

Université de Montréal

Impact de la restriction diététique en méthionine sur l'activation des lymphocytes T et leur capacité à envahir le SNC en neuroinflammation

Par Victoria Hannah Mamane

Département de neurosciences, Faculté de médecine

Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de
Maîtrise ès sciences (MSc) en neurosciences

Août 2020

© Victoria H Mamane, 2020

Université de Montréal

Département de neurosciences, Faculté de médecine

Ce mémoire intitulé

Impact de la restriction diététique en méthionine sur l'activation des lymphocytes T et leur capacité à envahir le SNC en neuroinflammation

Présenté par

Victoria Hannah Mamane

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes

Dr. Diana Matheoud

Présidente-rapporteur

Dr. Catherine Larochelle

Directrice de recherche

Dr. Thierry Alquier

Membre du jury

Résumé

Introduction: La sclérose en plaques (SEP) est une maladie inflammatoire et démyélinisante du système nerveux central (SNC). Les lymphocytes T pro-inflammatoires CD4 TH1/TH17 sont considérés pathogéniques en SEP et dans son modèle animal, l'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE). La restriction alimentaire en méthionine (MR) est associée à un effet anti-inflammatoire en périphérie. Cependant, l'impact de la disponibilité de la méthionine sur la fonction des lymphocytes T et sur la neuroinflammation centrale médiée par les lymphocytes T dans la SEP et l'EAE n'est pas connu. Il a été récemment découvert que le métabolisme de la méthionine est induit dans les lymphocytes T murins activés in vitro et que la restriction en méthionine affecte les fonctions effectrices et la prolifération des lymphocytes TH17. Nous formulons donc l'hypothèse que la manipulation du métabolisme des lymphocytes T via la restriction diététique en méthionine représente une nouvelle voie thérapeutique pour contrôler les maladies neuroinflammatoires telles que la SEP.

Méthode: Des femelles C57BL/6 sont exposées à une diète contrôle ou réduite en méthionine puis immunisées au MOG₃₅₋₅₅ pour induire une EAE active. Un suivi clinique et des expériences de cytométrie en flux permettent de caractériser le profil et l'activation immunitaire. Le prélèvement d'échantillons fécaux et le séquençage de l'ARNr 16S permettent d'évaluer l'influence de la diète sur la composition du microbiome intestinal.

Résultats: La MR est associée à un délai significatif de l'apparition des déficits neurologiques chez les femelles C57BL/6 immunisées au MOG. Ceci est associé à une réduction du nombre de cellules immunitaires et de lymphocytes T pro-inflammatoires dans la rate au 7^e jour post-induction (présymptomatique) et dans le SNC aux jours 10-13 (début) et 15-16 (pic). Nos résultats préliminaires suggèrent que le microbiome intestinal des souris sous la MR est différent de celui des souris sous la MC et est enrichi de bactéries ayant des effets bénéfiques en inflammation.

Conclusion: Nos résultats suggèrent un impact bénéfique de la MR sur l'évolution clinique et les processus neuroinflammatoires dans un modèle animal de SEP.

Mots-clés: sclérose en plaques, encéphalomyélite auto-immune expérimentale, restriction alimentaire en méthionine, métabolisme de la méthionine, microbiome intestinal

Abstract

Introduction: Multiple Sclerosis (MS) is an inflammatory and demyelinating disease of the central nervous system (CNS). Pro-inflammatory CD4 TH1/TH17 are considered pathogenic in MS and its animal model, experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). Dietary methionine restriction (MR) is associated with an anti-inflammatory impact in the periphery. However, little is known about how methionine availability can affect the function of T lymphocytes and impact T-lymphocytes mediated central neuroinflammation in MS and EAE. It was recently discovered that methionine pathway is upregulated in activated murine T lymphocytes in vitro and that methionine restriction affects the effector functions and proliferation of TH17 lymphocytes. We therefore hypothesize that the manipulation of T lymphocyte metabolism via the restriction of dietary methionine intake represents a new therapeutic avenue for controlling neuroinflammatory diseases such as MS.

Method: Active MOG₃₅₋₅₅-EAE is induced in C57BL/6 female mice exposed to low methionine vs. control diet. Clinical evaluation and flow cytometry studies are used to characterize immune cells phenotype and activation. Fecal samples are collected and 16S rRNA sequencing is used to assess the influence of the diet on the composition of the intestinal microbiome.

Results: Dietary MR is associated with a significantly delayed onset of neurological deficits in active EAE (female mice). This is paralleled by a lower number of immune cells and pro-inflammatory T lymphocytes in the spleens at day 7 post-induction (presymptomatic) and in the CNS at day 10-13 (onset) and 15-16 (peak). Our preliminary results suggest that the intestinal microbiome of mice under dietary MR is different from that of mice under control diet and is enriched for bacteria with beneficial effects on inflammation.

Conclusion: Our results suggest a beneficial impact of MR on clinical course and neuroinflammation in an animal model of MS.

Keywords: multiple sclerosis, experimental autoimmune encephalomyelitis, dietary methionine restriction, methionine metabolism, intestinal microbiome

Table des matières

Résumé	i
Abstract.....	ii
Table des matières.....	iii
Liste des tableaux	viii
Liste des figures	ix
Liste des sigles et abréviations.....	xii
Remerciements.....	xvi
Introduction	1
1. La sclérose en plaques	1
1.1 Définition clinique.....	1
1.2 Pathologie	3
1.2.1 Barrière hémato-encéphalique	3
1.2.2 Plaque de démyélinisation	5
1.3 Facteurs de risque.....	7
1.3.1 Génétique	7
1.3.2 Facteurs environnementaux	8
1.3.2.1 Latitude et vitamine D.....	8
1.3.2.2 Agents infectieux.....	9
1.3.2.3 Tabagisme	10
1.3.2.4 Obésité	11
1.3.2.5 Nutrition et microbiome intestinal	11
1.4 Traitements.....	13

1.5	Modèles animaux de la SEP	15
2.	Implication des lymphocytes en sclérose en plaques	18
2.1	Activation des lymphocytes	18
2.1.1	Présentation d'antigène.....	19
2.1.2	Changements métaboliques	20
2.2	Les sous-populations de lymphocytes T CD4	22
2.2.1	TH1	22
2.2.2	TH17	23
2.2.3	TH2	23
2.2.4	Treg	24
2.3	Les lymphocytes T CD8	24
2.4	Les lymphocytes B.....	25
3.	La restriction diététique en méthionine	27
3.1	La méthionine	27
3.2	Restreindre la méthionine dans l'organisme	29
	Hypothèse et objectifs	31
	Matériel et méthodes	33
1.	Diètes expérimentales	33
2.	Animaux	35
3.	EAE active et suivi clinique.....	35
4.	EAE passive	36
5.	Isolation des cellules immunitaires murines.....	37
4.1.	Rate	37
4.2.	Ganglions lymphatiques.....	38

4.3. Système nerveux central.....	38
6. Marquages pour cytométrie en flux	38
5.1. Marquage extracellulaire	39
5.2. Marquage intracellulaire.....	39
7. Séquençage et analyse de l'ARN ribosomal 16S	40
8. Analyses statistiques.....	41
Résultats	42
1. La restriction alimentaire en méthionine influence l'apparition et l'évolution des symptômes d'EAE active.....	42
2. La restriction alimentaire en méthionine influence le profil immunitaire en périphérie et l'infiltration centrale de cellules immunitaires.....	45
2.1. Impact de la restriction alimentaire en méthionine sur le profil immunitaire en périphérie (rate et ganglions lymphatiques)	45
2.2. Impact de la restriction alimentaire en méthionine sur l'infiltration de cellules immunitaires dans le SNC	52
3. La restriction alimentaire en méthionine influence le profil des lymphocytes périphériques et infiltrant le SNC.....	57
3.1. Impact de la restriction alimentaire en méthionine sur le profil des lymphocytes T périphériques (rate et ganglions lymphatiques).....	58
3.2. Impact de la restriction alimentaire en méthionine sur le profil des lymphocytes T infiltrant le SNC.....	67
4. L'inhibition de la conversion de la méthionine en SAM dans les lymphocytes T CD4 influence l'apparition des symptômes d'EAE passive et l'infiltration centrale de cellules immunitaires.....	73
5. La restriction alimentaire en méthionine influence la composition du microbiome intestinal	78

Discussion 83

Conclusion..... 91

Références bibliographiques 93

Liste des tableaux

Tableau 1. –	Composition détaillée des diètes contrôle et réduite en méthionine	34
Tableau 2. –	Échelle de score clinique d'EAE.....	36
Tableau 3. –	Anticorps pour marquage extracellulaire	40

Liste des figures

Figure 1. –	Évolution clinique de la sclérose en plaques.....	2
Figure 2. –	Anatomie de la barrière hémato-encéphalique.....	4
Figure 3. –	Plaque de démyélinisation dans la matière blanche du SNC.....	6
Figure 4. –	Profils métaboliques des sous-types de lymphocytes T.....	22
Figure 5. –	Populations de cellules immunitaires impliquées en SEP et EAE.....	26
Figure 6. –	Métabolisme de la méthionine et processus métaboliques reliés.....	28
Figure 7. –	Niveaux de méthionine, SAM et SAH en fonction de la prise alimentaire en méthionine	42
Figure 8. –	Méthodologie expérimentale pour l'EAE active.....	43
Figure 9. –	Comparaison clinique de l'EAE active entre les groupes MC et MR.....	44
Figure 10. –	Stratégie de <i>gating</i> dans la rate et les GL en cytométrie en flux.....	47
Figure 11. –	Nombres absolus des populations leucocytaires présentes dans la rate en EAE active	48
Figure 12. –	Proportions des cellules immunitaires présentes dans la rate en EAE active.....	49
Figure 13. –	Nombres absolus des populations leucocytaires présentes dans les GL en EAE active	50
Figure 14. –	Proportions des cellules immunitaires présentes dans les GL en EAE active.....	51
Figure 15. –	Stratégie de <i>gating</i> dans le SNC en cytométrie en flux.....	53
Figure 16. –	<i>Heatmap</i> à partir des nombres absolus des populations de cellules immunitaires infiltrant le SNC en EAE active.....	54
Figure 17. –	Nombres absolus des populations leucocytaires infiltrant le SNC en EAE active	55
Figure 18. –	Proportions des cellules immunitaires infiltrant le SNC en EAE active.....	56
Figure 19. –	Stratégie de <i>gating</i> sur les lymphocytes T CD4 en cytométrie en flux.....	59
Figure 20. –	Stratégie de <i>gating</i> sur les lymphocytes T CD8 en cytométrie en flux.....	60
Figure 21. –	Nombres absolus de lymphocytes T exprimant des marqueurs de surface dans la rate en EAE active.....	61

Figure 22. – Proportions de lymphocytes T exprimant des marqueurs de surface dans la rate en EAE active	62
Figure 23. – Nombres absolus de lymphocytes T exprimant des marqueurs de surface dans les GL en EAE active	63
Figure 24. – Stratégie de <i>gating</i> sur les lymphocytes en cytométrie en flux.....	64
Figure 25. – Nombres absolus de lymphocytes exprimant des cytokines dans la rate en EAE active	65
Figure 26. – Nombres absolus de lymphocytes exprimant des cytokines dans les GL en EAE active	66
Figure 27. – <i>Heatmap</i> à partir des nombres absolus de lymphocytes T exprimant des marqueurs de surface et infiltrant le SNC en EAE active	68
Figure 28. – Nombres absolus des lymphocytes T exprimant des marqueurs de surface dans le SNC en EAE active	69
Figure 29. – Proportions de lymphocytes T exprimant des marqueurs de surface dans le SNC en EAE active	70
Figure 30. – Nombres absolus de lymphocytes exprimant des cytokines dans le SNC en EAE active	71
Figure 31. – Inhibition de la conversion de la méthionine en SAM in vitro	74
Figure 32. – Méthodologie expérimentale pour l'EAE passive	75
Figure 33. – Impact de l'inhibition de Mat2a dans les lymphocytes T CD4	77
Figure 34. – Distance de Bray-Curtis et diversité bêta dans le microbiome des femelles C57BL/6	79
Figure 35. – Analyse différentielle d'abondance dans le microbiome des femelles C57BL/6 ..	81

Liste des sigles et abréviations

ADN: acide désoxyribonucléique

ALCAM: *activated leucocyte cell adhesion molecule*

AMPK: *AMP-activated protein kinase*

ARN: acide ribonucléique

BHE: barrière hémato-encéphalique

CCL: *C-C motif chemokine ligand*

CCR: *C-C motif chemokine receptor*

CD: *cluster of differentiation*

CFA: *complete Freund adjuvant*

CMH: complexe majeur d'histocompatibilité

CPA: cellule présentatrice d'antigène

CXCR: *C-X-C motif chemokine receptor*

CXCL: *C-X-C motif chemokine ligand*

DASH: *Dietary Approaches to Stopping Hypertension*

EAE: encéphalomyélite auto-immune expérimentale

EBNA1: *Epstein-Barr virus-determined nuclear antigen 1*

EBV: virus Epstein-Barr

FBS: *fetal bovine serum*

FGF21: *fibroblast growth factor 21*

FOXP3: *Forkheadbox P3*

GL: ganglions lymphatiques

GM-CSF: *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*

HBSS: *Hank's Balanced Salt Solution*

HIF-1 α : *hypoxia-inducible factor 1-alpha*

ICAM-1: *intercellular adhesion molecule-1*

IFA: *incomplete Freund adjuvant*

IFN- γ : *interferon- γ*

IL: interleukin

IRM: imagerie par résonance magnétique

KO: *knock-out*

LCR: liquide céphalorachidien

MAT2A: *methionine adenosyltransferase 2A*

MBP: *myelin basic protein*

MC: diète contrôle (méthionine contrôle)

MCAM: *melanoma cell adhesion molecule*

MOG: *myelin oligodendrocyte glycoprotein*

MR: diète réduite en méthionine, restriction diététique en méthionine

MTA: *methylthioadenosine*

MTHFR: *methylenetetrahydrofolate reductase*

mTOR: *mammalian target of rapamycin*

mTORC: *mammalian target of rapamycin complex*

PBS: *phosphate buffered saline*

PLP: *myelin proteolipid protein*

PMA: phorbol 12-myristate 13-acétate

ROR: *related orphan receptor*

SAH: *S-adenosyl-homocysteine*

SAM: *S-adenosyl-methionine*

SEP: sclérose en plaques

SNC: système nerveux central

TGF- β : *transforming growth factor β*

TNF α : *tumor necrosis factor α*

TH: *T helper*, cellule T auxiliaire

Treg: cellule T régulatrice

USDA: *US Department of Agriculture*

VCAM-1: *vascular cell adhesion protein-1*

VDR: *intracellular vitamin D receptor*

VLA-4: *very late antigen-4*

À mes parents et mon frère

Remerciements

Je remercie ma directrice de recherche Dre Catherine Larochelle de m'avoir accueilli dans son équipe. Toujours à l'écoute et présente pour répondre à nos questions, ses conseils et son expérience sont essentiels. Son talent, sa bienveillance, sa générosité et son enthousiasme contribuent à faire de son laboratoire un environnement chaleureux et stimulant qui favorise l'entraide, le partage et l'apprentissage. Je remercie les membres du laboratoire : Audrey Daigneault pour sa gentillesse, sa patience, sa compétence et son aide en particulier durant ces longues journées d'expérience; Hélène Jamann pour son énergie, son support, les discussions et fous rires et les moments passés ensemble sous la hotte; Oumarou Ouédraogo pour sa positivité, son attention et son esprit d'équipe; Renaud Balthazard pour son dévouement, les discussions et échanges de rire et les moments passés ensemble à l'animalerie; Alexandre Halaweh pour son implication, son optimisme et son humour. Je remercie également Clara Charbonneau et Florence Millette qui ont contribué à la réalisation de ce projet durant leur stage dans le laboratoire.

