la prolifération des Teff en l'absence de cellules présentatrices d'antigène, confirmant un effet direct des nTreg sur les Teff, entre autres grâce à l'AMPc [24, 25].

Les nTreg sont également capables de lyser directement les Teff en libérant du granzyme B et de la perforine [26]. D'autres travaux ont également montré que l'interaction nTreg/Teff permet d'induire l'apoptose via le facteur proapoptotique Bim exprimé par les Teff. De fait, les Teff déficients en Bim sont capables de résister à la suppression exercée par les nTreg.

Enfin, les Treg activés expriment fortement le CD25, récepteur à l'IL-2 de haute affinité. Les Treg peuvent capturer l'IL-2 présente dans le milieu et, par compétition, en priver les Teff. De plus, l'IL-2 est utilisée par les Treg pour favoriser leur survie [27]. En pathologie humaine, les déficits en CD25 entraînent des syndromes inflammatoires lymphoprolifératifs associés à des atteintes auto-immunes, indiscernables du syndrome IPEX.

### Interaction des nTreg avec les cellules présentatrices d'antigène

L'interaction des nTreg avec les cellules présentatrices d'antigène induit de profondes modifications altérant la capacité de

ces dernières à activer les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> naïfs. Différents mécanismes, comme le blocage de la présentation antigénique et de la maturation des cellules dendritiques, concourent à cet effet.

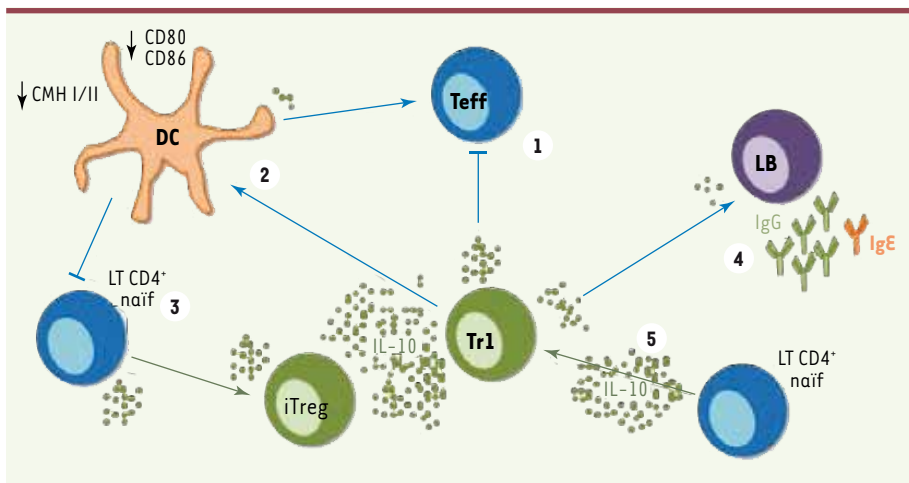
Les nTreg induisent également la production de facteurs suppresseurs par les cellules dendritiques comme l'IDO (indoléamine 2,3-dioxygénase) après l'interaction du CD80/86 avec le récepteur inhibiteur CTLA-4 (*cytotoxic T-lymphocyte antigen 4*). L'IDO entraîne le catabolisme du tryptophane en un métabolite toxique pour les Teff.

### Caractéristiques des Treg induits (iTreg)

Les iTreg se différencient en cellules suppressives à la périphérie. Cette différenciation se fait à partir de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> naïfs et dépend du milieu cytokinique, de l'activation antigénique et de la coexistence d'autres cellules. Les iTreg ne sont pas homogènes et sont difficiles à caractériser *in vivo* en raison de l'absence de marqueurs spécifiques. Deux populations semblent toutefois mieux caractérisées : les iTreg FOXP3<sup>+</sup> et les Tr1.

#### Les iTreg FOXP3<sup>+</sup>

*In vitro*, la culture de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> naïfs avec du TGF- $\beta$  permet d'induire des lymphocytes T aux fonctions suppressives et au phénotype proche des nTreg. En effet, ces iTreg sont de phénotype CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>. *In vivo*, ces iTreg seraient abondants dans l'intestin. Il semble que dans ce tissu, l'action conjointe du TGF- $\beta$ , des cellules dendritiques CD103<sup>+</sup> et de l'acide rétinoïque permet d'induire des iTreg essentiels au maintien de la tolérance, notamment vis-à-vis des antigènes



**Figure 3. Effets suppresseurs de l'IL-10.** (1) Inhibition des Teff ; (2) diminution de l'expression du CMH I/II et du CD80/86 sur les cellules dendritiques ; (3) induction de iTreg à partir de lymphocytes T naïfs ; (4) orientation de la commutation de classe des lymphocytes B (LB) vers une production d'IgG4 plutôt que d'IgE ; (5) différenciation de lymphocytes T naïfs en Tr1.

alimentaires et de la flore commensale du tube digestif. Parmi ces iTreg, soulignons l'existence des Th3, une population régulatrice produisant de grandes quantités de TGF- $\beta$  et particulièrement importante pour les tissus en contact avec l'environnement (en particulier les muqueuses respiratoires et digestives).

### Les Tr1

Cette population a été découverte en 1997 lors de la stimulation de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> naïfs par l'antigène ovalbumine en présence d'IL-10. Son profil cytokinique est défini, après activation, comme étant IL-10<sup>fort</sup>, TGF- $\beta$ <sup>fort</sup>, IL-5<sup>fort</sup>, IFN- $\gamma$ <sup>faible</sup>, IL-2<sup>faible</sup> et IL-4<sup>-</sup>. Cependant, selon leur mode d'induction, il peut exister quelques variations. De manière consensuelle, il est admis que cette population produit de l'IL-10 et ne produit pas d'IL-4, ce qui la distingue des Th2 [28]. L'IL-10 est une cytokine anti-inflammatoire particulièrement importante dans les mécanismes de tolérance au niveau des tissus d'interface avec l'environnement. En effet, il a été montré *in vivo* que les souris déficientes en IL-10 développent spontanément un tableau de colite, réversible avec l'administration de Tr1. Les Tr1 ont la particularité de migrer aux sites inflammatoires sans activation antigénique préalable. Les Tr1 activés produisent de l'IL-10 et expriment différents marqueurs - CD40L, CD69, CD28, CTLA-4 et HLA-DR - communs aux nTreg. L'IL-10 est la cytokine clé grâce à laquelle les Tr1 exercent leurs fonctions suppressives par un effet indirect dit *bystander*, *in vitro* et *in vivo* (Figure 3). D'autres mécanismes comme la production de TGF- $\beta$ , ainsi que certains signaux issus de contacts cellulaires passant par le CTLA-4, le TGF- $\beta$  membranaire, le GITR et le PD-1 (*programmed death receptor-1*) participent aux fonctions suppressives des Tr1 dans certaines conditions [29, 30]. L'IL-10 inhibe la production de chimiokines, molécules influençant la migration des LT, et des cytokines proinflammatoires par les cellules présentatrices d'antigènes. Elle entraîne une diminution de l'expression du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I et II et des molécules de costimulation comme le CD80/CD86 et le CD58 sur les

cellules dendritiques. Ces différents mécanismes permettent de stopper l'activation des Teff naïfs, d'induire une anergie des Teff activés et d'activer ou d'induire d'autres Treg.

### Conclusion

Depuis leur redécouverte en 1995, les Treg ont fait l'objet de milliers de publications. La découverte de leur implication dans de nombreux processus physiologiques et pathologiques, l'identification de certains marqueurs et la compréhension de leurs mécanismes de suppression, permettent d'envisager aujourd'hui leur potentiel thérapeutique. Leur utilité thé-

rapeutique est déjà en cours d'évaluation dans différentes pathologies comme les hémopathies malignes ou, de façon plus récente, dans les maladies auto-immunes. Les résultats sont prometteurs, mais différents obstacles restent à franchir avant une utilisation thérapeutique en routine.  $\diamond$

### SUMMARY

#### Regulatory T lymphocytes CD4<sup>+</sup>: current issues

Regulatory T cells (Treg) are involved in the maintenance of peripheral tolerance and in the prevention of autoimmune diseases. They are also essential to the regulation of immune responses observed in allergy, transplantation, cancers and infectious diseases. Most of Treg, called natural, differentiate in the thymus and are defined by their expression of CD4, CD25 and the transcription factor FOXP3. However, another population of Treg induced in the periphery has been recently characterized and appears to play an important role as well. In this review, we will discuss certain aspects of Treg, concerning notably their characterization, their role in normal and disease states, their mechanisms of action. Finally, we will discuss the significance of induced Treg.  $\diamond$

#### LIENS D'INTÉRÊT

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

#### REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient Benoit Salomon pour ses conseils avisés lors de la rédaction de ce manuscrit, ainsi que Leslie Gosse (de la promotion ITB 2010-2011) et son équipe enseignante pour leur soutien et leur aide.