Je tiens à remercier nos collaborateurs qui partagent avec nous leur expertise et qui rendent ce projet possible : Dr Russell Jones et les membres de son laboratoire dont Dr Dominic Roy, ainsi que Dr Bertrand Routy et son équipe, particulièrement Dr Meriem Messaoudene, Dr Corentin Richard et Florent Cauchois. Je tiens également à remercier Dr Alexandre Prat et Dre Nathalie Arbour ainsi que les membres de leurs laboratoires pour leur collaboration, particulièrement Lyne Bourbonnière et Sandra Larouche pour leur expertise, leur aide et leurs précieux conseils, ainsi qu'Olivier Tastet pour son aide et ses conseils afin de réaliser les figures de ce mémoire.

Je remercie Dre Diana Matheoud et Dr Thierry Alquier d'avoir accepté de réviser ce mémoire.

J'ai la chance d'être soutenue et encouragée par ma famille et mes amis qui représentent des sources d'inspiration. Merci à mes parents Annick et Benjamin et mon frère Raphael pour leur support inconditionnel et leur amour. Merci à Miri, Elya et Amir pour leur gentillesse, soutien et affection. Merci à Hanna, Rebecca, Joshua, Alicia, Anaëlle, Eva, Noa, Camille et Sana sans qui mon expérience à Montréal et au CRCHUM ne serait pas la même.

Introduction

1. La sclérose en plaques

La sclérose en plaques (SEP) est une maladie inflammatoire démyélinisante caractérisée par des lésions multifocales localisées dans le système nerveux central (SNC). Ces lésions sont causées par des leucocytes pro-inflammatoires infiltrants qui expriment des molécules d'adhérence leur permettant de traverser la barrière hémato-encéphalique (BHE) déstabilisée par l'inflammation. Les oligodendrocytes, les cellules gliales responsables de la myélinisation, sont particulièrement touchés en SEP. La gaine de myéline qui entoure les axones des neurones permet d'augmenter la vitesse de propagation de l'influx nerveux à travers l'axone. La perte de cette gaine de myéline atteint les neurones, nuisant à la conduction axonale et les laissant plus vulnérables à la mort cellulaire. L'étiologie de la SEP est encore mal comprise mais impliquerait des interactions gène-environnement. L'étude du modèle animal de la SEP, l'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE), a permis de faire avancer nos connaissances sur la pathologie de la SEP, mais il n'existe toujours de traitement neuroprotecteur.

1.1 Définition clinique

La SEP se déclare dans la majorité des cas entre l'âge de 20 et 50 ans, et les femmes sont trois fois plus susceptibles que les hommes. La SEP se divise en une forme cyclique ou poussée-rémission affectant environ 85% des patients et une forme primaire progressive survenant dans environ 15% des cas. La première forme se caractérise par des cycles d'épisodes neurologiques symptomatiques et imprévisibles suivis de rémissions spontanées complètes ou partielles. Après une période de temps variable, environ 50-80% des patients ne récupèrent plus de leurs poussées et évoluent vers une forme dite secondaire progressive (figure 1). Dans la forme primaire progressive, les déficits neurologiques progressent et s'accumulent dès l'initiation de la maladie sans période de récupération (Dendrou, Fugger, and Friese 2015; Noseworthy et al. 2000; Nylander and Hafler 2012; Ghasemi, Razavi, and Nikzad 2017).

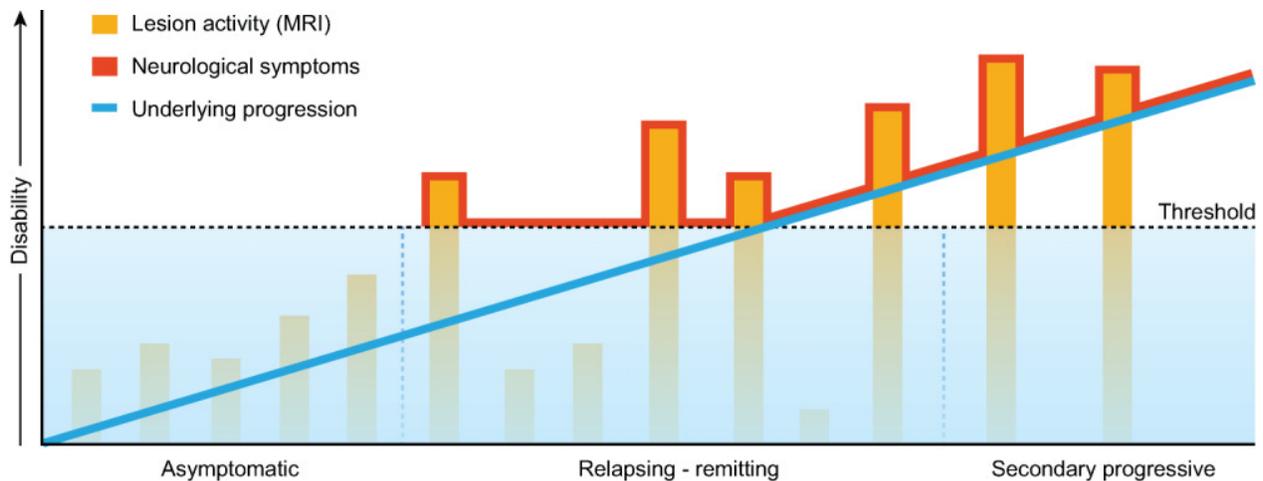


Figure 1. – Évolution clinique de la sclérose en plaques

Dans la forme poussée-rémission (relapsing-remitting), qui représente 85% des cas de SEP, les poussées et rémissions s'atténuent après un certain temps et environ 50-80% des patients développent une forme secondaire progressive (secondary progressive). Dans 15% des cas, la maladie est progressive dès le début. La SEP peut être asymptomatique au début, alors que des lésions qui n'ont pas provoqué de symptômes neurologiques peuvent être détectées fortuitement à l'IRM. Figure utilisée avec permission (t Hart, Laman, and Kap 2018).

La prévalence de la SEP varie considérablement à travers le monde, mais elle est particulièrement élevée au Canada. En 2014-2015, selon les estimations du Système national de surveillance des maladies chroniques et de l'Agence de la santé publique du Canada, la SEP touche environ un canadien sur 385.

Le diagnostic de SEP est basé sur un historique médical et un examen neurologique complet (Nylander and Hafler 2012). L'imagerie par résonance magnétique (IRM), les potentiels évoqués, et la ponction lombaire sont également des outils permettant de confirmer le diagnostic (Ghasemi, Razavi, and Nikzad 2017). L'IRM permet de visualiser les régions du SNC affectées qui présentent des lésions. Pour confirmer un diagnostic de SEP, il faut démontrer cliniquement et/ou radiologiquement la présence de lésions disséminées dans l'espace et le temps, c'est-à-dire qui se forment dans des régions différentes du SNC et à différents moments, en l'absence

d'explication alternative (Filippi and Rocca 2011). Les potentiels évoqués mesurent la vitesse de la conduction nerveuse, et une diminution de cette vitesse peut donc indiquer une démyélinisation des neurones dans le SNC (Hardmeier, Leocani, and Fuhr 2017; Matthews, Wattam-Bell, and Pountney 1982). La ponction lombaire permet de tester la présence de bandes oligoclonales dans le liquide céphalorachidien (LCR), signe d'inflammation et de production d'anticorps dans le SNC (Link and Huang 2006).

Les symptômes de SEP sont variables et dépendent de la région du SNC affectée. Les patients peuvent expérimenter des problèmes visuels (diplopie, névrite optique), moteurs (faiblesse des membres, ataxie, spasticité), ou sensoriels (engourdissement, fourmillement), des dysfonctions urinaires et intestinales (constipation, infections urinaires), de la fatigue, dépression, douleur et des déficits cognitifs (Ghasemi, Razavi, and Nikzad 2017).

1.2 Pathologie

1.2.1 Barrière héméo-encéphalique

La barrière héméo-encéphalique (BHE) est une barrière physiologique présente entre la circulation sanguine et le SNC, au niveau des micro-vaisseaux, capillaires et veinules post-capillaires. Elle est composée de cellules endothéliales, en contact avec la circulation sanguine, qui sécrètent la membrane basale endothéliale dans laquelle sont logés des péricytes. Elle est également composée d'astrocytes, en contact avec le parenchyme nerveux, qui sécrètent la membrane basale parenchymateuse. L'espace périvasculaire, situé entre ces deux membranes, contient des cellules présentatrices d'antigène (CPA) qui sont exposées aux antigènes du SNC et assurent une immunosurveillance (Engelhardt and Ransohoff 2012). La BHE restreint le passage de molécules et cellules de la périphérie vers le SNC afin de contrôler et maintenir son homéostasie. Les cellules endothéliales contribuent à réduire la perméabilité de la BHE entre autres à travers l'expression de nombreux transporteurs d'efflux et de molécules de jonctions serrées et adhérentes qui leur permettent d'être étroitement liées entre elles (Lecuyer, Kebir, and Prat 2016).

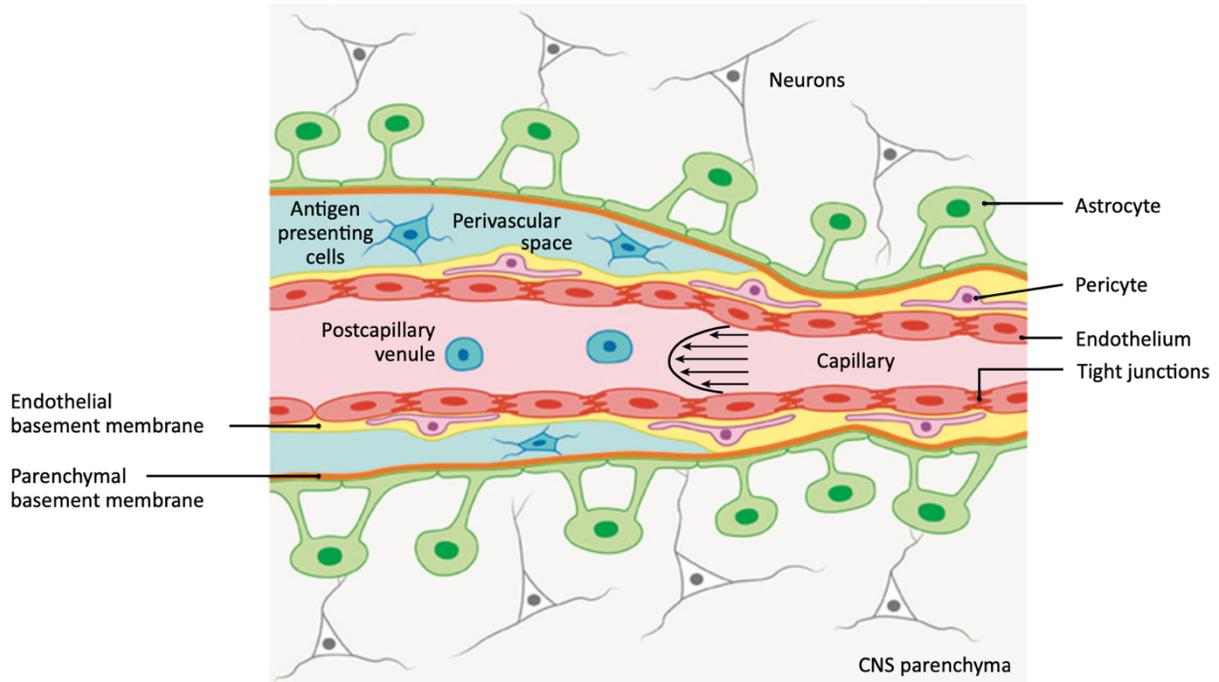


Figure 2. – Anatomie de la barrière hémato-encéphalique

Localisée au niveau des micro-vaisseaux, capillaires et veinules post-capillaires du SNC, la BHE protège le parenchyme nerveux de la périphérie. Les cellules endothéliales sécrètent la membrane basale endothéliale, à l'intérieur de laquelle se trouvent les péricytes, tandis que les astrocytes sécrètent la membrane basale parenchymateuse. Ces deux membranes sont séparées par un espace périvasculaire où sont logées des cellules présentatrices d'antigène. Figure utilisée avec permission (Engelhardt and Ransohoff 2012).

En condition physiologique, la BHE limite l'accès des lymphocytes au SNC, de sorte que seulement quelques cellules peuvent entrer et exercer une surveillance immunitaire. La transmigration des lymphocytes à travers la BHE s'effectue à travers l'interaction de molécules d'adhérence, exprimées par les cellules endothéliales, avec leurs ligands, exprimés par les lymphocytes. Cet accès restreint est donc largement régulé par l'endothélium de la BHE qui exprime constitutivement peu de molécules d'adhérence. Cependant en condition neuroinflammatoire, comme en SEP, l'expression de molécules d'adhérence comme ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule-1*), VCAM-1 (*vascular cell adhesion protein-1*), et ALCAM (*activated leucocyte cell*

adhesion molecule) est régulée à la hausse sur l'endothélium, et favorise les interactions entre les cellules endothéliales de la BHE et les lymphocytes activés. Ces derniers sécrètent aussi des cytokines pro-inflammatoires, comme le TNF α (*tumor necrosis factor α*) et l'IFN- γ (*interferon- γ*), qui contribuent à l'activation de l'endothélium de la BHE et favorisent le recrutement de davantage de cellules immunitaires. Les cellules immunitaires activées sécrètent également des métalloprotéases matricielles qui permettent de dégrader la lame basale. Après transmigration à travers l'endothélium de la BHE et leur membrane basale, les lymphocytes se retrouvent dans l'espace périvasculaire, où sont présentes les CPA qui peuvent les réactiver, ce qui leur permet ensuite de pénétrer le parenchyme du SNC. Par conséquent, l'intégrité de la BHE est compromise et celle-ci devient perméable à l'infiltration de lymphocytes dans le SNC (Greenwood et al. 2011; Larochelle, Alvarez, and Prat 2011).