## RÉFÉRENCES

1. Chatenoud L, Salomon B, Bluestone JA. Suppressor T cells: they're back and critical for regulation of autoimmunity! *Immunity* 2001 ; 182 : 149-63.
2. Sakaguchi S, Miyara M, Costantino CM, Hafler DA. FOXP3<sup>+</sup> regulatory T cells in the human immune system. *Nat Rev Immunol* 2010 ; 10 : 490-500.
3. Aschenbrenner K, D'Cruz LM, Vollmann EH, et al. Selection of Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells specific for self antigen expressed and presented by Aire<sup>+</sup> medullary thymic epithelial cells. *Nat Immunol* 2007 ; 8 : 351-8.
4. Asano M, Toda M, Sakaguchi N, Sakaguchi S. Autoimmune disease as a consequence of developmental abnormality of a T cell subpopulation. *J Exp Med* 1996 ; 184 : 387-96.
5. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, et al. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 1995 ; 155 : 1151-64.
6. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 2003 ; 299 : 1057-61.
7. Campbell DJ, Koch MA. Phenotypic and functional specialization of FOXP3<sup>+</sup> regulatory T cells. *Nat Rev Immunol* 2011 ; 11 : 119-30.
8. Liu W, Putnam AL, Xu-Yu Z, et al. CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4<sup>+</sup> T reg cells. *J Exp Med* 2006 ; 203 : 1701-11.
9. Miyara M, Yoshioka Y, Kitoh A, et al. Functional delineation and differentiation dynamics of human CD4<sup>+</sup> T cells expressing the FoxP3 transcription factor. *Immunity* 2009 ; 30 : 899-911.
10. Tran DQ, Andersson J, Wang R, et al. GARP (LRRC32) is essential for the surface expression of latent TGF-beta on platelets and activated FOXP3<sup>+</sup> regulatory T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009 ; 106 : 13445-50.
11. Kim JM, Rasmussen JP, Rudensky AY. Regulatory T cells prevent catastrophic autoimmunity throughout the lifespan of mice. *Nat Immunol* 2007 ; 8 : 191-7.
12. Malek TR, Yu A, Vincek V, et al. CD4 regulatory T cells prevent lethal autoimmunity in IL-2Rbeta-deficient mice. Implications for the nonredundant function of IL-2. *Immunity* 2002 ; 17 : 167-78.
13. Buckner JH. Mechanisms of impaired regulation by CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> regulatory T cells in human autoimmune diseases. *Nat Rev Immunol* 2010 ; 10 : 849-59.
14. Darrasse-Jeze G, Bergot AS, Durgeau A, et al. Tumor emergence is sensed by self-specific CD44hi memory Tregs that create a dominant tolerogenic environment for tumors in mice. *J Clin Invest* 2009 ; 119 : 2648-62.
15. Maury S, Lemoine FM, Hicheri Y, et al. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cell depletion improves the graft-versus-tumor effect of donor lymphocytes after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Sci Transl Med* 2010 ; 2 : 41ra52.
16. Nishikawa H, Sakaguchi S. Regulatory T cells in tumor immunity. *Int J Cancer* 2010 ; 127 : 759-67.
17. Boros P, Bromberg JS. Human FOXP3<sup>+</sup> regulatory T cells in transplantation. *Am J Transplant* 2009 ; 9 : 1719-24.
18. Cohen JL, Trenado A, Vasey D, et al. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> immunoregulatory T cells: new therapeutics for graft-versus-host disease. *J Exp Med* 2002 ; 196 : 401-6.
19. Mittrucker HW, Kaufmann SH. Mini-review: regulatory T cells and infection: suppression revisited. *Eur J Immunol* 2004 ; 34 : 306-12.
20. Palomares O, Yaman G, Azkur AK, et al. Role of Treg in immune regulation of allergic diseases. *Eur J Immunol* 2010 ; 40 : 1232-40.
21. Collison LW, Workman CJ, Kuo TT, et al. The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature* 2007 ; 450 : 566-9.
22. Choi BM, Pae HO, Jeong YR, et al. Critical role of heme oxygenase-1 in Foxp3-mediated immune suppression. *Biochem Biophys Res Commun* 2005 ; 327 : 1066-71.
23. Deaglio S, Dwyer KM, Gao W, et al. Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J Exp Med* 2007 ; 204 : 1257-65.
24. Bopp T, Becker C, Klein M, et al. Cyclic adenosine monophosphate is a key component of regulatory T cell-mediated suppression. *J Exp Med* 2007 ; 204 : 1303-10.
25. Piccirillo CA, Shevach EM. Cutting edge: control of CD8<sup>+</sup> T cell activation by CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> immunoregulatory cells. *J Immunol* 2001 ; 167 : 1137-40.
26. Grossman WJ, Verbsky JW, Barchet W, et al. Human T regulatory cells can use the perforin pathway to cause autologous target cell death. *Immunity* 2004 ; 21 : 589-601.
27. Grinberg-Bleyer Y, Baeyens A, You S, et al. IL-2 reverses established type 1 diabetes in NOD mice by a local effect on pancreatic regulatory T cells. *J Exp Med* 2010 ; 207 : 1871-8.
28. Roncarolo MG, Gregori S, Battaglia M, et al. Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans. *Immunity* 2006 ; 212 : 28-50.
29. Levings MK, Roncarolo MG. Phenotypic and functional differences between human CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> and type 1 regulatory T cells. *Curr Top Microbiol Immunol* 2005 ; 293 : 303-26.
30. Wu K, Bi Y, Sun K, Wang C. IL-10-producing type 1 regulatory T cells and allergy. *Cell Mol Immunol* 2007 ; 4 : 269-75.

### TIRÉS À PART

A. Siri

► Les lymphocytes T régulateurs (Treg) ont un rôle fondamental dans le maintien de la tolérance immunitaire. Des déficits qualitatifs ou quantitatifs de ces cellules ont été mis en évidence dans les maladies auto-immunes. La thérapie cellulaire par administration de Treg pourrait avoir un effet à long terme. Elle semble donc être une approche séduisante et innovante, ce d'autant que les traitements usuels des maladies auto-immunes sont souvent non curatifs, et doivent être administrés de façon répétée. Des résultats encourageants ont montré que le transfert de Treg naturels (nTreg) CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> ou de certains Treg induits (iTreg) *in vitro* permettait de ralentir l'évolution de ces pathologies dans des modèles murins. L'objectif de cette revue est de faire un état des lieux sur ces nouvelles thérapies et d'en discuter le potentiel thérapeutique et leurs limites. ◀

### Maladies auto-immunes et lymphocytes T régulateurs (Treg)

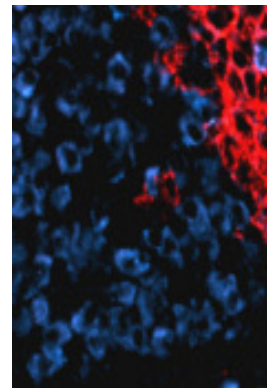
L'équilibre entre les lymphocytes T (LT) CD4<sup>+</sup> effecteurs ou conventionnels (Teff) et les lymphocytes T régulateurs (Treg) est indispensable au maintien de la tolérance immunitaire. Les maladies auto-immunes se développent lorsque cette tolérance est rompue chez des patients ayant une prédisposition génétique. Des facteurs environnementaux ou immunologiques peuvent être impliqués dans le déclenchement de ces pathologies. Par exemple, une réactivité croisée entre certains autoantigènes et des antigènes microbiens serait un des mécanismes expliquant l'apparition d'une auto-immunité (→) [32].

La mutation de certaines molécules régulant négativement l'activité des LT, telles que le CTLA-4 (*cytotoxic T-lymphocyte antigen 4*), peut également entraîner l'apparition de maladies auto-immunes. Les thérapies visant à restaurer la fonctionnalité ou le

(→) Voir l'article de M. Mirabel *et al.*, m/s n° 6-7, juin-juillet 2012, page 633

## Utilisation des lymphocytes T régulateurs en thérapies cellulaires dans les maladies auto-immunes

Guilaine Boursier<sup>1</sup>, Aurélie Siri<sup>1</sup>, Hubert de Boysson



UMPC Univ Paris 06, Master sciences et technologies, mention biologie moléculaire et cellulaire, parcours immunotechnologies et biothérapies, Paris 6 (PRES Sorbonne Universités), 4, place Jussieu, 75005 Paris, France. [gboursier@gmail.com](mailto:gboursier@gmail.com) [aurelie.siri@hotmail.fr](mailto:aurelie.siri@hotmail.fr)

<sup>1</sup>G. Boursier et A. Siri ont contribué de façon équivalente à cet article.

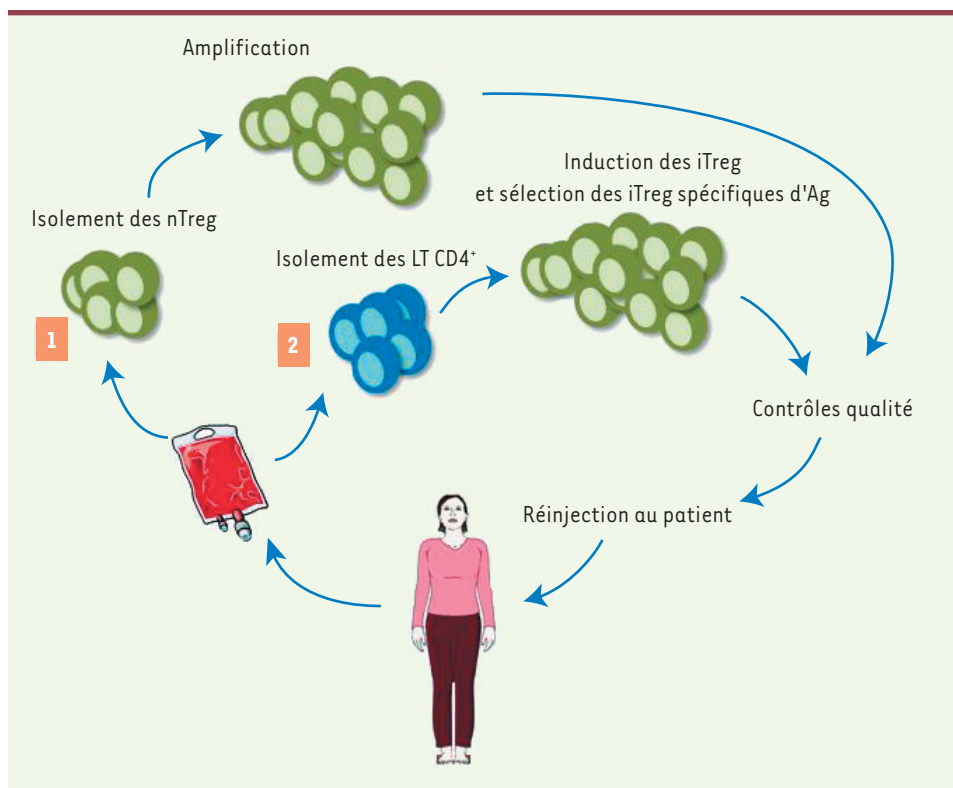
nombre des Treg *in vivo* dans un certain nombre de pathologies pourraient donc être envisagées dans le futur. L'utilisation de ces cellules est également envisageable lors des transplantations, comme traitement de la maladie du greffon contre l'hôte et dans l'allergie [2-4, 31].

- Dans le diabète de type 1, la réponse effectrice auto-immune dirigée contre les cellules β des îlots de Langerhans du pancréas conduit à la destruction de ces cellules. Chez les souris NOD (*non obese diabetic*), modèle murin de diabète de type 1, la déplétion ou l'altération des Treg entraîne une destruction accélérée des cellules β des îlots [4]. À l'inverse, la maladie ne se développe pas si l'on transfère des Treg spécifiques d'antigènes de ces mêmes cellules [5].

- Dans le lupus érythémateux disséminé, il existe un déficit quantitatif et qualitatif en Treg, qui sont plus susceptibles à l'apoptose induite par Fas (ou CD95) [6]. Le transfert de Treg dans un modèle de souris lupique, avant et après le développement de la maladie, entraîne un ralentissement de l'évolution de la pathologie [7].

- Les souris ayant reçu des Treg simultanément à l'induction expérimentale d'une encéphalite auto-immune, qui représente un modèle murin de sclérose en plaques, sont protégées de l'apparition de la pathologie, et l'infiltration du système nerveux central par des cellules inflammatoires y est moindre. Le transfert de Treg chez des souris

Voir le premier article de cette série de deux articles : Siri A, de Boysson H, Boursier G. *Med Sci (Paris)* 2012 ; 28, n° 6-7, pages 646-51 [31].



**Figure 1. Principe de la thérapie cellulaire.** Actuellement, deux protocoles de thérapie cellulaire autologue sont utilisés en essai clinique dans les maladies auto-immunes. Les étapes sont : (1) isolement, purification et amplification des nTreg du patient et réinjection ; (2) induction puis sélection des iTreg spécifiques d'antigènes à partir des LT CD4<sup>+</sup> du patient et réinjection.

déficientes pour le gène codant pour l'IL(interleukine)-10, une cytokine régulatrice, ne montre pas la même efficacité, suggérant que cette cytokine intervient dans la protection qu'exercent les Treg contre l'encéphalite auto-immune expérimentale [10].

- L'implication des Treg a également été démontrée dans des modèles expérimentaux d'auto-immunité comme la polyarthrite rhumatoïde, la polymyosite et le psoriasis ; le transfert de Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> peut y montrer une diminution de la sévérité de la pathologie [9, 10].

- L'immunité locale de l'intestin est finement régulée afin de permettre une réponse adaptée contre les agents pathogènes, tout en épargnant la flore commensale et les antigènes alimentaires. La maladie de Crohn est due à une dérégulation de cette immunité – principalement envers les antigènes de la flore intestinale – qui est responsable d'une colite inflammatoire. Chez ces patients, l'étude de biopsies de côlon a révélé un taux élevé de Treg Foxp3<sup>+</sup> dans la lamina propria. Les Treg de la lamina propria ont la propriété de sécréter de l'IL-10, une cytokine anti-inflammatoire qui semble être un élément clé de la régulation de l'inflammation du côlon chez la souris [8].

Ces expériences établissent l'importance des Treg dans le contrôle de la réponse auto-immune ainsi que du cas particulier de la maladie de Crohn ; ces cellules pourraient donc représenter une thérapie cellulaire d'avenir pour la restauration de la tolérance immunitaire dans les maladies auto-immunes où les Treg sont le plus souvent quantitative-

ment et/ou qualitativement déficitaires. De nombreux travaux ont permis de développer des méthodes d'isolement et d'amplification *ex vivo* des Treg de patients en vue de leur utilisation, le plus souvent de manière autologue (Figure 1), pour restaurer ou induire la tolérance.

### La thérapie cellulaire par Treg

Dans des modèles murins d'auto-immunité, le transfert adoptif de Treg permet d'obtenir de nettes améliorations cliniques [10]. *In vitro*, les capacités suppressives des Treg dépendent de leur activation *via* le TCR (*T cell receptor*), suggérant que les Treg spécifiques de l'antigène

spécifiques de l'antigène sont plus efficaces que des Treg polyclonaux [11]. On peut penser que ces thérapies cellulaires seraient d'autant plus efficaces que les Treg seraient purs, stables dans leur fonction et à longue durée de vie. Différentes stratégies d'isolement et/ou d'enrichissement de Treg humains polyclonaux ou spécifiques d'antigènes ont été décrites, mais aucune n'est à ce jour consensuelle. Ces stratégies varient selon le type de Treg utilisés. On distingue les Treg naturels CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>, dérivés du thymus (nTreg), et les Treg induits (iTreg), différenciés en périphérie (→) [31].

(→) Voir l'article de A. Siri *et al.*, m/s n°6-7, juin-juillet 2012, page 646

Les Treg envisagés à ce jour en thérapie cellulaire sont les nTreg CD4<sup>+</sup> et les Treg induits de type 1 (Tr1) producteurs d'IL-10. Quelques essais cliniques de thérapie cellulaire en cours de développement dans les maladies auto-immunes sont présentés dans le *Tableau 1*.

#### Utilisation des nTreg CD4<sup>+</sup>

L'objectif des stratégies utilisant les nTreg est d'augmenter la quantité de nTreg fonctionnels polyclonaux chez le patient. Dans cette approche, un échantillon de sang est prélevé chez le patient, puis les nTreg sont purifiés, cultivés et réinjectés à ce même patient. Une fois réinjectés en périphérie, les Treg migrent vers les tissus lymphoïdes et les sites inflammatoires atteints