1.2.2 Plaque de démyélinisation

La caractéristique pathologique de la SEP est la plaque de démyélinisation, une zone délimitée caractérisée par une perte de myéline et d'oligodendrocytes, une préservation relative des axones et neurones, la formation de cicatrices astrogliales, et la présence d'un infiltrat de cellules immunitaires dans l'espace périvasculaire et/ou le parenchyme nerveux. Cet infiltrat est composé de macrophages contenant des fragments de myéline, lymphocytes T CD4 et CD8, lymphocytes B et plasmocytes (Frohman, Racke, and Raine 2006; Dendrou, Fugger, and Friese 2015). Les cellules immunitaires résidentes du SNC, les microglies, sont activées et adoptent un profil pro-inflammatoire qui contribue vraisemblablement aux processus neuroinflammatoires. Les microglies peuvent toutefois également participer aux processus de réparation en effectuant la phagocytose des débris de myéline et en sécrétant des facteurs trophiques (Lloyd and Miron 2019; Luo et al. 2017).

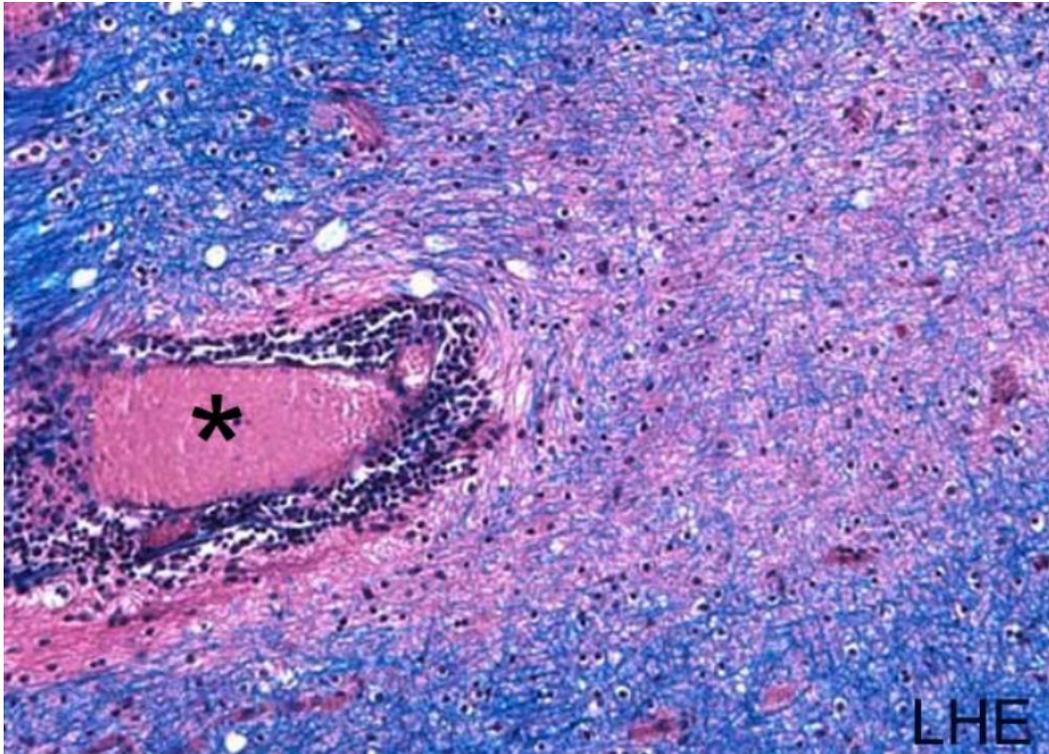


Figure 3. – Plaque de démyélinisation dans la matière blanche du SNC

Échantillon de tissu cérébral post-mortem de patient atteint de la SEP. Le marquage au *luxol fast blue* colorant la myéline, la perte de coloration autour du vaisseau sanguin est signe d'une perte de myéline. Le marquage à l'hématoxyline et à l'éosine met en évidence la présence d'un infiltrat cellulaire dans l'espace périvasculaire et dans le parenchyme nerveux. Figure utilisée avec permission (Larochelle et al. 2012).

Les premiers symptômes de SEP et les poussées sont souvent corrélés avec l'invasion de cellules immunitaires après perturbation de la BHE et l'apparition de lésion ou plaque de démyélinisation dans le SNC. Ces lésions s'étendent graduellement, mais les infiltrats immunitaires ne seraient plus caractéristiques durant les phases progressives où la microglie activée semble prédominer en périphérie des lésions (Guerrero and Sicotte 2020; Dendrou, Fugger, and Friese 2015; Nylander and Hafler 2012). Le déclin progressif clinique serait associé à une diminution du volume cérébral ou atrophie. La perte d'axones et la mort neuronale, présentes dès le début de la maladie,

s'accroissent avec le temps et pourraient représenter un mécanisme sous-tendant l'incapacité progressive en SEP (Dendrou, Fugger, and Friese 2015; Nylander and Hafler 2012).

1.3 Facteurs de risque

La cause exacte de la SEP est encore inconnue. Des facteurs génétiques et environnementaux ont toutefois été identifiés, démontrant le rôle d'interactions gène-environnement.

1.3.1 Génétique

Les premières preuves que la SEP possède une composante génétique proviennent de l'observation que les proches parents des patients atteints de SEP sont plus à risque de développer la maladie par rapport à la population générale. Les études épidémiologiques et la concordance de la SEP chez les jumeaux monozygotes mettent en évidence l'existence d'une héritabilité de la susceptibilité à la maladie. Le risque de développer une SEP pour un enfant ayant un parent atteint augmente à 2%, il est de 6-12% lorsque les deux parents ont un diagnostic de SEP, et il augmente jusqu'à 30% chez les jumeaux monozygotes (Didonna and Oksenberg 2015; Miller et al. 2014).

Les facteurs génétiques de susceptibilité pour la SEP ont premièrement été identifiés grâce à des études sur les variations alléliques dans des gènes candidats jouant possiblement un rôle dans la pathogenèse de la maladie. Ainsi, plusieurs gènes impliqués dans le fonctionnement du système immunitaire augmentent le risque de développer une SEP, notamment un polymorphisme du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II présente la plus grande association avec le risque de développer la maladie. L'avènement de vastes études d'association à l'échelle du génome (GWAS) a considérablement amélioré notre compréhension de la SEP et a permis d'identifier une quantité importante de variations génétiques qui lui sont associées. Une grande partie de ces variations est impliquée dans la régulation de la réponse immunitaire, elles se retrouvent, entre autres, dans des gènes impliqués dans la fonction des lymphocytes (activation et prolifération) et les voies de signalisation des cytokines. Plusieurs de ces variations sont

également partagées avec des maladies auto-immunes (Alcina et al. 2012; Didonna and Oksenberg 2015).

Des études épidémiologiques indiquent que des niveaux élevés d'homocystéine seraient un facteur de risque pour des conditions neurodégénératives comme la SEP. De plus, des polymorphismes du gène MTHFR (*methylenetetrahydrofolate reductase*), codant pour une enzyme intervenant dans le métabolisme de l'homocystéine, seraient un facteur de risque associé avec la SEP. Ces polymorphismes déterminent les niveaux d'homocystéine, et ceux-ci sont élevés dans le sérum et le plasma des patients SEP. L'homocystéine est un acide aminé neurotoxique, pouvant endommager les cellules du SNC et influencer l'activation des macrophages, deux caractéristiques importantes en SEP. Il est produit durant le cycle de la méthionine, et ensuite converti en cystéine ou reconverti en méthionine par reméthylation. Des bas niveaux de vitamine B12, nécessaire pour ce processus de reméthylation, sont également retrouvés dans le sérum de certains patients (Cakina et al. 2019; Ineichen et al. 2014; Olafsson et al. 2017; Zhu, He, and Liu 2011).

1.3.2 Facteurs environnementaux

Un nombre important d'évidences soutiennent l'existence et l'importance de facteurs environnementaux dans le développement et l'évolution de la SEP.

1.3.2.1 Latitude et vitamine D

La SEP est plus répandue dans les latitudes géographiques nordiques et plus rare près de l'équateur. Sa prévalence est particulièrement élevée entre les latitudes de 45 et 65 degrés nord. Particulièrement, les études de migration soulignent l'influence des facteurs environnementaux sur le risque de développer une SEP. Lorsque la migration a lieu avant l'adolescence, le risque pour les individus qui migrent de développer une SEP se rapproche de celui des individus de la région vers laquelle ils migrent. Au contraire, lorsque la migration a lieu après l'adolescence, les individus conservent le risque de développer une SEP équivalent à celui de la région d'où ils

viennent (Hedstrom, Alfredsson, and Olsson 2016; O'Gorman, Lucas, and Taylor 2012; Wade 2014). La réduction de l'exposition au soleil dans les latitudes nordiques a été évoquée pour expliquer la variation géographique de la prévalence de la SEP, car des bas niveaux de vitamine D sont associés avec un plus haut risque de développer une SEP. Les patients présentent notamment de plus bas niveaux de vitamine D durant les poussées et sont également plus à risque d'être en poussée quand les niveaux de vitamine D sont réduits (Miller et al. 2014; O'Gorman, Lucas, and Taylor 2012).

La vitamine D est une pro-hormone appartenant à la catégorie des vitamines liposolubles. Les sources principales de vitamine D sont la lumière du soleil, l'alimentation et la supplémentation. Sa forme active, $1,25(\text{OH})_2\text{D}$, se lie à son récepteur intracellulaire VDR (*intracellular vitamin D receptor*) qui est un récepteur nucléaire agissant comme facteur de transcription. La vitamine D est premièrement responsable du maintien de l'homéostasie du calcium. Son effet est toutefois beaucoup plus large, son récepteur étant présent dans plusieurs organes et tissus. La vitamine D est également impliquée dans le développement et la fonction du SNC, la santé cardiovasculaire et musculaire et la régulation de la production d'insuline. La vitamine D est un immunomodulateur affectant les systèmes immunitaires innés et adaptatifs, toutes les cellules immunitaires exprimant le VDR. L'impact de la vitamine D sur l'immunité des patients SEP a été confirmé dans de nombreuses études in vitro. Son rôle protecteur en EAE a également été suggéré dans plusieurs études. Des polymorphismes dans des gènes qui encodent des protéines clés dans l'action de la vitamine D sont également associés au risque de développer une SEP. Cependant, les essais cliniques sur la supplémentation en vitamine D chez les patients SEP apportent des résultats contradictoires. Les preuves soutenant la vitamine D comme possible traitement pour la SEP ne sont pas concluantes (Bartosik-Psujek and Psujek 2019; O'Gorman, Lucas, and Taylor 2012).

1.3.2.2 Agents infectieux

Des facteurs infectieux ont été proposés comme jouant un rôle dans la pathogenèse de la SEP, en particulier le virus Epstein-Barr (EBV). La mononucléose, causée par cette infection chez

l'adolescent et le jeune adulte, semble particulièrement associée avec une augmentation du risque de SEP. Les patients présentent des niveaux plus élevés d'anticorps contre un fragment particulier de l'antigène EBNA1 (*Epstein-Barr virus-determined nuclear antigen 1*). Cependant, la raison pour laquelle l'EBV augmenterait le risque de développer une SEP n'est pas encore complètement comprise et fait toujours l'objet de recherches pour son rôle au niveau du SNC et du système immunitaire (Hedstrom, Alfredsson, and Olsson 2016; O'Gorman, Lucas, and Taylor 2012).

1.3.2.3 Tabagisme

Plusieurs études suggèrent que le tabagisme et l'exposition passive au tabagisme, mais pas le tabac oral, augmentent le risque de développer une SEP. Ceci suggère que l'exposition à la fumée et l'irritation pulmonaire jouent particulièrement un rôle dans le lien entre le tabagisme et la SEP. De surcroît, une irritation pulmonaire provoquée par des solvants organiques est associée à un risque accru de développer une SEP. Les fumeurs de cigarette souffrent plus souvent d'infections respiratoires, pouvant provoquer des poussées chez les patients SEP. Le tabagisme est également associé à un risque plus élevé de développer une SEP secondaire progressive, et en neuro-imagerie, les patients SEP fumeurs présentent plus d'inflammation et d'atrophie cérébrale, suggérant à long terme un mauvais pronostic (Hedstrom, Alfredsson, and Olsson 2016; O'Gorman, Lucas, and Taylor 2012).

Le tabagisme agit sur le système immunitaire et contribue au maintien d'un état pro-inflammatoire. Les fumeurs présentent notamment des niveaux élevés de cytokines pro-inflammatoires, et la cigarette réduit l'expansion clonale des lymphocytes T CD4, et l'activation des lymphocytes T CD8 en réponse à une infection (O'Gorman, Lucas, and Taylor 2012). Les composantes de la cigarette contiennent des concentrations élevées de radicaux libres qui peuvent endommager les cellules ou l'ADN en causant des mutations facilitant l'auto-immunité. La nicotine peut également agir sur la BHE en influençant sa perméabilité (O'Gorman, Lucas, and Taylor 2012).

1.3.2.4 Obésité

L'obésité à l'adolescence double le risque de développer une SEP. L'obésité est associée au développement d'une inflammation chronique de bas grade, ce qui contribuerait à son association avec la SEP. Elle est caractérisée entre autres par une accumulation de macrophages au profil pro-inflammatoire, et par une infiltration de cellules immunitaires adaptatives dans le tissu adipeux viscéral entraînant la libération chronique de cytokines pro-inflammatoires. Une étude montre qu'une diète élevée en gras induisant l'obésité chez des souris est associée avec une EAE plus sévère, une augmentation de l'activation microgliale, et de l'expansion de sous types de lymphocytes T CD4 pro-inflammatoires, TH1 et TH17. L'obésité diminue également la biodisponibilité de la vitamine D (Hedstrom, Alfredsson, and Olsson 2016; Ji et al. 2019).

Des variations génétiques reliées à l'obésité, un indice de masse corporelle élevé particulièrement chez les adolescentes, et des interactions entre l'indice de masse corporelle et le génotype du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II sont associés au risque de développer une SEP (Munger, Chitnis, and Ascherio 2009; Gianfrancesco et al. 2017; Mokry et al. 2016; Hedstrom, Olsson, and Alfredsson 2012; Langer-Gould et al. 2013; Hedstrom et al. 2014). En outre, l'obésité et l'âge sont associés au développement de comorbidités cardiovasculaires, fréquentes chez les patients SEP (Marrie 2017; Tettey et al. 2014).

1.3.2.5 Nutrition et microbiome intestinal

Beaucoup d'études suggèrent que l'alimentation semble jouer un rôle important sur le risque de développer une SEP. Quelques exemples sont cités dans cette section.

Tout d'abord, des expériences in vitro montrent que le sodium promeut la différenciation des lymphocytes T CD4 en sous-type pro-inflammatoire TH17. D'autres expériences montrent que des souris nourries avec une diète élevée en sodium développent une EAE plus sévère, associée avec une augmentation de la fonction des lymphocytes TH17 (Wilck et al. 2017; Wu et al. 2013). Chez l'humain, une consommation alimentaire élevée en sodium pourrait influencer le développement et l'évolution de la SEP, les patients qui consomment des niveaux élevés de sodium ont plus de poussées et présentent plus d'activité à l'IRM (Hedstrom, Alfredsson, and

Olsson 2016; Farez et al. 2015). De plus, des études épidémiologiques suggèrent qu'une consommation élevée de graisses animales saturées est associée à long terme avec une augmentation de l'incidence et de la sévérité de la SEP (Alter, Yamoore, and Harshe 1974). Enfin, dans une autre étude, le régime méditerranéen est associé avec une réduction du risque de développer la SEP. Le régime méditerranéen met l'accent sur les fruits, légumes, grains entiers, graisses insaturées, encourage la consommation de produits laitiers et de poisson, et limite la consommation de viande. Cette diète influencerait l'inflammation en augmentant la consommation d'antioxydants et en diminuant les niveaux circulants de leucocytes et plaquettes (Ambring et al. 2006; Sanchez et al. 2020; Trichopoulou et al. 2003).