Nom/Produit	Méthode d'isolement	Méthode d'enrichissement/ induction	Date	Pathologie	Statut	Équipe impliquée
T1DM <i>Immuno-therapy</i> CD4 <sup>+</sup> CD127 <sup>0/-</sup> CD25 <sup>+</sup> Treg polyclonal	TriFACS des CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>fort</sup> CD127 <sup>-</sup> polyclonaux autologues	Expansion par billes anti-CD3, anti-CD28	2011	DT1	I	S.E. Gitelman J. Bluestone San Francisco
Myoreg-01 nTreg	Tri billes des CD25 <sup>fort</sup>	Expansion par billes anti-CD3, anti-CD28 en présence de rapamycine et transfert d'un gène suicide	2012	Myosite à inclusion	I/II	O. Benveniste D. Klatzmann AP-HP
UVREG nTreg	Tri billes des CD25 <sup>fort</sup>	Stimulation pendant 48 h anti-CD3	2012	Uvéite sévère bilatérale	I/II	B. Bodaghi B. Salomon AP-HP
Txcell OvaSave <sup>®</sup> iTreg	Clonage par dilution limite. Sélection sur profil cytokinines Tr1 IL-10 <sup>fort</sup> IFN $\gamma$ <sup>faible</sup> IL-4 <sup>faible</sup> et spécifiques d'OVA	Cellules nourricières modifiées avec anti-CD3, CD58, CD80, IL-2 et IL-4. Génération d'iTreg OVA-spécifiques	2009	Maladie de Crohn	I/IIa	F. Meyer A. Foussat Sophia-Antipolis
Txcell TX-RAD <sup>®</sup> iTreg	Clonage par dilution limite. Sélection sur profil cytokinines Tr1 IL-10 <sup>fort</sup> IFN $\gamma$ <sup>faible</sup> IL-4 <sup>faible</sup> et collagène-spécificité	Cellules nourricières modifiées avec anti-CD3, CD58, CD80, IL-2 et IL-4. Génération d'iTreg spécifiques du collagène	2012	Polyarthrite rhumatoïde	I/IIa	F. Meyer A. Foussat Sophia-Antipolis

**Tableau 1. Essais cliniques en cours avec des Treg dans des maladies auto-immunes.**

AP-HP : assistance publique-hôpitaux de Paris ; FACS : *fluorescence activated cell sorter* ; DT1 : diabète de type 1 ; OVA : ovalbumine.

par le système immunitaire. Les nTreg exprimant fortement CD25 sont purifiés à partir des cellules mononucléées périphériques en utilisant des billes magnétiques, et les Treg de phénotype CD4<sup>+</sup>CD25<sup>fort</sup>CD127<sup>faible</sup> par cytométrie de flux. Ils constituent environ 2 à 4 % des LT CD4<sup>+</sup>, et le nombre de Treg que l'on peut purifier par patient est de l'ordre d'une centaine de millions. Ce nombre est insuffisant pour provoquer un effet clinique. Une phase d'amplification est donc indispensable. Plusieurs équipes ont développé des techniques d'enrichissement des nTreg murins et humains *in vitro*. Les Treg prolifèrent de manière polyclonale en présence d'anticorps monoclonaux anti-CD3 et anti-CD28 et de fortes quantités d'IL-2, ce qui permet de multiplier leur nombre par 100 à 2 700 fois en quelques semaines. Ces méthodes respectent les bonnes pratiques de fabrication (BPF) requises pour la production de produits cellulaires cliniques et sont donc utilisables en thérapie humaine. L'ajout de cellules nourricières ou de cellules présentatrices d'antigène modifiées permet d'augmenter encore ce rendement [12]. Les Treg ainsi amplifiés *in vitro* semblent stables et expriment plusieurs marqueurs spécifiques, incluant CD25 (chaîne  $\alpha$  du récepteur de l'IL-2), CTLA-4, CD62L (L-sélectine), GITR (*glucocorticoid-induced*

*tumor necrosis factor receptor family-related gene*) et Foxp3 [31]. Par ailleurs, leur capacité suppressive est meilleure après amplification [13, 14]. Une approche alternative sans phase d'expansion est proposée dans le traitement de l'uvéite<sup>1</sup>. Dans cet essai, il est envisagé d'administrer des nTreg préalablement activés pour enclencher leur programme suppresseur directement dans le vitré (*Encadré 1*) L'utilisation des Treg dans le traitement de la myosite à inclusion est également présentée dans l'*Encadré 2*.

### Les limites de l'utilisation des nTreg en thérapie cellulaire

L'enrichissement et la production de nTreg spécifiques d'antigènes de grade clinique sont encore des défis techniques. Même si leur efficacité semble supérieure

<sup>1</sup> Une uvéite est une inflammation de l'uvée, quelle que soit son origine et sa localisation : iris, corps ciliaire, vitré, choroïde.

## 1 Utilisation des Treg dans l'uvéïte

Interview du Dr Benoit Salomon, CNRS UMR 7087, CERVI, hôpital de la Pitié-Salpêtrière.

La thérapie cellulaire par administration de Treg est une approche prometteuse dans le traitement des maladies auto-immunes et inflammatoires chroniques. Son efficacité nécessite la présence de Treg activés dans le tissu cible, car l'activation des Treg est indispensable à la mise en place de leur fonction suppressive. C'est pourquoi des Treg spécifiques d'antigènes du tissu cible, qui vont se réactiver localement, sont plus efficaces que des Treg polyclonaux pour contrôler ces pathologies. Cependant, seuls les Treg polyclonaux peuvent être purifiés à ce jour en condition de grade clinique. Nous avons alors testé une approche alternative dans un modèle murin d'uvéïte consistant à injecter, directement dans la chambre postérieure de l'œil, des Treg polyclonaux préactivés avant injection pour les rendre suppresseurs. Nos résultats valident cette approche thérapeutique. En effet, nous montrons que l'injection dans le vitré de Treg polyclonaux, préactivés pendant deux jours en culture, induit une rémission de l'uvéïte. Sur la base de ces données précliniques, nous proposons un essai de phase I/II chez des patients souffrants d'uvéïte sévère bilatérale, réfractaire aux traitements de référence et présentant une faible acuité visuelle.

## 2 Utilisation des Treg dans la myosite à inclusion

Travaux du Pr Olivier Benveniste, service de médecine interne, hôpital de la Pitié-Salpêtrière, 83 boulevard de l'Hôpital, 75651 Paris Cedex 13, France.

La myosite à inclusion est une maladie inflammatoire rare du muscle survenant après 50 ans et pour laquelle aucun traitement efficace n'existe. Elle se caractérise par une infiltration dans le muscle de lymphocytes T CD8<sup>+</sup> autoréactifs responsables d'une destruction des fibres musculaires, ainsi qu'une part dégénérative avec accumulations de protéines telles que la protéine  $\beta$  amyloïde formant des vacuoles (inclusions). Dans un modèle expérimental de myosite chez la souris, le Pr O. Benveniste a montré que la suppression des Treg accélérerait le cours de la maladie, tandis que l'injection de Treg permettait d'éviter la maladie et diminuait l'infiltration par les LT CD8<sup>+</sup>. Ces résultats ont permis d'envisager un essai clinique de phase I/II mené par cette équipe à l'hôpital de la Pitié-Salpêtrière à Paris. Les patients retenus bénéficieront d'une injection intraveineuse de Treg polyclonaux autologues. Les cellules sanguines seront prélevées chez les patients par cytophérèse, et le tri des Treg se fera sur l'expression de CD25. Une phase d'amplification *ex vivo* dans un milieu de culture adapté est prévue pendant environ un mois, permettant d'obtenir un grand nombre de Treg avec une pureté supérieure à 90 %. L'utilisation d'un gène suicide permettra de supprimer au besoin ces cellules, en cas de prolifération ou de dysfonctionnement *in vivo*. L'efficacité de cette thérapie sera jugée, notamment sur l'évolution clinique.

à celle des Treg polyclonaux dans les modèles animaux, leur faible fréquence *in vivo* est un obstacle majeur pour leur isolement. Des

techniques innovantes sont actuellement étudiées afin d'amplifier ces cellules rares [14-16].

La réglementation des essais de thérapie cellulaire requiert que les protocoles de purification et d'amplification cellulaires soient compatibles avec une utilisation en clinique humaine, notamment en termes de stérilité, d'identité, de pureté et de viabilité des produits de thérapie cellulaire. Certains des LT CD25<sup>fort</sup> sélectionnés sont des Teff activés susceptibles de proliférer plus vigoureusement que les Treg dans le cas d'une culture prolongée [4, 13]. Afin de limiter cette contamination, l'adjonction de rapamycine dans les cultures de Treg a été testée. En effet, cet immunosuppresseur largement utilisé en transplantation augmente la prolifération des Treg mais surtout inhibe celle des Teff [17]. Parmi les autres marqueurs spécifiques des Treg, Foxp3 s'avère inutilisable pour leur isolement ; ce marqueur intracellulaire nécessite une perméabilisation de la membrane cellulaire qui entraîne la mort de la cellule. De plus, on sait aujourd'hui que Foxp3 est exprimé par certains Teff activés et, même si son niveau d'expression y est inférieur à celui des Treg, il ne peut pas être considéré comme un marqueur de pureté [6]. La faible expression du CD127 ou la positivité de CD45RA permettent de distinguer plus spécifiquement les Treg aux dépens des Teff [31].

La faible fréquence des nTreg, la difficulté de leur purification et de leur amplification en culture, ainsi que l'impossibilité pour le moment d'obtenir des nTreg spécifiques d'autoantigènes de grade clinique sont autant de freins importants à leur utilisation en routine. De plus, l'action suppressive des nTreg n'a pas encore été évaluée *in vivo*.