Le modèle animal de la SEP, l'EAE, fournit également quelques indices sur des habitudes alimentaires qui pourraient avoir une influence sur le risque de développer une SEP. En effet, dans une étude, la consommation de fibres alimentaires non fermentées réduit l'incidence de l'EAE et retarde l'apparition des symptômes neurologiques sans affecter leur sévérité et l'expression de marqueurs inflammatoires dans la moelle épinière des souris (Berer et al. 2018). D'autre part, l'administration quotidienne de curcumine dès l'immunisation des souris EAE est associée à un délai de l'apparition des symptômes et une réduction de leur sévérité, la curcumine possède des propriétés anti-inflammatoire et anti-oxydative (Esmaeilzadeh et al. 2019). Enfin, la naringénine est un flavonoïde présent dans les agrumes, possédant également des propriétés anti-inflammatoire et anti-oxydante. Sa supplémentation réduit l'incidence de l'EAE, retarde l'apparition des symptômes neurologiques et atténue leur sévérité. Ceci est associé à une réduction de l'infiltration de cellules immunitaires et de la démyélinisation dans la moelle épinière (Wang et al. 2018).

L'alimentation peut directement influencer le microbiome intestinal en fournissant des substrats qui supportent ou inhibent la croissance des micro-organismes. Plusieurs études suggèrent que le microbiome intestinal joue un rôle fonctionnel en SEP et EAE. Tout d'abord, les souris sans germes qui n'ont pas de microbiome endogène développent une EAE moins sévère, de même que les souris traitées avec des antibiotiques (Berer et al. 2011; Lee et al. 2011; Ochoa-Reparaz et al. 2009). De plus, il a été démontré que les bactéries filamenteuses segmentées, exacerbent l'EAE, tandis que d'autres l'améliorent, comme *Bacteroides fragilis*, *Prevotella histolitica*, et les

espèces *Lactobacillus* (Lee et al. 2011; Mangalam et al. 2017; Ochoa-Reparaz et al. 2009). Les résultats en EAE sont supportés par des études avec les patients SEP montrant qu'ils possèdent des taxons bactériens distincts et différents par rapport aux sujets contrôles (Jangi et al. 2016). Le microbiome des patients SEP en poussée-rémission est différent par rapport à celui des sujets contrôles, et le microbiome des patients en rémission ressemble plus à celui des sujets contrôles (Chen et al. 2016). Enfin des études montrent que transférer le microbiome de patients SEP dans des souris sans germes est associé à une EAE plus sévère que transférer le microbiome de contrôles sains (Berer et al. 2017; Cekanaviciute et al. 2017).

Finalement, le rôle du microbiome intestinal dans la SEP semble étroitement lié au régime alimentaire. Il a été récemment démontré qu'une diète dépourvue de l'acide aminé tryptophane prévient l'EAE, et ceci est dépendant de la présence d'un microbiome intestinal (Sonner et al. 2019).

1.4 Traitements

Il n'existe pas de cure pour la SEP mais depuis le milieu des années 1990, des traitements basés autour de stratégies d'immunomodulation et d'immunosuppression sont disponibles.

Les traitements de première ligne incluent l'interféron β et l'acétate de glatiramère. Le mécanisme d'action de l'interféron β est complexe et multifactoriel, il induit une augmentation de l'expression d'agents anti-inflammatoires et une réduction de l'expression de cytokines pro-inflammatoires (Kieseier 2011). L'acétate de glatiramère est un polypeptide qui agit sur le système immunitaire en modifiant la polarisation des lymphocytes d'un profil pro-inflammatoire à un profil anti-inflammatoire (Aharoni 2013). Cliniquement ils permettent de réduire la fréquence des poussées et l'apparition de lésions visibles à l'IRM (Goodin et al. 2002; Kieseier 2011).

Le natalizumab et le fingolimod sont des exemples de traitements de deuxième ligne. Le natalizumab est un anticorps monoclonal anti-VLA-4 (*very late antigen-4*) qui cible spécifiquement l'entrée des cellules immunitaires dans le SNC. VLA-4 est une intégrine exprimée

par les cellules immunitaires activées, leur permettant d'interagir avec son ligand, VCAM, exprimé par les cellules endothéliales de la BHE. En inhibant la migration des lymphocytes à travers la BHE, le natalizumab permet cliniquement de réduire la fréquence des poussées et la formation de lésions (Polman et al. 2006). Le fingolimod affecte le nombre de lymphocytes circulants en inhibant leur sortie des ganglions lymphatiques. Les essais cliniques ont démontré des effets bénéfiques sur la fréquence des poussées et l'activité de la maladie à l'IRM, la progression de l'invalidité, et le volume cérébral (Willis and Cohen 2013).

Ces traitements, permettant de réduire l'infiltration de cellules immunitaires provenant de la périphérie et la fréquence des poussées, sont principalement efficaces pour traiter la forme poussée-rémission de la SEP. Bien qu'une inflammation de bas grade persiste, aux stades progressifs de la SEP, la perte axonale et neuronale semble plus importante. Les traitements immunomodulateurs et immunosuppresseurs peuvent avoir un effet marginal contre cette inflammation de bas grade mais ne réduisent pas la progression (Lim and Constantinescu 2010). L'ocrelizumab est le premier traitement disponible pour le traitement de la SEP primaire progressive en plus d'être efficace en forme poussée-rémission. Il s'agit d'un anticorps monoclonal anti-CD20 ciblant les lymphocytes B pour réduire leurs niveaux circulants. Il réduit la fréquence des poussées et ralentit légèrement la progression vers l'invalidité pour les patients avec la forme primaire progressive (Mularo, Midaglia, and Montalban 2018; Syed 2018).

Les traitements immunomodulateurs et immunosuppresseurs peuvent malheureusement être associés à des effets secondaires considérables tels qu'entre autres une hépatotoxicité, des infections, une leuco-encéphalopathie multifocale progressive (maladie virale opportuniste du SNC), des symptômes gastro-intestinaux, et une augmentation de certains cancers (Michel, Larochelle, and Prat 2015). Les traitements actuellement disponibles restent peu efficaces pour les formes progressives de la SEP, soulignant le besoin de développer des stratégies neuroprotectrices et réparatrices.

Finalement, plusieurs études démontrent l'influence de la diète et du microbiome intestinal en SEP et suggèrent leur potentiel thérapeutique. La diète cétogène est pauvre en glucides, riche en matières grasses, et nécessite une supplémentation en vitamines et minéraux. Cette diète induit

la formation de corps cétoniques dans le foie, qui sont libérés dans la circulation et utilisés comme énergie. Ces corps cétoniques peuvent avoir des effets anti-inflammatoires et neuroprotecteurs. La diète cétogène a des effets bénéfiques en EAE, à travers la suppression de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires. Des essais cliniques suggèrent également des effets bénéfiques pour les patients SEP (Choi et al. 2016; Evans et al. 2019; Pinto et al. 2018). En outre, la restriction calorique possède des effets anti-inflammatoire et neuroprotecteur, à travers son influence sur les niveaux circulants de cytokines et d'adipocytokines, la réduction du stress oxydatif, et l'augmentation des facteurs neurotrophiques, de l'autophagie et de la biogenèse mitochondriale. La restriction calorique est difficilement réalisable chez l'humain; une alternative possédant des effets métaboliques et anti-inflammatoires similaires est le jeûne intermittent (Evans et al. 2019; Fontana 2009; Mattson, Longo, and Harvie 2017; Pani 2015; Piccio, Stark, and Cross 2008). La restriction calorique ainsi que le jeûne intermittent ont des effets bénéfiques en EAE (Cignarella et al. 2018; Evans et al. 2019; Piccio, Stark, and Cross 2008). Des essais cliniques suggèrent également des effets bénéfiques chez les patients SEP, à travers une diminution du nombre de lymphocytes circulants (Choi et al. 2016; Cignarella et al. 2018). D'autre part, des essais cliniques suggèrent que certains probiotiques ont des effets bénéfiques en SEP. Ils sont associés à une diminution de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires par les cellules immunitaires, et une certaine amélioration de la sévérité clinique et de la qualité de vie. Il reste à déterminer si les probiotiques peuvent avoir des effets bénéfiques à long terme en SEP progressive (Kouchaki et al. 2017; Tankou et al. 2018).

1.5 Modèles animaux de la SEP

L'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE), reproduisant plusieurs caractéristiques pathologiques de la SEP, est le modèle animal le plus utilisé. Il a permis d'élargir nos connaissances sur les mécanismes responsables de la pathologie de la SEP, de développer des traitements comme l'acétate de glatiramère et le natalizumab (Teitelbaum et al. 2004; Teitelbaum, Arnon, and Sela 1999; Teitelbaum et al. 1996; Teitelbaum et al. 1971; Yednock et al. 1992), et de valider fonctionnellement des gènes candidats associés à la SEP, par exemple, les

souris *knock-out* (KO) pour le gène Stat3 (*signal transducer and activator of transcription 3*) dans les lymphocytes T CD4 sont résistantes à l'EAE (Didonna and Oksenberg 2015).

L'EAE peut être induite en immunisant les animaux avec des antigènes de myéline (EAE active) ou en transférant des lymphocytes T encéphalitogènes (EAE passive), ou encore survenir spontanément (EAE spontanée) chez des souris transgéniques. Une EAE classique se caractérise par une paralysie ascendante, commençant à la queue et se poursuivant dans les membres postérieurs puis antérieurs. Elle est le plus souvent évaluée cliniquement sur une échelle de score allant jusqu'à 5. Dans certains cas, les souris développent une EAE atypique caractérisée par une perte de coordination, une ataxie ou spasticité et également évaluée sur une échelle de 5 points. Les déficits neurologiques observés chez ces différents modèles sont causés par l'infiltration de cellules immunitaires dans le SNC, caractéristique retrouvée en SEP.

En EAE active, une souris est immunisée avec un peptide de myéline comme PLP (*myelin proteolipid protein*), MBP (*myelin basic protein*) ou MOG (*myelin oligodendrocyte glycoprotein*), l'antigène utilisé diffère en fonction de la souche de souris. L'apparition des symptômes survient généralement après 9 à 12 jours. Chez la souris C57BL/6, l'immunisation avec du MOG₃₅₋₅₅ dans du CFA (*complete freund adjuvant*) suivie d'une injection de toxine pertussique peut induire une EAE monophasique ou chronique. Dans ce modèle, les macrophages et les lymphocytes T CD4 sont les principaux types cellulaires présents dans les infiltrats immunitaires, et les lésions apparaissent majoritairement dans la moelle épinière. Chez la souris SJL/J, l'immunisation avec du PLP₁₃₉₋₁₅₁ induit une EAE poussée-rémission. Les lésions peuvent apparaître dans le tronc cérébral, la moelle épinière, le cervelet et le cortex cérébral (Constantinescu et al. 2011; Domingues et al. 2010; McRae et al. 1992; Stromnes and Goverman 2006a; Tuohy et al. 1989).

En EAE passive, des lymphocytes pro-inflammatoires, généralement prélevés de souris immunisées ou transgéniques, reconnaissant des peptides de myéline sont réactivés en culture et transférés dans des souris naïves. Un avantage majeur de ce modèle est qu'il permet de manipuler *in vitro* la fonction effectrice des lymphocytes avant de les transférer afin d'étudier leur importance dans la pathogénèse de la maladie (Stromnes and Goverman 2006b).

En EAE spontanée, des souris transgéniques pour un récepteur des cellules T reconnaissant un peptide de myéline développent spontanément des symptômes neurologiques. Quelques exemples de modèles transgéniques sont abordés dans cette section.

Les lymphocytes T des souris transgéniques C57BL/6 2D2 TCR^{MOG} reconnaissent spécifiquement le MOG₃₅₋₅₅. Ces souris peuvent spontanément développer une EAE et un des symptômes des patients SEP, une névrite optique. Il est également possible de les immuniser avec du MOG₃₅₋₅₅. En EAE active chez des souris sauvages l'immunisation avec un peptide induit une multitude de lignées de lymphocytes T, il est ainsi difficile d'isoler la contribution à l'EAE de sous-ensembles spécifiques de lymphocytes T. En outre, l'hétérogénéité clonale des populations de lymphocytes T, lors des transferts adoptifs, ne permet pas de garantir que les cellules transférées sont entièrement spécifiques à un antigène en particulier. Le modèle 2D2 TCR^{MOG} est avantageux car il permet de stimuler in vitro des clones homogènes de lymphocytes T spécifiques pour MOG₃₅₋₅₅ (Bettelli et al. 2003).

Les souris de souche NOD développent spontanément le diabète et sont susceptibles à l'EAE quand elles sont immunisées avec du MOG₃₅₋₅₅. Elles développent une EAE poussée-rémission qui se transforme en EAE chronique sans rémission, ce qui est très similaire à ce qui est observé cliniquement chez les patients SEP (Encinas et al. 1999). Les souris transgéniques NOD 1C6 possèdent des lymphocytes T CD4 et CD8 qui reconnaissent le MOG₃₅₋₅₅. Initialement généré pour que les lymphocytes T CD4 reconnaissent le MOG₃₅₋₅₅, ce modèle est le premier à produire des lymphocytes T CD8 réactifs contre le MOG, et permet d'étudier particulièrement le rôle de cette population en EAE (Anderson et al. 2012).

Les lymphocytes T des souris transgéniques SJL TCR1640 reconnaissent spécifiquement le MOG₉₂₋₁₀₆. Ces souris développent une EAE spontanée et démontrent des différences liées au sexe biologique, les femelles développant majoritairement une EAE poussée-rémission tandis que les mâles développent plus souvent une EAE progressive. De plus, chez les TCR1640 les femelles ont une incidence plus élevée d'EAE par rapport aux mâles. Ce modèle, reproduisant plusieurs caractéristiques cliniques des patients SEP, est un bon modèle pour ultimement essayer de mieux comprendre les divergences hommes/femmes en SEP (Dhaeze et al. 2019; Pollinger et al. 2009).

2. Implication des lymphocytes en sclérose en plaques

La présence de lymphocytes et macrophages dans les lésions, et l'efficacité des traitements immunomodulateurs et immunosuppresseurs actuellement disponibles, soutiennent le rôle du système immunitaire dans la pathophysiologie de la SEP. Grâce aux recherches menées avec le modèle EAE, et aux études cliniques, il est reconnu que les lymphocytes T activés jouent un rôle majeur en SEP. En effet, ils peuvent contribuer aux dommages dans le SNC en provoquant directement la mort cellulaire ou à travers des médiateurs solubles comme les cytokines. Les lymphocytes T sont un groupe hétérogène de cellules pouvant être divisés en trois catégories : les lymphocytes CD4 auxiliaires (*T helper*, TH), les lymphocytes CD8 cytotoxiques, et les lymphocytes régulateurs. Dans chacune de ces catégories, les lymphocytes peuvent se différencier en sous-types en fonction des cytokines auxquelles ils sont exposés, et de leur expression en récepteurs de chimiokines et facteurs de transcription. Les lymphocytes T CD4 auxiliaires sont divisés en sous-types TH1, TH17 et TH2. À travers leur profil d'expression de cytokines, chaque sous-type de lymphocytes possède un rôle spécifique dans la réponse immunitaire. Les chimiokines qu'il produisent localement dans les tissus attirent différents types de cellules immunitaires au site d'inflammation, et l'expression de récepteur de chimiokines par les lymphocytes reflète leur habilité à migrer. Il est également suggéré que les lymphocytes B sont aussi importants en SEP, ceci est soutenu par la présence de bandes oligoclonales dans le LCR des patients SEP, le rôle important joué par les anticorps dans la démyélinisation en EAE et l'efficacité clinique des traitements induisant une déplétion des lymphocytes B (ocrelizumab) (Duffy, Lees, and Moalem-Taylor 2014; Michel et al. 2015).

2.1 Activation des lymphocytes

Les lymphocytes naïfs, circulant dans l'organisme, possèdent à leur surface des récepteurs pouvant détecter des antigènes étrangers. Ils sont activés lorsqu'ils reconnaissent ces antigènes présentés sur une cellule présentatrice d'antigène (CPA), et reçoivent les signaux stimulateurs appropriés. Soutenus par une reprogrammation métabolique, les lymphocytes naïfs subissent une rapide poussée de prolifération lorsqu'activés, et assument des fonctions effectrices pour

agir contre l'antigène étranger. Il est de plus en plus admis que les fonctions effectrices des lymphocytes dépendent également de cette reprogrammation métabolique, et ne peuvent pas se poursuivre sans adopter le métabolisme approprié.

2.1.1 Présentation d'antigène

Les cellules dendritiques, principales cellules présentatrices d'antigène orchestrant l'équilibre entre immunité et tolérance, jouent un rôle clé dans la pathogénèse de la SEP et de l'EAE. Elles sont retrouvées dans le LCR des patients SEP et dans les lésions. Lorsqu'elles rencontrent un antigène étranger, les cellules dendritiques migrent dans les organes lymphoïdes pour activer les lymphocytes T en leur présentant le peptide sur le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). En fonction des cytokines sécrétées par les cellules dendritiques, les lymphocytes T naïfs se différencient en cellules effectrices appropriées. Ainsi, en périphérie, les cellules dendritiques activent les lymphocytes T réactifs à la myéline, qui sécrètent des cytokines pro-inflammatoires pour faciliter leur migration à travers la BHE. Dans l'espace périvasculaire, ces lymphocytes T sont réactivés par des CPA, comme les cellules dendritiques, avant d'infiltrer le parenchyme nerveux (Tai et al. 2018; Xie et al. 2015; Cheng et al. 2017).

Les macrophages, abondants dans les lésions SEP, sont les principales cellules phagocytaires et sont aussi importantes dans la présentation des antigènes. Les macrophages contribuent à la formation des lésions et au dommage axonal, mais participent également à la clairance des débris de myéline, et produisent des facteurs neurotrophiques, et des molécules anti-inflammatoires. Ils peuvent être divisés en deux phénotypes différents : M1, produisant des médiateurs pro-inflammatoires et favorisant la polarisation des lymphocytes en sous types pro-inflammatoires, et M2, produisant des médiateurs anti-inflammatoires et restaurant l'homéostasie des tissus. La balance entre M1 et M2 serait dérégulée dans les maladies auto-immunes, les macrophages sont trop activés et produisent davantage de médiateurs pro-inflammatoires (Dankers et al. 2016; Murray and Wynn 2011; Cheng et al. 2017).

Les neutrophiles sont les cellules immunitaires les plus abondantes et les premières à répondre aux infections et à l'inflammation (Lawrence, Corriden, and Nizet 2020). Ils ne sont généralement

pas détectés dans les lésions de SEP, mais selon une étude, les neutrophiles sont fonctionnellement importants pour le développement d'une neuroinflammation en EAE. Dans ce modèle, les neutrophiles infiltrent le SNC 2-3 jours avant l'apparition des symptômes, et leur sécrétion de cytokines pro-inflammatoires contribuerait à la maturation des CPA, affectant ultimement la réactivation des lymphocytes T. La déplétion des neutrophiles durant la phase présymptomatique abroge le développement de l'EAE, alors que leur déplétion après l'apparition des symptômes n'a aucun effet sur leur sévérité (Steinbach et al. 2013).

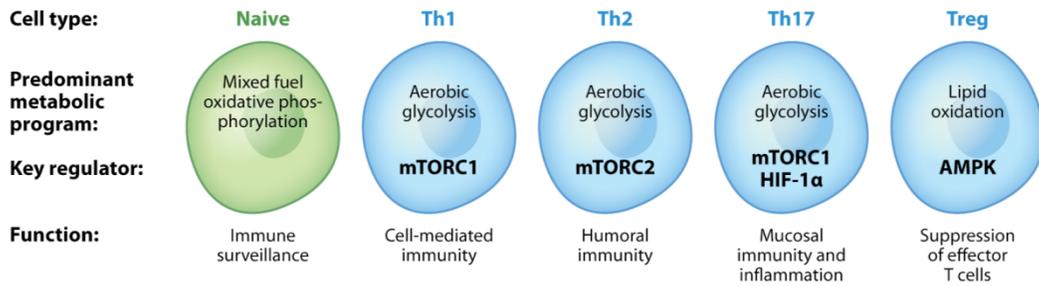
2.1.2 Changements métaboliques

Afin de soutenir leurs fonctions, les cellules doivent avoir accès à des nutriments suffisants et appropriés, et lorsqu'elles sont stimulées pour croître, proliférer ou mourir, le métabolisme cellulaire doit s'adapter et répondre aux besoins métaboliques. La régulation de l'absorption et de l'utilisation des nutriments par les cellules immunitaires est importante pour leur prolifération et fonction (MacIver, Michalek, and Rathmell 2013). Lorsque les lymphocytes T sont activés, l'expression des transporteurs du glucose, comme Glut1, et de la glutamine, comme SNAT-1 et SNAT-2, est régulée à la hausse, ainsi que celle de certains transporteurs d'acides aminés comme SLC7A5, par lequel la leucine traverse, ou SLC1A5 par lequel traversent l'alanine, la sérine et la cystéine. La délétion des transporteurs de la glutamine compromet la transition des lymphocytes T en cellules effectrices, et une perte de SLC1A5 limite la différenciation des lymphocytes T CD4 en TH1 ou TH17 sans affecter la génération de TH2 ou lymphocytes T régulateur (Treg). De plus, après l'activation des lymphocytes T, la demande en lipides augmente rapidement afin de synthétiser la membrane cellulaire. La synthèse d'acides gras est aussi importante pour la fonction effectrice des lymphocytes T, une déficience en ACC1, une enzyme impliquée dans cette synthèse, limite la différenciation des lymphocytes T CD4 en TH1, TH2 ou TH17 et promeut le développement des lymphocytes Treg (Buck, O'Sullivan, and Pearce 2015; Ren et al. 2017).

La glycolyse et la phosphorylation oxydative sont les deux principaux processus fournissant de l'énergie dans les cellules. Alors qu'à l'état de repos les lymphocytes utilisent principalement la phosphorylation oxydative comme programme métabolique, celui-ci change pour la glycolyse

lorsque les lymphocytes sont stimulés. Ce changement permet de répondre aux besoins métaboliques des lymphocytes devant proliférer aussitôt après leur activation puisque la glycolyse produit de l'énergie rapidement et efficacement, ainsi que des intermédiaires métaboliques utilisés dans d'autres voies métaboliques (Maclver, Michalek, and Rathmell 2013; Pearce et al. 2013).

Les lymphocytes T activés prolifèrent et se différencient en sous-populations distinctes possédant chacune un rôle unique pour maintenir une réponse fonctionnelle et réguler l'homéostasie immunitaire. L'activation des lymphocytes T n'induit pas une reprogrammation métabolique uniforme, ainsi en plus de leurs fonctions distinctes, les sous-populations de lymphocytes T possèdent des profils métaboliques uniques essentiels pour leur fonction. Les sous-types de lymphocytes T CD4 sont les mieux définis au niveau métabolique. Alors que les lymphocytes T auxiliaires dépendent de l'enzyme mTOR (*mammalian target of rapamycin*) pour leur différenciation, la génération de lymphocytes T régulateurs requiert l'action de l'enzyme AMPK (*AMP-activated protein kinase*). Au sein même des lymphocytes T auxiliaires, mTOR faisant partie de deux complexes indépendants : mTORC1 (*mammalian target of rapamycin complex 1*) contribue à la différenciation des sous-types de lymphocytes T CD4 TH1 et TH17 tandis que mTORC2 contribue à celle des TH2. Le métabolisme des lymphocytes TH17 est également spécifiquement régulé par le facteur de transcription HIF-1 α (*hypoxia-inducible factor 1-alpha*), dont le rôle reste encore mal compris. De surcroît, la leucine pouvant activer mTOR, une déficience en SLC7A5 limite l'activation de mTORC1 et n'a pas d'impact sur la capacité des CD4 à se différencier en lymphocyte Treg. L'activation de mTOR promeut un métabolisme anabolique favorisant la glycolyse et la prolifération, alors que l'activation de l'AMPK induit un métabolisme catabolique favorisant la phosphorylation oxydative et l'oxydation des lipides (Maclver, Michalek, and Rathmell 2013; Buck, O'Sullivan, and Pearce 2015; Johnson et al. 2016).



AR MacIver NJ, et al. 2013.
Annu. Rev. Immunol. 31:259–83

Figure 4. – Profils métaboliques des sous-types de lymphocytes T

Les sous-types de lymphocytes T possèdent des profils métaboliques uniques essentiels pour leur différenciation et fonction. Figure modifiée et utilisée avec permission (MacIver, Michalek, and Rathmell 2013).

2.2 Les sous-populations de lymphocytes T CD4

Les lymphocytes T CD4 possèdent à leur surface un récepteur de cellule T (TCR) interagissant avec le CMH de classe II. Après leur activation par une CPA, ils se différencient en différents sous-types en fonction des signaux qu'ils reçoivent et des facteurs de transcription qui sont activés.

2.2.1 TH1

Un lymphocyte T naïf exposé à de l'IFN- γ et de l'IL-12 (*interleukin-12*) durant l'activation exprime le facteur de transcription T-bet et se différencie en TH1. Les TH1 sont caractérisés par l'expression de l'IFN- γ et du TNF α (Lazarevic, Glimcher, and Lord 2013; Cheng et al. 2017). Les lymphocytes TH1 participent particulièrement à la réponse immunitaire contre les pathogènes intracellulaires. Le récepteur CXCR3 (*C-X-C motif chemokine receptor 3*) aux chimiokines CXCL9 (*C-X-C motif chemokine ligand 9*), CXCL10, CXCL11, dirige plus particulièrement l'entrée des lymphocytes TH1 dans les organes comme le SNC (Groom and Luster 2011). Les lymphocytes TH1, longtemps considérés comme les cellules effectrices primaires en SEP et EAE, sont capables d'induire une EAE quand ils sont transférés dans des souris naïves (van der Veen, Kapp, and

Trotter 1993). De plus, les souris KO pour T-bet sont résistantes à l'EAE (Bettelli et al. 2004). Cependant, les souris KO pour IFN- γ ou pour la sous-unité p70 de l'IL-12 sont susceptibles à l'EAE et peuvent même développer des symptômes plus sévères (Becher, Durell, and Noelle 2002; Ferber et al. 1996; Gran et al. 2002). Dans un modèle d'EAE passive, bloquer CXCR3 est associé à un délai de l'apparition des symptômes et une réduction de leur sévérité (Sporici and Issekutz 2010).

2.2.2 TH17

Un lymphocyte T naïf exposé au TGF- β (*transforming growth factor β*), à l'IL-6 et à l'IL-23 durant l'activation exprime les facteurs de transcription ROR- γ t (*related orphan receptor- γ t*) et ROR- α , et se différencie en TH17. Les TH17 expriment l'IL-17A, IL-17F, IL-21, et IL-22 (Cheng et al. 2017; Korn et al. 2009). Le récepteur CCR6 (*C-C motif chemokine receptor 6*) à la chimiokine CCL20 (*C-C motif chemokine ligand 20*) dirige plus particulièrement l'entrée des lymphocytes TH17 dans le SNC (Cui, Chu, and Chen 2020). Le paradigme sur les TH1 a changé lorsque les TH17 ont été découverts. Bloquer la signalisation de l'IL-23, limite la différenciation des TH17 et améliore la progression de l'EAE (McGeachy et al. 2009; Veldhoen et al. 2006). Les niveaux sériques d'IL-17A et IL-17F sont élevés chez les patients SEP, et une forte expression d'IL-17A est corrélée avec la sévérité des symptômes (Babaloo et al. 2015). De plus, les souris déficientes en IL-17A présentent une EAE moins sévère (Cheng et al. 2017). Inhiber l'action du CCR6 est associé à une réduction de la sévérité de l'EAE (Liston et al. 2009).

2.2.3 TH2

Un lymphocyte T naïf exposé à de l'IL-4 durant l'activation exprime le facteur de transcription GATA-3 et se différencie en TH2 qui sécrète de l'IL-4, IL-5, IL-10 et IL-13 (Cheng et al. 2017). Les lymphocytes TH2 agissent contre les pathogènes extracellulaires et les allergènes. Ils sont considérés anti-inflammatoires en SEP et EAE, des souris qui surexpriment GATA-3 présentant un délai d'apparition des symptômes d'EAE et une réduction de leur sévérité (Fernando et al. 2014).

2.2.4 Treg

Un lymphocyte T naïf exposé à de l'IL-2 et au TGF- β durant l'activation exprime le facteur de transcription FoxP3 (*Forkheadbox P3*) et se différencie en Treg qui exprime en surface CD25 (*cluster of differentiation 25*) et sécrète de l'IL-10, IL-35, et du TGF- β (Buc 2013). Les lymphocytes T régulateurs limitent les réactions inflammatoires en inhibant l'activation des lymphocytes T auto-réactifs à travers la sécrétion de médiateurs immunosuppresseurs, des contacts cellulaires ou l'inhibition de la capacité des CPA à stimuler les cellules immunitaires (Schmidt, Oberle, and Krammer 2012). Plusieurs études suggèrent que les lymphocytes Treg sont dysfonctionnels en EAE et SEP, et ceci pourrait jouer un rôle dans la pathogénèse de la maladie. Chez les patients SEP notamment, la fréquence des Treg ne diffère pas par rapport aux sujets contrôles, mais les lymphocytes présentent des défauts fonctionnels in vitro (Costantino, Baecher-Allan, and Hafler 2008; Kumar, Stellrecht, and Sercarz 1996; Vigiotta et al. 2004).