### Utilisation des Tr1 sécréteurs d'IL-10

Les Tr1 sont des Treg induits *in vitro* à partir de LT CD4<sup>+</sup> naïfs cultivés en présence d'IL-10. Même si on manque de marqueurs membranaires spécifiques pour les caractériser, ils présentent l'avantage de pouvoir être produits et amplifiés *in vitro* à partir de LT du patient. Après leur injection systémique, les Tr1 migrent aux sites inflammatoires sans activation préalable. Une fois sur place, ils sont activés et exercent leur effet suppresseur grâce à leur importante production d'IL-10 dont l'effet pléiotrope s'exerce à proximité [16]. Cet avantage confère aux Treg producteurs d'IL-10 des fonctions suppressives sur de nombreuses cellules cibles. Le rôle de l'IL-10 dans les capacités suppressives des Tr1 a été largement démontré. Ceci explique que dans un premier temps, des traitements à base d'IL-10 recombinante aient été essayés. Les résultats des essais de phase I/II ont montré une efficacité modérée,



### 3 Le parcours ITB (ImmunoTechnologies et Biothérapies)



Cet article et le précédent [31] sont le fruit d'un travail d'équipe de trois étudiants de 2<sup>e</sup> année de Master inscrits dans le parcours immunotechnologies et biothérapies qui ont souhaité vous transmettre leur goût pour l'immunologie appliquée. Ce projet de publication, mené dans le cadre d'une activité d'apprentissage par projet [1], a été encadré par Benoit Salomon (expert scientifique), François Vinour et Adrien Six (responsables de l'activité projet), Bertrand Bellier et Stéphanie Graff-Dubois (responsables du parcours).

Le parcours immunotechnologies et biothérapies est un parcours proposé dans la spécialité immunologie de la mention biologie moléculaire et cellulaire du master sciences et technologies de l'université Pierre et Marie Curie (PRES Sorbonne Universités) [2]. Ce parcours prépare aux métiers de la recherche appliquée en immunologie et de l'innovation clinique et technologique dans le domaine des sciences biomédicales. Il a la particularité de mêler des étudiants issus des domaines scientifique et médical, se destinant aux laboratoires de recherche et aux industries de santé. De nombreux travaux sont réalisés en groupe [3], préparant à la vie professionnelle future où la collaboration, la gestion de projet et la confrontation d'idées sont indispensables.

Pour en savoir plus :

<http://www.edu.upmc.fr/sdv/immuno/enseignements/NV591-ITB2011.php>

<http://www.master.bmc.upmc.fr/fr/>

<http://itunes.apple.com/itunes-u/immunotechnologies-et-biotherapies/id424482190>

obtenue au prix d'effets indésirables liés à une action immunostimulatrice de l'IL-10 à forte dose [18]. L'intérêt de la thérapie cellulaire s'est alors imposé comme une alternative intéressante.

De nombreuses méthodes d'induction de Tr1 ont été décrites. Cependant, nous ne savons pas si cette population est homogène puisqu'elle n'est caractérisée que par son profil cytokinique. Initialement, les Tr1 ont été induits *in vitro* à partir de LT CD4<sup>+</sup> naifs *via* des stimulations répétées du récepteur à l'antigène (TCR) en présence d'IL-10. La vitamine D3, la dexaméthasone, la stimulation du CD2 et certaines cellules dendritiques tolérogènes pourraient également favoriser la différenciation des Tr1 [19-21].

Contrairement aux nTreg, des Tr1 spécifiques d'un antigène et de grade clinique peuvent aussi être produits. Des Tr1 allogéniques induits *in vitro* ont ainsi été utilisés pour le traitement de la réaction du greffon contre l'hôte [22]. Des Tr1 autologues, dérivés du sang et cultivés en présence d'ovalbumine, sont actuellement en cours d'essai clinique dans la maladie de Crohn [23]. Le principe est que ces Tr1 spécifiques de l'ovalbumine sont réactivés localement *in vivo* après ingestion de cet antigène par les patients. Ils exercent ensuite leur fonction sup-

pressive de manière aspécifique *via* leur production d'IL-10. Un essai clinique utilisant des Tr1 spécifiques du collagène de type 2 produits selon le même principe a débuté cette année dans le traitement de la polyarthrite rhumatoïde.

#### Les limites de l'utilisation des Tr1 en thérapie cellulaire

Les Tr1 sont actuellement les seuls Treg induits utilisés en thérapie cellulaire. Bien que leur capacité suppressive ait été démontrée dans différents modèles, l'absence de marqueur spécifique de ces cellules explique que leur existence chez l'homme soit encore controversée. Une fois l'existence de ces Tr1 formellement établie *in vivo*, il faudra encore les comparer aux Tr1 induits *in vitro* pour définir leurs similitudes phénotypiques et fonctionnelles. De plus, on connaît très peu de choses de leur durée de vie et de leur stabilité *in vivo*, deux paramètres importants pour obtenir un effet clinique prolongé.

#### Limites et perspectives de la thérapie cellulaire par les Treg

Récemment, la notion de plasticité des Treg est apparue : certains Treg ne conservent pas constamment leur capacité suppressive [24]. Parmi les nTreg, une minorité de cellules peuvent perdre leur expression de Foxp3 et se différencier en Teff [25]. Une telle possibilité de conversion des Treg en Teff est dangereuse, surtout si les Treg injectés sont spécifiques d'un antigène du soi. Prévenir cette différenciation *in vivo* augmenterait la sécurité des produits de thérapie cellulaire. Chez la souris, la régulation de l'expression de Foxp3 par les nTreg est, entre autres, dépendante de modifications épigénétiques comme la déméthylation de l'ADN ou le remodelage de la chromatine par des histones déacétylases [26, 27]. Il faudra néanmoins déterminer si la plasticité des Treg *in vivo* chez l'homme est comparable à ce qu'elle est dans les modèles murins.

De même, le contrôle de la fonction suppressive *in vivo* des Treg enrichis *in vitro* n'a pas encore été évalué. On ne connaît pas encore tous les mécanismes de suppression des Treg humains *in vivo* et leur identification sur la base de marqueurs membranaires reste difficile. Il est donc nécessaire de valider pour chaque pathologie des modèles fonctionnels *in vivo* pour évaluer de manière fiable les capacités suppressives des Treg.

Le risque d'immunosuppression systémique lié à une activité excessive des Treg peut entraîner une augmentation de la fréquence des cancers (apparition de cellules cancéreuses ou rechutes cancéreuses) et entraver



les réponses anti-infectieuses. Néanmoins, la spécificité antigénique des Tr1 permet de limiter le risque d'immunosuppression systémique, ce qui n'est pas le cas des nTreg polyclonaux.

La plupart des essais de thérapie cellulaire utilisent des Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>fort</sup> ou des CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>. On pourrait envisager d'utiliser des sous-populations de ces Treg enrichies en cellules ayant des fonctions suppressives, une survie ou une migration meilleures. Il a par exemple été observé que parmi les nTreg, les cellules CD45RA<sup>+</sup> ont des capacités accrues d'expansion et de survie en culture. Les thérapies géniques offrent également des possibilités intéressantes. La spécification de Treg via leur expression d'une molécule de CMH (complexe majeur d'histocompatibilité) chimérique reconnaissant un auto-antigène d'intérêt, permet d'augmenter l'effet thérapeutique des Treg dans un modèle de sclérose en plaques [28]. Des nTreg polyclonaux rendus spécifiques d'un antigène par transfert de LT portant un récepteur à cet antigène (issus de souris transgéniques) ont été décrits par l'équipe de Bluestone dans le diabète de type 1 chez la souris, et ils pourraient constituer une nouvelle stratégie de thérapie cellulaire. Augmenter la fonction suppressive des LT pourrait aussi être envisagé en forçant l'expression du gène *Foxp3* sous le contrôle d'un promoteur spécifique de ces cellules. De même, en cas de mutation du gène *Foxp3*, comme dans le syndrome IPEX<sup>2</sup> [31], le recours aux nucléases en doigt de zinc permettrait de réparer les mutations [29]. L'introduction d'un gène suicide peut également être envisagée pour éliminer les Treg en cas d'immunosuppression systémique trop intense. Il pourrait aussi être proposé de transduire certains récepteurs aux chimiokines pour orienter la migration des Treg sur le site d'intérêt. La thérapie génique offre certainement des perspectives d'avenir, mais comporte néanmoins ses propres risques et alourdirait encore le protocole de thérapie cellulaire.

Une question qui n'est pas encore résolue concerne la dose thérapeutique de Treg qui devrait être utilisée. Celle-ci n'est pas standardisée, et dépend certainement des pathologies ciblées, des types de Treg utilisés et de la variabilité individuelle entre patients. Généralement, des doses supérieures à 10<sup>6</sup> Treg sont nécessaires [30]. Or, la faible fréquence des Treg parmi les cellules mononucléées sanguines requiert des phases d'amplification très coûteuses et reste un frein au développement des techniques de thérapie cellulaire.