2.3 Les lymphocytes T CD8

Les recherches se sont longtemps concentrées sur l'implication des lymphocytes T CD4, mais les lymphocytes T CD8 contribuent vraisemblablement à la pathophysiologie de la SEP et de l'EAE. Ils interagissent avec le CMH de classe I, et se différencient en cellules effectrices cytotoxiques produisant des granules cytolytiques comme la perforine et le granzyme B après leur activation. Le rôle primaire des lymphocytes T CD8 est de protéger contre les infections virales, et ils participent à la réponse immunitaire en induisant l'apoptose des cellules (Goverman 2009).

Le transfert adoptif de lymphocytes T CD8 spécifiques pour MOG₃₅₋₅₅ dans des souris receveuses induit une EAE (Ford and Evavold 2005) toutefois ceci est controversé (Leuenberger et al. 2013). Une étude montre que des souris déficientes en CD8 et immunisées au MOG₃₅₋₅₅ sont résistantes au développement de l'EAE (Luo et al. 2014), alors qu'une autre montre que même si les symptômes sont moins sévères, les souris développent tout de même une EAE (Bettini, Rosenthal, and Evavold 2009). Les lymphocytes T CD8 migrent dans le SNC des souris EAE, et chez les patients SEP, les CD8 sont présents en plus grand nombre que les CD4 dans les plaques de démyélinisation (Machado-Santos et al. 2018; Goverman 2009).

2.4 Les lymphocytes B

Les bandes oligoclonales dans le LCR des patients SEP et l'efficacité du traitement anti-CD20 (exprimé sur les lymphocytes B) pour réduire la fréquence des poussées sont des données permettant de reconnaître le rôle important des lymphocytes B en SEP (Michel et al. 2015).

Un lymphocyte T naïf exposé à de l'IL-21 et IL-6 durant l'activation exprime le facteur de transcription Bcl-6, et se différencie en T folliculaire qui aide à induire la transformation des lymphocytes B en plasmocytes producteurs d'anticorps. Les lymphocytes B matures sont caractérisés par l'expression de CD45R et CD19 et régulent la réponse immunitaire à travers la production d'anticorps et de cytokines, et la présentation d'antigènes. Des études d'histopathologie montrent que des anticorps spécifiques pour MBP, PLP et MOG sont associés à la démyélinisation en SEP et EAE (Cheng et al. 2017; Fan et al. 2015). Les lymphocytes B activés peuvent sécréter des cytokines qui influencent la prolifération des lymphocytes T chez les patients SEP. Plus particulièrement, les lymphocytes B des patients SEP et des souris EAE sécrètent plus d'IL-6, et des souris déficientes pour cette cytokine présentent des symptômes d'EAE moins sévères (Barr et al. 2012).

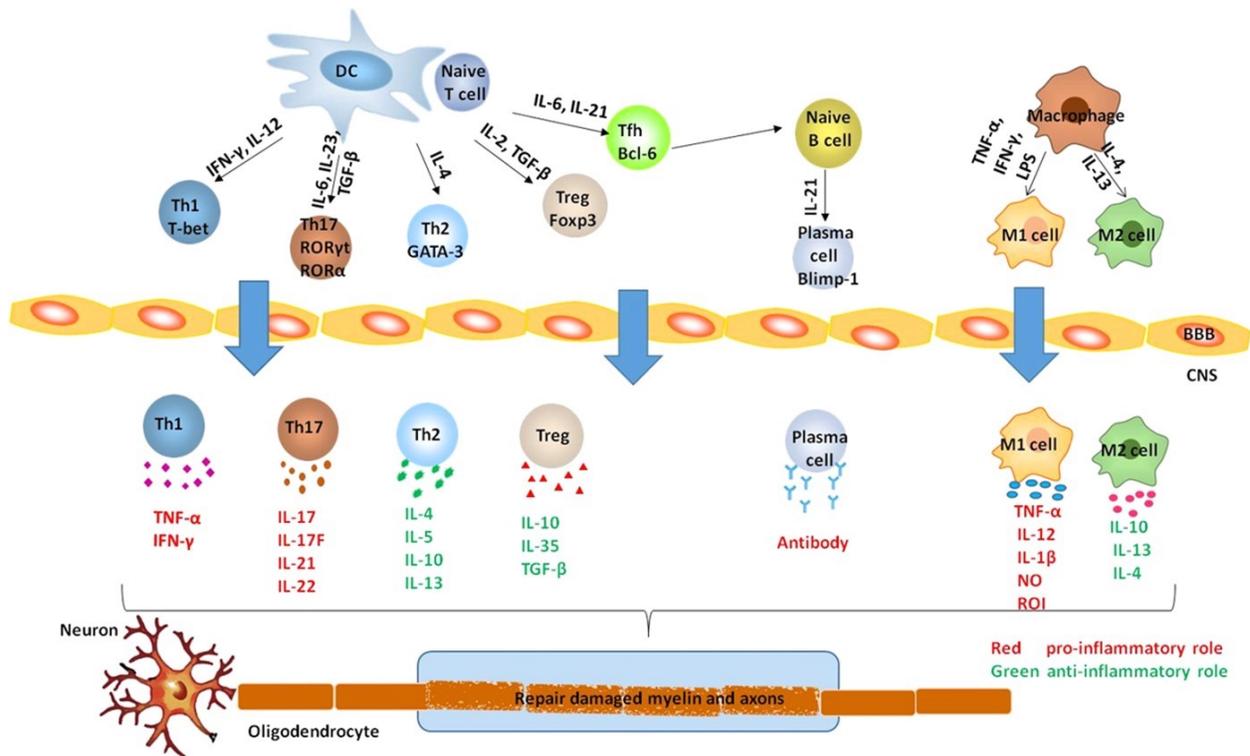


Figure 5. – Populations de cellules immunitaires impliquées en SEP et EAE

Dans le système immunitaire périphérique, les lymphocytes T naïfs se différencient en lymphocytes T CD4 effecteurs (TH1, TH17 et TH2), régulateurs ou folliculaires contribuant au développement des cellules B en plasmocytes producteurs d'anticorps. Les lymphocytes et macrophages traversent la BHE et exercent des actions anti ou pro inflammatoires dans le SNC. Figure modifiée et utilisée avec permission (Cheng et al. 2017).

3. La restriction diététique en méthionine

3.1 La méthionine

La méthionine est un acide aminé essentiel fourni par l'alimentation. Les aliments les plus riches en méthionine sont les œufs, les fruits de mer et la viande, tandis que les légumes, les fruits et les légumineuses contiennent les plus faibles quantités. Les produits laitiers et animaux possèdent des niveaux variables de méthionine, par exemple le fromage à la crème et la viande maigre en contiennent plus que le yaourt grec et le bœuf haché. La diète dite américaine ou western contient en général l'apport le plus élevé en méthionine. Un régime végétalien est plus efficace pour limiter l'apport en méthionine alimentaire qu'un régime végétarien, qui ne limite pas la consommation de produits animaux riches en méthionine tels que les produits laitiers et les œufs. Les régimes alimentaires qui sont en général faibles en méthionine comprennent le régime végétalien, les diètes cétogène, DASH (*Dietary Approaches to Stopping Hypertension*), USDA (*US Department of Agriculture*), et japonaise, qui reposent sur la consommation de gras et de glucides comme principale source d'énergie plutôt que de protéines (Sanderson et al. 2019).

La méthionine est catabolisée et recyclée dans une série de réactions métaboliques connue sous le terme de cycle de la méthionine (figure 6). La méthionine est convertie en SAM (*S-adenosyl-methionine*) par l'enzyme Mat2a (*methionine adenosyltransferase 2A*). SAM est le donneur méthyl universel, à son tour converti en SAH (*S-adenosyl-homocysteine*) après transfert de son groupe méthyl pour les réactions de méthylation. SAH est ensuite hydrolysé pour générer de l'homocystéine qui est convertie en cystéine à travers la voie de transsulfuration permettant de synthétiser du glutathion, ou en méthionine après transfert d'un groupe méthyl provenant du cycle du folate. Alternativement, la méthionine peut être recyclée à partir de SAM qui est converti en MTA (*methylthioadenosine*) dans le cycle de récupération de la méthionine. Les cycles de la méthionine et du folate sont étroitement liés et forment les deux composantes majeures du métabolisme du carbone, intégrant des unités de carbone nutritionnel dans un ensemble diversifié de processus cellulaires (Sanderson et al. 2019).

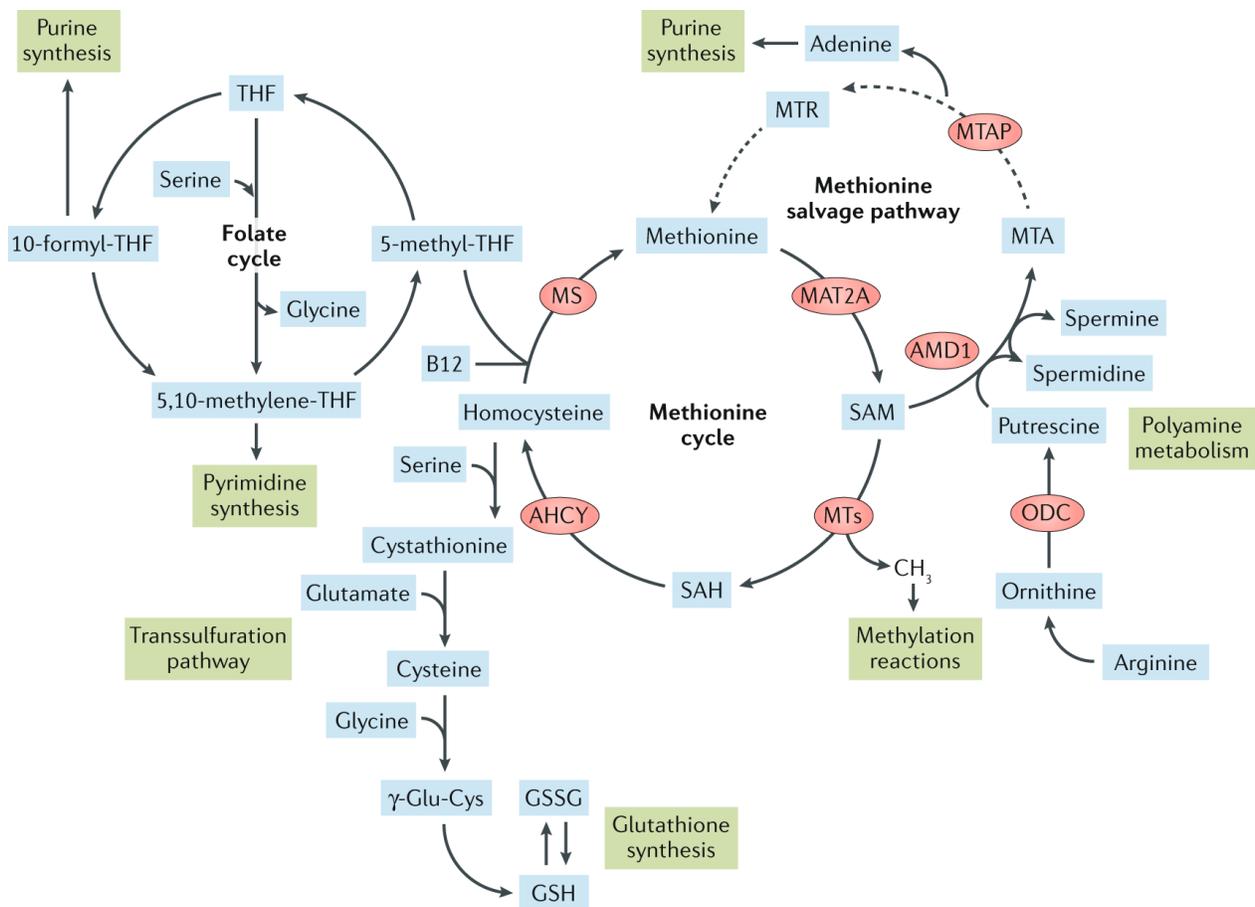


Figure 6. – Métabolisme de la méthionine et processus métaboliques liés

La méthionine est catabolisée par l'enzyme Mat2a, afin de produire SAM, le donneur méthyl universel. Après réaction de méthylation, SAM est transformé en SAH qui est converti en homocystéine pouvant être reconvertie en méthionine, complétant ainsi le cycle de la méthionine, notamment lié au cycle du folate et à la voie de transsulfuration. Figure utilisée avec permission (Sanderson et al. 2019).

La méthionine est l'unique source permettant de générer SAM, le donneur méthyl universel, substrat nécessaire pour les réactions de méthylation. SAM contribue aussi à la biosynthèse de polyamines, comme la spermine, qui maintiennent la stabilité des protéines, de l'ADN et de l'ARN, protègent contre le stress oxydatif et régulent l'activité des canaux ioniques. À part sa contribution aux réactions dépendantes de SAM, la méthionine joue un rôle dans les processus

d'autophagie, la synthèse protéique, et dans des voies métaboliques régulant la biosynthèse nucléotidique et le stress oxydatif cellulaire. La méthionine fournit de l'homocystéine, substrat dans la voie de transsulfuration produisant ultimement l'antioxydant glutathion (Sanderson et al. 2019).

3.2 Restreindre la méthionine dans l'organisme

La restriction calorique prolonge la durée de vie de plusieurs espèces animales, et retarde de nombreux aspects liés au vieillissement comme la sénescence immunitaire, le cancer, l'expression génique aberrante, les dommages causés à l'ADN, et la résistance à l'insuline. Il a ensuite été découvert que la restriction protéique et plus spécifiquement encore la restriction diététique en méthionine (MR) prolonge également la durée de vie, et mime les bénéfices de la restriction calorique, même si les animaux sur la MR consomment plus de nourriture par rapport à ceux sur la diète contrôle (Hoffman 2019). Plus particulièrement, il a été montré que la MR prolonge la durée de vie des levures, drosophiles, *Caenorhabditis elegans*, souris et rats (Cabreiro et al. 2013; Lee et al. 2014; Miller et al. 2005; Orentreich et al. 1993; Ruckenstuhl et al. 2014; Sun et al. 2009).

La MR est associée à une réduction des graisses viscérales, du poids corporel et de l'adiposité, ainsi qu'une augmentation de la dépense énergétique. Cette diète atténue l'augmentation liée à l'âge des taux d'insuline basale, de glucose, de cholestérol, et de triglycérides. En outre, la MR induit une réduction des niveaux de leptine, positivement corrélée avec le poids corporel et la masse grasseuse, et une augmentation de l'expression de FGF21 (*fibroblast growth factor 21*), un régulateur métabolique améliorant la sensibilité à l'insuline et l'homéostasie du glucose, et diminuant la synthèse de triglycérides et l'adiposité. La MR permet d'augmenter la résistance au stress oxydatif avec une diminution de la génération mitochondriale d'espèces réactives de l'oxygène, et des dommages oxydatifs (Caro et al. 2008; Hasek et al. 2010; Perrone et al. 2013; Malloy et al. 2006).

La MR est également associée à une amélioration de la fonction du foie dans un modèle murin de stéatose hépatique, et des symptômes de troubles intestinaux inflammatoires dans un modèle murin de colite (Liu et al. 2017; Malloy et al. 2013). La MR inhibe la croissance tumorale et

sensibilise la réponse à la chimiothérapie dans des modèles de cancer colorectal (Gao et al. 2019). De plus, ce régime alimentaire prévient les complications induites par un régime riche en graisses notamment l'accumulation de graisses, la diminution de la sensibilité à l'insuline, le stress oxydatif et l'augmentation du poids corporel, des niveaux sanguins de glucose, et de l'inflammation (Yang et al. 2019). Des études montrent que des souris C57BL/6 et NZO (un modèle murin d'obésité et de diabète de type 2) sous la MR et un régime riche en graisses sont respectivement protégées de l'obésité et du diabète (Ables et al. 2012; Castano-Martinez et al. 2019).

Bien que l'absence complète d'apport en méthionine soit dommageable, la MR est réalisable chez l'humain et n'a pas d'effet secondaire négatif chez l'adulte (Hoffman 2019). Chez des individus en santé, une restriction journalière d'environ 2,92 milligrammes de méthionine par kilogrammes pendant 3 semaines et représentant une réduction de 83% de l'apport en méthionine par rapport au régime de base, est associée à une réduction des niveaux circulants de méthionine. (Gao et al. 2019). La MR peut se prouver efficace chez l'humain dans un contexte pathologique, chez des sujets obèses rencontrant les critères de syndrome métabolique, une restriction de 2 milligrammes de méthionine par kilogrammes de poids corporel par jour pendant 16 semaines induit une augmentation de l'oxydation des graisses, et une diminution de la teneur en lipides hépatiques (Plaisance et al. 2011).

La méthionine est importante pour les réactions de méthylation, étant l'unique source permettant de générer SAM, le donneur méthyl universel. La disponibilité de la méthionine peut réguler l'expression génique à travers la méthylation des histones. En effet, la restriction en méthionine in vitro, dans une lignée cellulaire de cancer du côlon humain, réduit la triméthylation aux 4^{ème}, 9^{ème}, et 27^{ème} résidu lysine de la protéine histone H3 (Mentch et al. 2015). De plus, une analyse transcriptomique du blanc adipeux et du foie suggère que la MR chez le rat est associée à une régulation à la baisse des voies de signalisation immunitaires et pro-inflammatoires (Ghosh et al. 2014).

Hypothèse et objectifs

Notre collaborateur Dr. Russell Jones (institut Van Andel et McGill) a récemment démontré que le métabolisme de la méthionine est induit lorsque les lymphocytes T sont activés, et que ceux-ci utilisent la méthionine exogène pour synthétiser SAM. In vitro, la restriction en méthionine réduit la tri-méthylation au 4^{ème} résidu lysine de la protéine histone H3 (H3K4me3), qui indique généralement une transcription active. Elle limite les marques de méthylation permissives H3K4me3 sur les régions promotrices des gènes impliqués dans la prolifération cellulaire et la production de cytokine des cellules TH17. De plus, l'inhibition de Mat2a dans des lymphocytes T CD4 en différenciation réduit le nombre de lymphocytes TH1 et TH17 (Roy et al. 2020).

Basée sur l'impact in vitro de la restriction en méthionine, l'hypothèse est que la manipulation du métabolisme des lymphocytes T via la restriction diététique en méthionine représente une nouvelle voie thérapeutique pour contrôler les maladies neuroinflammatoires telles que la SEP.

Afin de tester cette hypothèse, nous avons rempli les objectifs suivants:

- Caractériser l'impact in vivo de la disponibilité de la méthionine sur le profil et l'activation immunitaire dans le modèle animal d'EAE active avec les souris C57BL/6.
- Évaluer l'impact in vivo de l'inhibition de Mat2a dans les lymphocytes T CD4 avec un modèle d'EAE passive.
- Évaluer l'influence de la restriction diététique en méthionine sur le microbiome intestinal.

Matériel et méthodes

1. Diètes expérimentales

Les diètes contrôle et réduite en méthionine proviennent de chez Research Diets (New Brunswick, NJ) et sont irradiées. La diète contrôle est la L-Amino Acid Rodent Diet avec 10 kcal% gras et 0,86% de méthionine et la diète réduite en méthionine est la L-Amino Acid Rodent Diet avec 10 kcal% gras et 0,12% de méthionine. Les deux diètes sont isocaloriques et leur composition est détaillée dans le tableau ci-dessous.

Product #	10% fat, 0.12% M		10% fat, 0.86% M	
	gm%	kcal%	gm%	kcal%
Protein	13	14	13	14
Carbohydrate	74	76	74	76
Fat	4	10	4	10
Total		100		100
kcal/gm		3.9		3.9
Ingredient (gm)	gm	kcal	gm	kcal
L-Arginine	11.2	45	11.2	45
L-Histidine-HCl-H2O	3.3	13	3.3	13
L-Isoleucine	8.2	33	8.2	33
L-Leucine	11.1	44	11.1	44
L-Lysine	14.4	58	14.4	58
DL-Methionine	1.2	5	8.6	34
L-Phenylalanine	11.6	46	11.6	46
L-Threonine	8.2	33	8.2	33
L-Tryptophan	1.8	7	1.8	7
L-Valine	8.2	33	8.2	33
L-Glutamic Acid	34.4	138	27	108
Glycine	23.3	93	23.3	93
Corn Starch	424.5	1698	424.5	1698
Maltodextrin	125	500	125	500
Dextrose	50	200	50	200
Sucrose	150	600	150	600
Cellulose	50	0	50	0
Lard	0	0	0	0
Corn Oil	46	414	46	414
Mineral Mix S10001	35	0	35	0
Vitamin Mix V10001	10	40	10	40
Choline Bitartrate	2	0	2	0
Red Dye, FD&C #40	0	0	0.025	0
Yellow Dye, FD&C #5	0.05	0	0	0
Blue Dye, FD&C #1	0	0	0.025	0
Total	1029.45	4000	1029.45	4000

Tableau 1. – Composition détaillée des diètes contrôle et réduite en méthionine

La diète contrôle est la L-Amino Acid Rodent Diet avec 10 kcal% gras et 0,86% de méthionine et la diète réduite en méthionine est la L-Amino Acid Rodent Diet avec 10 kcal% gras et 0,12% de méthionine.

2. Animaux

Tous les animaux sont maintenus dans une salle niveau barrière avec un cycle 12h/12h lumière/noirceur. Les souris ont accès aux diètes et à l'eau ad libitum. Pour les expériences d'EAE active, les souris utilisées sont des femelles C57BL/6 (Jackson Laboratory) âgées de 6-7 semaines au début des expériences. Pour les expériences d'EAE passive, les souris donneuses sont des mâles transgéniques 2D2 TCR^{MOG} (C57BL/6-Tg(Tcra2D2,Tcrb2D2)1Kuch/J). Ces souris expriment un récepteur de cellule T spécifique pour le MOG₃₅₋₅₅. Les souris receveuses sont des Rag2^{-/-} (B6(Cg)-Rag2 < tm1.1Cgn > /J) de 7-10 semaines d'âge (Jackson Laboratory). Ces souris n'ont pas de lymphocytes T et B endogènes.

Toutes les procédures effectuées avec les souris sont conformes aux directives du Conseil Canadien de Protection des Animaux et approuvées par le Comité de Protection des Animaux de l'Université de Montréal (N17012CLs).

3. EAE active et suivi clinique

Les femelles C57BL/6 sont nourries soit de la diète contrôle soit de la diète réduite en méthionine durant deux semaines avant l'induction de l'EAE, et sont maintenues sur leur diète durant toute la durée de l'expérience. Pour induire l'EAE active, les souris sont immunisées avec une injection sous-cutanée de 200µg de MOG₃₅₋₅₅ (Alpha Diagnostic International) contenu dans une solution à 4mg/ml de *Mycobacterium tuberculosis* inactivé (Becton Dickinson) dilué dans de l'IFA (Incomplete Freund Adjuvant) (Fisher Scientific). Elles reçoivent une injection intrapéritonéale de 400ng de toxine pertussique (List Biological Laboratories) deux jours après l'immunisation. Les souris sont pesées et observées tous les jours pour évaluer l'apparition et l'évolution des symptômes moteurs. L'hydratation par injection sous-cutanée de salin (600-800µl) et la vidange manuelle de la vessie sont effectuées une à deux fois par jour pour toutes les souris avec paralysie des membres inférieurs. Le score clinique suit l'échelle suivante (tableau 2).

Score clinique	Symptômes
0	Aucun
1,0	Queue flasque
2,0	Réflexe de redressement lent
3,0	Paralysie d'un membre inférieur ou paralysie partielle (50%) des deux membres postérieurs
4,0	Paralysie des deux membres postérieurs
5,0	Moribond (sacrifice requis)

Tableau 2. – Échelle de score clinique d'EAE

4. EAE passive

Après sacrifice par injection d'euthanyl, et extraction de la rate et des ganglions lymphatiques inguinaux et sous-axillaires, les cellules immunitaires des souris 2D2 TCR^{MOG} sont isolées. Selon les instructions du fabricant, les lymphocytes T CD4 sont ensuite isolés magnétiquement (sélection positive, Miltenyi). Les lymphocytes T CD4 isolés sont resuspendus à 3 millions de cellules/mL de milieu (RPMI supplémenté avec sérum bovin 10%, glutamax, pénicilline et streptomycine). Les lymphocytes T CD4 sont activés en les répartissant dans des plaques préalablement enduites de 2µg/mL d'anti-CD3/anti-CD28 (BioXCell). Les cytokines suivantes sont ajoutées au milieu pour favoriser une polarisation TH17 : TGF-β (3ng/mL, Peprotech), IL-6 (20ng/mL, Peprotech), IL-23 (20ng/mL, R&D Systems) et anti-IFN-γ (10µg/mL, eBioscience). Après 16 à 24h d'activation, du polybrène (8µg/mL, Sigma-Aldrich) est ajouté et les lymphocytes T sont infectés par centrifugation à 1 500 x g pendant 90mn à 32°C, et du milieu frais contenant du TGF-β, IL-6, IL-23 et anti-IFN-γ est par la suite ajouté. Le lendemain, les lymphocytes T sont transférés dans des plaques non enduites et du milieu frais contenant de l'IL-2 (5ng/mL, Peprotech) est ajouté à la culture. Le cinquième jour, selon les instructions du fabricant, les cellules vivantes sont isolées en utilisant un kit d'élimination des cellules mortes (Miltenyi). Brièvement, les cellules sont centrifugées à 421 x g pendant 7mn, et les culots sont resuspendus avec des billes Dead Cell Removal. Les cellules sont incubées avec les billes pendant 15mn à température pièce, avant de

les passer à travers une colonne. Les cellules mortes restent magnétiquement attachées dans la colonne, et les cellules vivantes représentent la fraction collectée qui passe à travers la colonne. Les cellules vivantes sont comptées et suspendues dans du HBSS 1X (*Hank's Balanced Salt Solution*) stérile avant l'injection intraveineuse de 10 millions de lymphocytes T CD4 aux souris Rag2^{-/-}. Deux jours plus tard, elles reçoivent une injection intrapéritonéale de 200ng de toxine pertussique. Les souris sont observées tous les jours pour évaluer l'apparition et l'évolution des symptômes moteurs. L'hydratation par injection sous-cutanée de salin (600-800µl) et la vidange manuelle de la vessie sont effectuées une à deux fois par jour pour toutes les souris avec paralysie des membres inférieurs. Le score clinique suit l'échelle suivante (tableau 2).

5. Isolation des cellules immunitaires murines

Les souris représentatives de leur groupe (nombre de jours depuis le début des symptômes et scores cliniques représentatifs de la médiane) sont sacrifiées à différentes phases post-immunisation : présymptomatique (autour du jour 7 post-immunisation), début (autour du jour 10 post-immunisation) et pic (autour du jour 14-15 post-immunisation) des symptômes. Après perfusion intracardiaque avec du PBS 1X (*Phosphate Buffered Saline*), la rate, les ganglions lymphatiques inguinaux et le SNC (cerveau et moelle épinière) sont récupérés et les cellules immunitaires de ces organes sont isolées tel que décrit ici-bas. Les cellules sont finalement comptées à l'hémacytomètre après dilution dans du trypan bleu.

4.1. Rate

La rate est mise sur glace dans du milieu RPMI-1640 (Wisent) supplémenté avec pénicilline (Invitrogen), streptomycine (Invitrogen) et glutamax (Thermofisher scientific) avant d'être écrasée et passée à travers un filtre de 70µm à l'aide d'un piston. Les homogénats sont centrifugés à 1200 RPM pendant 10mn. Le culot est suspendu dans 0,83% de chlorure d'ammonium et incubé pendant 4mn sous agitation. Par la suite, 10mL du milieu RPMI-1640 est ajouté aux tubes et les échantillons sont centrifugés à 1200 RPM pendant 10mn. Le culot est

resuspendu dans du RPMI-1640 est passé à nouveau à travers un filtre de 70µm. Après une centrifugation à 1200 RPM pendant 10mn, les cellules sont conservées dans du RPMI-1640 contenant 10% de sérum fœtal bovin (FBS).

4.2. Ganglions lymphatiques

Les ganglions lymphatiques sont mis sur glace dans du milieu RPMI-1640 avant d'être écrasés et passés à travers un filtre de 70µm à l'aide d'un piston. Les homogénats sont centrifugés à 1200 RPM pendant 10mn. Les cellules sont resuspendues et conservées dans du RPMI-1640 contenant 10% de FBS.

4.3. Système nerveux central

Le cerveau et la moelle épinière sont mis sur glace dans du milieu Hibernate (Life Technologies) avant d'être hachés très finement au scalpel et digérés dans du milieu HBSS 1X contenant 2mg/mL de collagénase D (Roche Diagnostic) et 14µg/mL de DNase grade I (Roche Diagnostic), pendant 15mn sous agitation dans un bain marie à 37°C. Les tissus digérés sont passés à travers un filtre de 70µm à l'aide d'un piston puis les homogénats sont centrifugés à 421 x g pendant 7mn. Le culot est resuspendu dans du Percoll à 37% (VWR International) et les échantillons sont centrifugés à 500 x g sans freinage pendant 10mn. Après aspiration de la couche de myéline, le culot est lavé deux fois avec du HBSS 1X. Les cellules sont conservées dans du milieu RPMI-1640 contenant 10% de FBS.

6. Marquages pour cytométrie en flux

Les cellules immunitaires isolées sont ensuite utilisées pour des marquages extracellulaires et intracellulaires pour analyse par cytométrie en flux. Un cytomètre BD LSRII est utilisé pour l'acquisition, les compensations sont ajustées à l'aide du logiciel Diva (BD Biosciences), et les résultats sont analysés à l'aide du logiciel FlowJo.