Enfin, dans certaines maladies auto-immunes, une résistance des Teff à l'action suppressive des Treg a été démontrée. Le recours précoce à la thérapie cellulaire pourrait minimiser cet effet. Cependant, les maladies auto-immunes sont souvent diagnostiquées tardivement et, à ce jour, il n'existe pas de tests prédictifs de la survenue de telles maladies.

## Conclusion

La thérapie cellulaire par Treg semble être une approche personnalisée et attractive. À ce jour, de nombreux travaux en ont confirmé

la logique, la faisabilité et la sécurité. Déjà quelques essais cliniques ont débuté dans les maladies auto-immunes. Toutefois, l'utilisation de Treg en immunothérapie est encore limitée par la difficulté d'obtention de cellules spécifiques d'un antigène, et d'un nombre suffisant de Treg stables pour assurer une efficacité clinique. Les résultats des essais cliniques en cours et la poursuite des recherches sur la stabilité et les spécificités fonctionnelles propres à chaque population de Treg devraient apporter des informations précieuses dans les prochaines années. Le transfert de tolérance à des patients présentant des maladies auto-immunes est encore un défi fort coûteux, mais dont le concept est très innovant. L'association à des stratégies de thérapie génique pourrait aider à son optimisation. ♦

## SUMMARY

### Use of regulatory T cells in cellular therapies in autoimmune diseases

Self tolerance is dependent on regulatory T cells (Treg) which suppress effector T cells, avoiding autoimmunity. Functional and quantitative deficits of Treg have been reported in autoimmune diseases. A new therapeutic approach consisting in Treg adoptive transfer has proved to be efficient and safe in murine models. Two populations seem to be available for a clinical application: CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> natural Treg derived from the thymus and induced regulatory T cells. First clinical trials have been applied to patients with autoimmune diseases. Classical treatments of autoimmune diseases are usually non-curative and require long-term administration. Treg cellular therapy may have a long-term effect and offers an alternative attractive approach. ♦

## LIENS D'INTÉRÊT

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

## REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient Benoit Salomon pour ses conseils avisés lors de la rédaction de ce manuscrit, ainsi que le soutien et l'aide de Leslie Gosse, Jeffrey Bluestone et Arnaud Foussat ainsi que de la promotion ITB 2010-2011 et de son équipe enseignante.

## RÉFÉRENCES

1. Salomon B. Les lymphocytes T régulateurs CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> : vers une immunomodulation thérapeutique ? *Med Sci (Paris)* 2002 ; 18 : 1066-8.
2. Joffre O, Santolaria T, van Meerwijk JP. Utilisation des lymphocytes T régulateurs en transplantation : supprimer l'immunosuppression. *Med Sci (Paris)* 2008 ; 24 : 689-91.
3. Roncarolo MG, Battaglia M. Regulatory T-cell immunotherapy for tolerance to self antigens and alloantigens in humans. *Nat Rev Immunol* 2007 ; 7 : 585-98.
4. Tang Q, Bluestone JA. Regulatory T-cell physiology and application to treat autoimmunity. *Immunol Rev* 2006 ; 212 : 217-37.

<sup>2</sup> Syndrome lié à l'X associant une dérégulation immunitaire, une polyendocrinopathie et une entéropathie ; l'IPEX est habituellement fatal.

## RÉFÉRENCES

5. Tarbell KV, Petit L, Zuo X, et al. Dendritic cell-expanded, islet-specific CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> CD62L<sup>+</sup> regulatory T cells restore normoglycemia in diabetic NOD mice. *J Exp Med* 2007 ; 204 : 191-201.
6. Miyara M, Amoura Z, Parizot C, et al. Global natural regulatory T cell depletion in active systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 2005 ; 175 : 8392-400.
7. Scalapino KJ, Tang Q, Bluestone JA, et al. Suppression of disease in New Zealand Black/New Zealand White lupus-prone mice by adoptive transfer of ex vivo expanded regulatory T cells. *J Immunol* 2006 ; 177 : 1451-9.
8. Uhlig HH, Coombes J, Mottet C, et al. Characterization of Foxp3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> and IL-10-secreting CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells during cure of colitis. *J Immunol* 2006 ; 177 : 5852-60.
9. Morgan ME, Flierman R, van Duivenvoorde LM, et al. Effective treatment of collagen-induced arthritis by adoptive transfer of CD25<sup>+</sup> regulatory T cells. *Arthritis Rheum* 2005 ; 52 : 2212-21.
10. Zhang X, Koldzic DN, Izikson L, et al. IL-10 is involved in the suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> regulatory T cells. *Int Immunol* 2004 ; 16 : 249-56.
11. Masteller EL, Warner MR, Tang Q, et al. Expansion of functional endogenous antigen-specific CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells from nonobese diabetic mice. *J Immunol* 2005 ; 175 : 3053-9.
12. Godfrey WR, Ge YG, Spoden DJ, et al. In vitro-expanded human CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-regulatory cells can markedly inhibit allogeneic dendritic cell-stimulated MLR cultures. *Blood* 2004 ; 104 : 453-61.
13. Levings MK, Sangregorio R, Sartirana C, et al. Human CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T suppressor cell clones produce transforming growth factor beta, but not interleukin 10, and are distinct from type 1 T regulatory cells. *J Exp Med* 2002 ; 196 : 1335-46.
14. Tang Q, Henriksen KJ, Bi M, et al. In vitro-expanded antigen-specific regulatory T cells suppress autoimmune diabetes. *J Exp Med* 2004 ; 199 : 1455-65.
15. Fisson S, Djelti F, Trenado A, et al. Therapeutic potential of self-antigen-specific CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T cells selected in vitro from a polyclonal repertoire. *Eur J Immunol* 2006 ; 36 : 817-27.
16. Jiang S, Camara N, Lombardi G, Lechler RI. Induction of allopeptide-specific human CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells ex vivo. *Blood* 2003 ; 102 : 2180-6.
17. Battaglia M, Stabilini A, Migliavacca B, et al. Rapamycin promotes expansion of functional CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> regulatory T cells of both healthy subjects and type 1 diabetic patients. *J Immunol* 2006 ; 177 : 8338-47.
18. Tilg H, van Montfrans C, van den Ende A, et al. Treatment of Crohn's disease with recombinant human interleukin 10 induces the proinflammatory cytokine interferon gamma. *Gut* 2002 ; 50 : 191-5.
19. Barrat FJ, Cua DJ, Boonstra A, et al. In vitro generation of interleukin 10-producing regulatory CD4<sup>+</sup> T cells is induced by immunosuppressive drugs and inhibited by T helper type 1 (Th1)- and Th2-inducing cytokines. *J Exp Med* 2002 ; 195 : 603-16.
20. Groux H, O'Garra A, Bigler M, et al. A CD4<sup>+</sup> T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* 1997 ; 389 : 737-42.
21. Wakkach A, Fournier N, Brun V, et al. Characterization of dendritic cells that induce tolerance and T regulatory 1 cell differentiation in vivo. *Immunity* 2003 ; 18 : 605-17.
22. Bacchetta R, Gregori S, Serafini G, et al. Molecular and functional characterization of allogeneic-specific anergic T cells suitable for cell therapy. *Haematologica* 2010 ; 95 : 2134-43.
23. Brun V, Bastian H, Neveu V, Foussat A. Clinical grade production of IL-10 producing regulatory Tr1 lymphocytes for cell therapy of chronic inflammatory diseases. *Int Immunopharmacol* 2009 ; 9 : 609-13.
24. Zhou L, Chong MM, Littman DR. Plasticity of CD4<sup>+</sup> T cell lineage differentiation. *Immunity* 2009 ; 30 : 646-55.
25. Komatsu N, Mariotti-Ferrandiz ME, Wang Y, et al. Heterogeneity of natural Foxp3<sup>+</sup> T cells: a committed regulatory T-cell lineage and an uncommitted minor population retaining plasticity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009 ; 106 : 1903-8.
26. Kim HP, Leonard WJ. CREB/ATF-dependent T cell receptor-induced FoxP3 gene expression: a role for DNA methylation. *J Exp Med* 2007 ; 204 : 1543-51.
27. Tao R, de Zoeten EF, Ozkaynak E, et al. Deacetylase inhibition promotes the generation and function of regulatory T cells. *Nat Med* 2007 ; 13 : 1299-307.
28. Mekala DJ, Geiger TL. Immunotherapy of autoimmune encephalomyelitis with redirected CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T lymphocytes. *Blood* 2005 ; 105 : 2090-2.
29. Urnov FD, Miller JC, Lee YL, et al. Highly efficient endogenous human gene correction using designed zinc-finger nucleases. *Nature* 2005 ; 435 : 646-51.
30. Salomon B, Lenschow DJ, Rhee L, et al. B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes. *Immunity* 2000 ; 12 : 431-40.
31. Siri A, de Boysson H, Boursier G. Actualité sur les lymphocytes T régulateurs CD4<sup>+</sup>. *Med Sci (Paris)* 2012 ; 646-51.
32. Mirabel M, Ferreira B, Sidi D, et al. Rhumatisme articulaire aigu : perspectives. *Med Sci (Paris)* 2012 ; 28 : 633-8.

## TIRÉS À PART

G. Boursier



# Leucodystrophie consécutive à une hypomyélinisation : pas seulement une pathologie de l'enfant !

*Hypomyelination and leucodystrophy: not only a childhood medical problem*

A. Siri<sup>1</sup>, N. Menjot de Champfleury<sup>2</sup>, R. Froissard<sup>3</sup>, C. Carra-Dallière<sup>1</sup>, X. Ayrygnac<sup>1</sup>, A. Corlobé<sup>1</sup>, B. Echenne<sup>4</sup>, P. Labauge<sup>1</sup>

## Observation

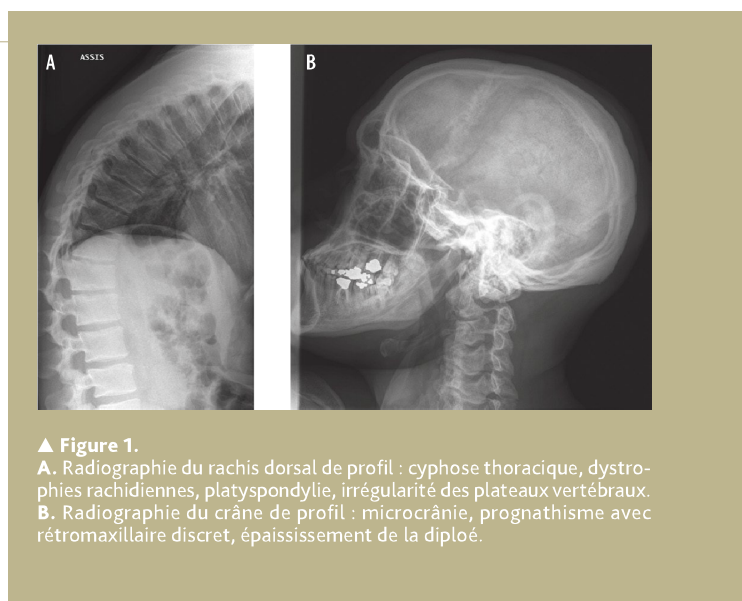
Un patient âgé de 34 ans est pris en charge dans le service de neurologie pour un syndrome cérébelleux et des troubles du comportement chroniques.

Alors que la grossesse de sa mère était normale, il a présenté un retard psychomoteur – ne commençant à marcher que vers 20 mois et chutant fréquemment –, puis une ataxie cérébelleuse vers l'âge de 3 ans. Il a été scolarisé dans un établissement spécialisé.

À l'âge adulte, il présente des hallucinations visuelles et auditives, des tics moteurs, des troubles compulsifs, notamment une potomanie. Il n'a pas d'antécédent familial notable, notamment pas de consanguinité. La famille est originaire du sud de la France.

L'examen neurologique objective une déficience mentale sévère, une ataxie cérébelleuse statique, un syndrome pyramidal et des rétractions tendineuses. On note également un syndrome autistique avec évitement du regard, des tics moteurs et une posture dystonique au niveau des mains. L'examen général retrouve une cyphose thoracique et un prognathisme.

Les radiographies osseuses mettent en évidence des anomalies rachidiennes (cyphose thoracique, dystrophies rachidiennes avec platyspondylie et irrégularité des plateaux vertébraux) et



▲ **Figure 1.**

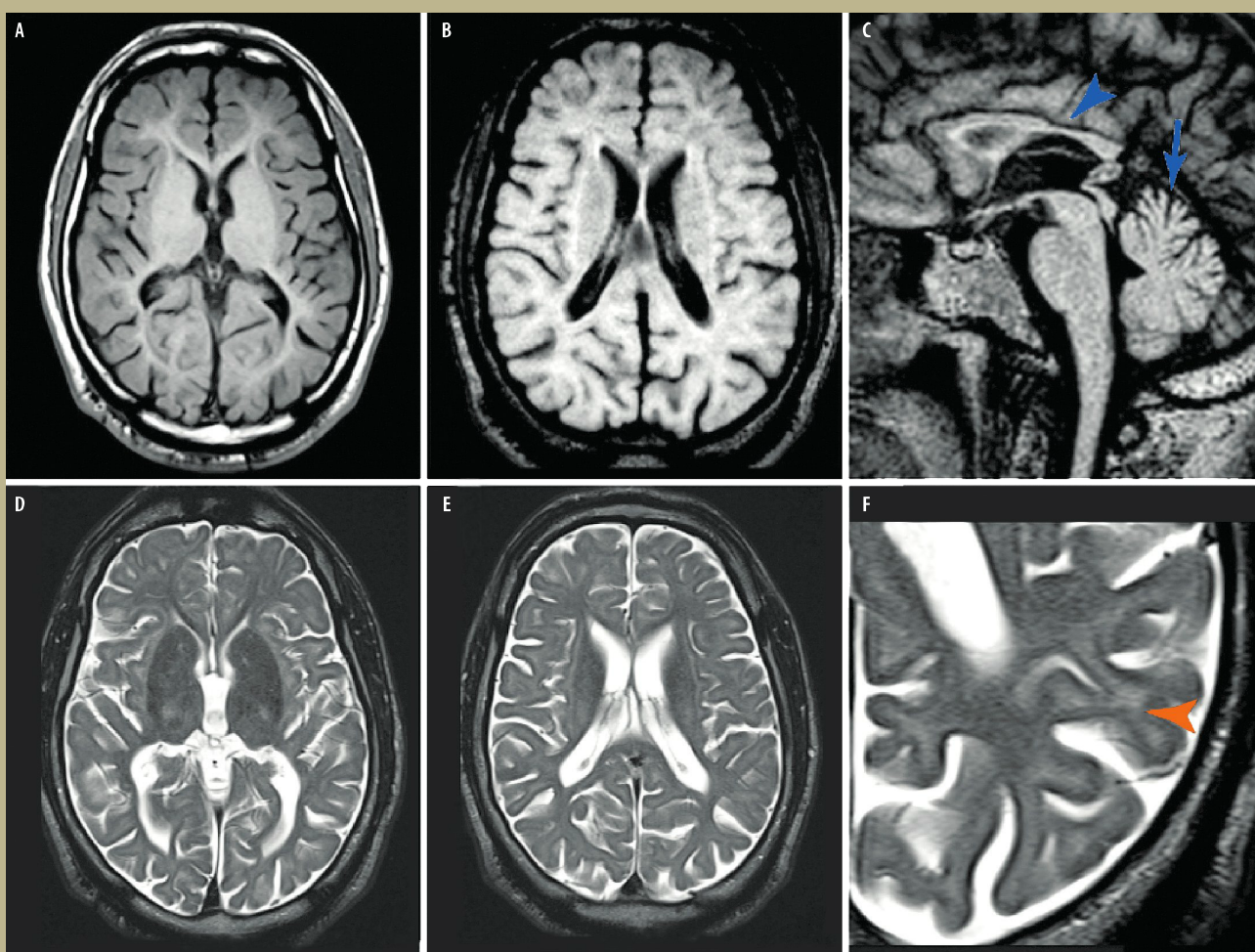
A. Radiographie du rachis dorsal de profil : cyphose thoracique, dystrophies rachidiennes, platyspondylie, irrégularité des plateaux vertébraux. B. Radiographie du crâne de profil : microcrairie, prognathisme avec rétromaxillaire discret, épaississement de la diploé.

crâniennes (microcrairie, prognathisme avec rétromaxillaire discret, épaississement du diploé) [figure 1].

L'IRM cérébrale (figure 2) révèle une atrophie cortico-sous-corticale, cérébelleuse et du corps calleux. La substance blanche sus-tentorielle est raréfiée avec un aspect d'hypomyélinisation sous-corticale particulièrement visible sur les séquences en T2 en écho de spin (ES). Un hypersignal marqué de la substance blanche est retrouvé sur les séquences FLAIR.

Le bilan enzymatique révèle une augmentation de l'acide sialique libre urinaire, également retrouvée sur une biopsie cutanée.

<sup>1</sup>Département de neurologie, CHU de Montpellier. <sup>2</sup>Service de neuroradiologie, CHU de Montpellier. <sup>3</sup>Laboratoire de génétique, CHU de Lyon. <sup>4</sup>Service de neuro-pédiatrie, CHU de Montpellier.



▲ **Figure 2.** Une IRM cérébrale identifie un élargissement sulcal diffus ainsi qu'un élargissement du système ventriculaire (A : séquence T1 ; B : séquence FLAIR) en rapport avec une atrophie cortico-sous-corticale diffuse, intéressant les étages sus- et sous-tentoriels (C : acquisition sagittale FLAIR, atrophie du corps calleux [tête de flèche bleue] et atrophie cérébelleuse avec trop bonne visibilité des folia [flèche bleue]). L'ensemble de la substance blanche apparaît hyperintense sur les séquences FLAIR (C) et T2 ES (D et E), en rapport avec une hypomyélinisation touchant les fibres arquées ("en U") [F : séquence axiale T2 ES, tête de flèche orange].

## CAS CLINIQUE

La mise en évidence d'une mutation hétérozygote composite faux-sens – p.R57C (exon 2)/p.S202L (exon 4) – sur le gène de la sialine SLC17A5, permet d'affirmer le diagnostic de maladie de Salla.

### Discussion

Les maladies de surcharge en acide sialique libre sont des maladies de surcharge lysosomale, autosomiques récessives, dues au défaut d'un transporteur de la membrane lysosomale (la sialine) qui assure l'excrétion de l'acide sialique (ou acide N-acétylneuraminique) du lysosome. Le spectre clinique est étendu. Il existe des formes sévères néonatales (*Infantile Sialic acid Storage Disease* [ISSD]) avec un tableau d'anasarque fœto-placentaire in utero, ou congénitales avec une hypotonie, une hépatosplénomégalie souvent associée à une ascite, un syndrome dysmorphique (traits un peu grossiers, anomalies osseuses), un retard mental et des convulsions.

Dans les formes congénitales, le décès survient généralement avant l'âge de 5 ans (1). La forme modérée de la maladie, ou maladie de Salla (OMIM 604369), débute dans la première année de vie et est caractérisée par une hypotonie suivie d'une spasticité, d'une ataxie, d'un retard psychomoteur et parfois de traits épais. Ces patients atteignent rarement l'âge de 30 ans. Une survie prolongée jusqu'à la sixième décennie est toutefois

possible. Une atteinte du système nerveux périphérique est mise en évidence dans la moitié des cas (2).

### Conclusion

Cette pathologie de transmission autosomique récessive est rare et a été essentiellement décrite en Finlande, où la prévalence du gène est estimée à 1 personne sur 40 de la population générale. Le diagnostic biologique repose sur une excrétion urinaire accrue d'acide sialique libre et une accumulation d'acide sialique libre dans les fibroblastes. Le dosage de l'acide sialique peut être cependant normal, le diagnostic pouvant alors être réalisé sur l'augmentation de l'acide sialique en spectroscopie de masse dans le liquide céphalorachidien (3). Le diagnostic est confirmé par la mise en évidence d'une mutation homozygote ou hétérozygote composite sur le gène de la sialine (SLC17A5), localisé en 6q14-15.

Aucun traitement spécifique n'existe actuellement dans cette maladie. La prise en charge est essentiellement symptomatique. ■

### Références bibliographiques

1. Lemyre E, Russo P, Melançon SB et al. Clinical spectrum of infantile free sialic acid storage disease. *Am J Med Genet* 1999;82(5):385-91.
2. Varho T, Jääskeläinen S, Tolonen U et al. Central and peripheral nervous system dysfunction in the clinical variation of Salla disease. *Neurology* 2000;55(1):99-104.
3. Mochel F, Engelke UF, Barritault J et al. Elevated CSF N-acetylaspartylglutamate in patients with free sialic acid storage diseases. *Neurology* 2010;74(4):302-5.

**la lettre**  
DU NEUROLOGUE®

**E-journal en direct**  
du **65<sup>th</sup> AAN 2013**  
American Academy of Neurology

**SAN DIEGO CALIFORNIE**  
**16-23 MARS 2013**

RETROUVEZ-NOUS À PARTIR DU **18 MARS** SUR :  
**www.edimark.fr/ejournaux/AAN/2013**  
Site réservé aux professionnels de santé

**LUNDI 18 MARS** | **MARDI 19 MARS** | **MERCREDI 20 MARS** | **JEUDI 21 MARS**

Attention : les comptes-rendus de congrès ont pour objectif de fournir des informations sur l'état actuel de la recherche ; ainsi, les données présentées seront susceptibles de ne pas être validées par les autorités françaises et ne doivent donc pas être mises en pratique. Ces informations sont sous la seule responsabilité des auteurs et du directeur de la publication qui sont garants de l'objectivité de cette publication. Sous l'égide de *La Lettre du Neurologue* - Directeur de la publication : Claudie Damour-Terrasson - Rédacteur en chef : Pr Thibault Moreau

Avec le soutien institutionnel de **TEVA** Laboratoires

ENVI-2013-02-092

VU

**NANCY, le 3 juin 2013**

Le Président de Thèse

**Professeur H. VESPIGNANI**

**NANCY, le 6 juin 2013**

Le Doyen de la Faculté de Médecine

**Professeur H. COUDANE**

AUTORISE À SOUTENIR ET À IMPRIMER LA THÈSE/6481

**NANCY, le 11 juin 2013**

LE PRÉSIDENT DE L'UNIVERSITÉ DE LORRAINE,

**Professeur P. MUTZENHARDT**



## **TITRE EN ANGLAIS**

Prognostic value of IgM in CSF of carriers of multiple sclerosis patients (MS)

### **SUMMARY**

The prognostic value of IgM in CSF of MS patients has been described for approximately 10 years. Early works focused on IgM oligoclonal bands (MOB) and emanate mainly from the Villar team or their collaborators. Other teams worked on the IgM index and presented contradictory results.

The stakes of this research could be important in therapeutic terms. Indeed, recent works suggest that after a given stage, MS evolve by itself, and current treatments do not seem to influence the evolutionary course of the disease before this point (EDSS 3). Changing the current therapeutic management could then be justified but a prognosis marker in the long term is essential to assess the risk-benefit balance.

The retrospective work undertaken as part of a CPRC within the CHU of Nancy aims at highlighting or not a link between MOB / IgM index and long term prognosis thanks to the Lorraine MS register (ReLSEP) and biological samples (serum and CSF) collected at diagnosis. Two groups of patients were formed according to their evolving clinical profiles (favourable (FAV), adverse (DEF)) to find a significant difference between the IgM indexes. In the mean time, work has been conducted on the development of the isoelectric focusing technique.

Preliminary results based on a small population, cannot be concluded with certainty, due to a lack of statistical power. However, a trend seems to appear on the IgM index between these two groups with index higher in the DEF group. On isoelectric focusing technique, further work remains to be done. Thereafter, the inclusion of a larger number of patients is expected to enable the validation of the technique.



---

## **RESUME DE THESE**

La valeur pronostique des IgM dans le LCR chez les patients SEP est décrite depuis 10 ans environ. Les premiers travaux ont porté sur la présence de bandes oligoclonales (BOM) et émanent en majorité de l'équipe de Villar ou de travaux collaboratifs. D'autres équipes ont travaillé sur les index IgM avec des résultats assez contradictoires.

Les enjeux de cette recherche pourraient être importants sur le plan thérapeutique. En effet, des travaux récents suggèrent qu'à un certain stade, la SEP évoluerait pour son propre compte, les traitements actuels ne semblant influencer le cours évolutif de la pathologie qu'avant ce stade (EDSS 3). La révision du schéma thérapeutique actuel pourrait alors être justifiée mais un marqueur pronostique à long terme est essentiel afin d'évaluer la balance bénéfice risque.

Le travail rétrospectif entrepris dans le cadre d'un CPRC au sein du CHU de Nancy a pour but de rechercher un lien entre BOM/index IgM et le pronostic au long cours grâce aux données du registre lorrain de la SEP (ReLSEP) et aux échantillons biologiques (LCR et sérum) conservés au moment du diagnostic. Dans un premier temps, deux groupes de patients ont été constitués en fonction de leurs profils évolutifs cliniques (évolution favorable (FAV), évolution défavorable (DEF)) afin de rechercher une différence significative entre les index d'IgM. En parallèle, un travail a été conduit sur la mise au point de la technique d'isofocalisation.

Les premiers résultats basés sur une population de petite taille ne permettent pas de conclure avec certitude par manque de puissance. Cependant une tendance semble se dégager concernant les index IgM avec des index plus élevés dans le groupe DEF. Concernant la technique d'isofocalisation, un travail complémentaire reste à entreprendre. Par la suite, l'inclusion d'un plus grand nombre de patients est prévue, afin de permettre la validation de la technique.

---

**TITRE EN ANGLAIS:** Prognostic value of IgM in CSF of carriers of multiple sclerosis patients (MS)

---

**THÈSE :** MÉDECINE SPÉCIALISÉE, NEUROLOGIE – ANNÉE 2013

---

**MOTS CLEFS :** Sclérose en plaques, bandes oligoclonales IgM, index IgM, marqueur pronostique

---

**INTITULÉ ET ADRESSE DE L'UFR :**

UNIVERSITÉ DE LORRAINE-Faculté de Médecine de Nancy

9, avenue de la Forêt de Haye

54505 VANDOEUVRE LES NANCY Cedex