5.1. Marquage extracellulaire

Sauf indication contraire, le marquage est effectué à 4°C dans des plaques 96 puits en V protégées contre la lumière. Pour marquer les cellules mortes, les cellules sont incubées avec du LIVE/DEAD AmCyan (Invitrogen) pendant 30mn dans du PBS 1X. Elles sont ensuite lavées avec du tampon de cytométrie en flux puis centrifugées à 1600 RPM pendant 7mn. Les cellules sont incubées avec du bloquant CD16/CD32 (BD Biosciences) pendant 10mn puis durant 20mn avec les mélanges d'anticorps (tableau 3). Elles sont lavées avec du tampon de cytométrie en flux puis centrifugées à 1600 RPM pendant 7mn. Les cellules sont transférées dans des tubes appropriés et conservées dans du tampon de cytométrie en flux avant l'acquisition.

5.2. Marquage intracellulaire

Les cellules immunitaires sont, dans un premier temps, activées pendant 4,5h avec 1µg/mL d'ionomycine (Sigma-Aldrich) et 20ng/mL de phorbol 12-myristate 13-acétate (PMA, Sigma-Aldrich) en présence de 2µg/mL de brefeldine A (Sigma-Aldrich). La première partie du marquage est réalisée telle que décrite à la section précédente. Les cellules sont ensuite fixées/perméabilisées pendant 30mn puis lavées en utilisant un kit Cytofix/Cytoperm (BD Biosciences). Après lavage, les cellules sont incubées avec du bloquant CD16/CD32 (BD Biosciences) pendant 10mn puis durant 45mn avec les mélanges d'anticorps (GM-CSF, TNF α , IL17A, IFN- γ (BD Biosciences)). Elles sont lavées avec du tampon de cytométrie en flux puis centrifugées à 1600 RPM pendant 7mn. Les cellules sont transférées dans des tubes appropriés et conservées dans du tampon de cytométrie en flux avant l'acquisition.

CD45 (BD Biosciences)	VLA-4/CD49d (eBiosciences)
CD11b (BD Biosciences)	CD6 (eBiosciences)
CD3 (BD Biosciences)	CXCR3/CD183 (eBiosciences)
F4/80 (Biolegend)	ICAM-1/CD54 (Biolegend)
Ly6G (BD Biosciences)	CD44 (BD Biosciences)
CD8 (BD Biosciences)	CCR6/CD196 (BD Biosciences)
CD4 (BD Biosciences)	MCAM/CD146 (Biolegend)
CD11c (BD Biosciences)	B220/CD45R (BD Biosciences)

Tableau 3. – Anticorps pour marquage extracellulaire

7. Séquençage et analyse de l'ARN ribosomal 16S

En collaboration avec l'équipe du Dr Bertrand Routy (CRCHUM), l'ADN génomique est extrait des échantillons de matière fécale en utilisant le NucleoSpin DNA fecal kit (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG) et immédiatement conservé à -80°C. Afin d'évaluer la composition microbienne des échantillons de matière fécale, l'ADN isolé est analysé en utilisant la séquence du gène d'ARN ribosomal (ARNr) 16S, et la région variable V3-V4 est amplifiée par PCR. Les produits de la PCR sont purifiés avec des billes magnétiques (AxyPrep Mag PCR Clean up kit, Axygen Biosciences), et les amplifications sont contrôlées sur un Bioanalyseur 2100 (Agilent Technologies). Les échantillons sont mis en commun à un ratio équimolaire, purifiés comme décrit plus haut et la qualité est vérifiée sur un Bioanalyseur 2100. Les échantillons sont quantifiés à l'aide de picogreen (Life Technologies) et chargés sur le système MiSeq (Illumina). Le séquençage à haut-débit est effectué à l'IBIS (Institut de Biologie Intégrative et des Systèmes de l'Université Laval). Le traitement et l'analyse du séquençage est performé à l'aide de R. Le paquet DADA2R est utilisé pour générer des ASV (amplicon sequence variants) pour chaque échantillon à partir des séquences brutes. Les séquences sont fusionnées en extrémités appariées de 260 bases par lecture sens et 220 bases par lecture anti-sens. L'attribution taxonomique est effectuée avec la base de données SILVA. Les séquences résiduelles d'Archées et d'Eucaryotes sont retirées. Les analyses sont réalisées jusqu'au niveau du genre grâce au paquet phyloseq. La distance Bray-

Curtis est utilisée en tant que mesure de la diversité bêta et représentée sur une échelle multidimensionnelle (NMDS).

8. Analyses statistiques

Les figures sont réalisées avec les logiciels GraphPad PRISM 8, R et FlowJo. Les tests statistiques sont effectués avec le logiciel GraphPad PRISM 8 et R. Les analyses statistiques effectuées, après vérification de la distribution normale, sont détaillées pour chaque expérience en légende des figures. Pour les courbes de score clinique et de survie, les analyses statistiques effectuées sont respectivement des two-way mixed-effects ANOVA avec comparaisons multiples et tests Mantel-Cox. Pour les résultats de cytométrie en flux, les analyses statistiques effectuées sont des tests de Kruskal-Wallis, Mann-Whitney, ou t de Student non pairés lorsqu'appropriés. Pour les résultats du séquençage d'ARNr 16S, le test PERMANOVA est utilisé pour déterminer les différences significatives entre les groupes pour l'analyse de la diversité bêta, et DESeq2 est utilisé pour l'analyse différentielle d'abondance à tous les niveaux taxonomiques en corrigeant les valeurs de p avec la procédure Benjamin-Hochberg. La signification statistique est indiquée dans les figures par les annotations suivantes: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

Résultats

1. La restriction alimentaire en méthionine influence l'apparition et l'évolution des symptômes d'EAE active

L'impact de la restriction diététique en méthionine sur les niveaux de méthionine et de ses métabolites dans le sérum et le foie des souris C57BL/6 (figure 7) a tout d'abord été confirmé par chromatographie en phase liquide-spectrométrie de masse (LC-MS) par l'équipe de notre collaborateur (Roy et al. 2020).

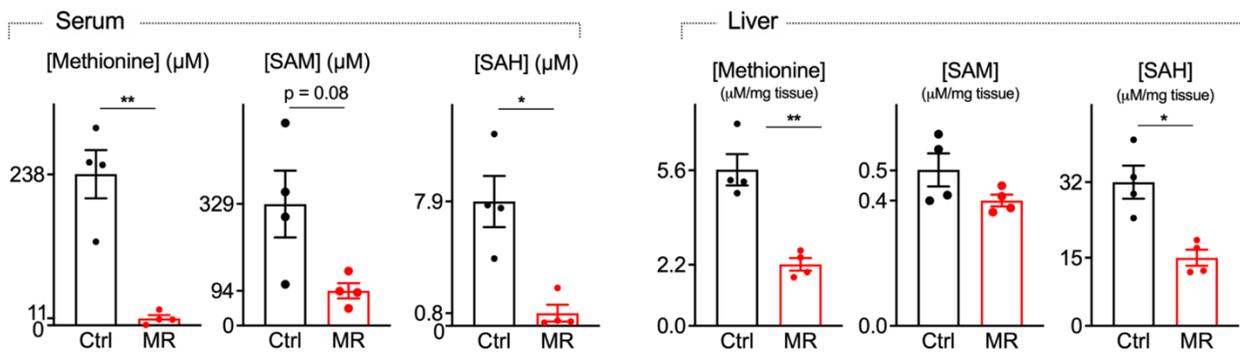


Figure 7. – Niveaux de méthionine, SAM et SAH en fonction de la prise alimentaire en méthionine

Concentration de méthionine, SAM, et SAH dans le sérum et dans le foie des souris C57BL/6 maintenues pendant deux semaines sur une diète contrôle (Ctrl) ou réduite en méthionine (MR). Les résultats représentent la moyenne \pm SEM. Chaque point représente une souris, n=4. Figure utilisée avec permission (Roy et al. 2020).

La restriction en méthionine est associée à une amélioration du profil inflammatoire en périphérie (Ghosh et al. 2014; Wanders et al. 2014). Afin de déterminer si elle peut entraîner des effets bénéfiques en condition neuroinflammatoire comme la SEP, son impact a tout d'abord été évalué cliniquement dans le modèle animal le plus commun de la SEP soit l'EAE active. Les souris sont donc exposées pendant 2 semaines à la diète expérimentale contrôle (MC) ou réduite en méthionine (MR) avant l'induction de l'EAE, et maintenues sur cette diète tout au long de

l'expérience (figure 8). Le suivi clinique quotidien permet de démontrer que la diète MR est associée à un délai significatif de l'apparition des symptômes moteurs par rapport aux souris sur la MC (figure 9A). En effet, alors que les premiers symptômes (onset) apparaissent autour du jour 9 post-immunisation chez les souris sur la MC, le début des symptômes chez les souris sur la MR a lieu autour du jour 13 post-immunisation. De plus, entre les jours 11 et 17 post-immunisation, les scores cliniques sont significativement moins élevés pour le groupe MR (figure 9A). Ceci indique que les souris sur la MR ont en moyenne des symptômes moteurs moins sévères par rapport aux souris sur la MC entre les jours 11 et 17 post-induction de l'EAE active. Enfin, le pourcentage de souris asymptomatiques étant significativement différent dans le groupe MR en comparaison au groupe MC (figure 9B), la MR influence l'incidence des symptômes.

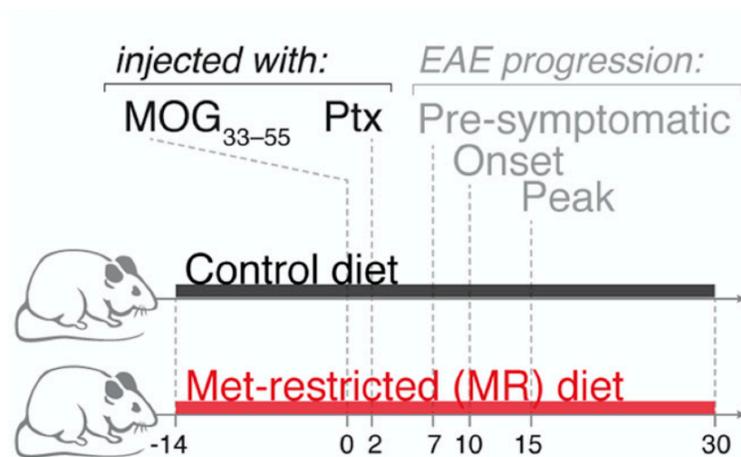


Figure 8. – Méthodologie expérimentale pour l'EAE active

Les souris sont exposées pendant 2 semaines à la diète contrôle ou réduite en méthionine avant l'induction de l'EAE. Les souris représentatives de leur groupe sont choisies pour des analyses par cytométrie en flux à jours 7, 10-13, et 14-15 post-immunisation correspondant respectivement aux phases présymptomatique, onset/début des symptômes, et pic des symptômes. Figure utilisée avec permission (Roy et al. 2020).

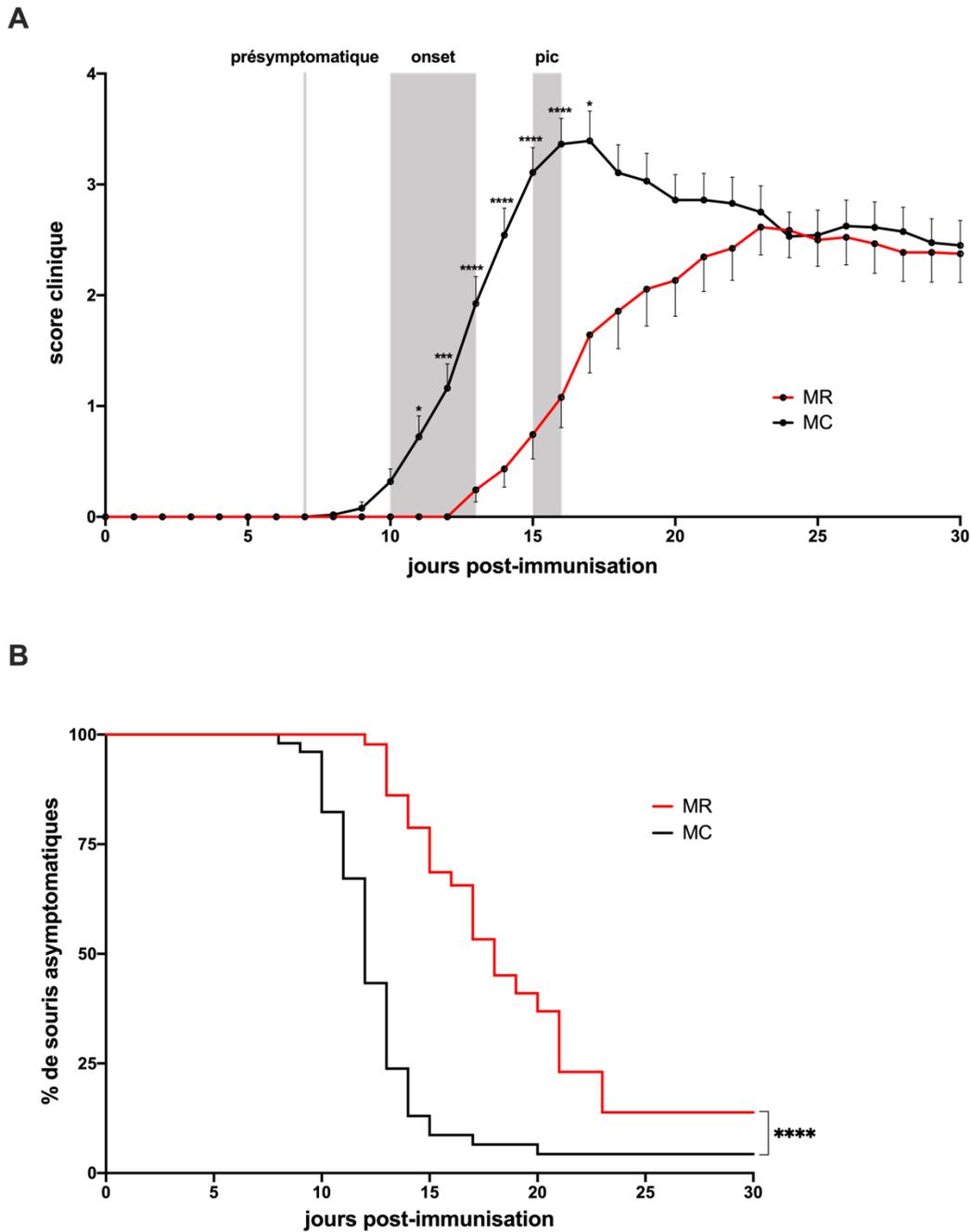


Figure 9. – Comparaison clinique de l'EAE active entre les groupes MC et MR

(A) Courbes cliniques et (B) proportion de souris asymptomatiques en EAE active avec des femelles C57BL/6 immunisées avec du MOG₃₅₋₅₅ et maintenues sous une diète contrôle (MC) ou une diète réduite en méthionine (MR). Les résultats représentent 63 souris par groupe et regroupent 6 expériences indépendantes. Les analyses statistiques effectuées sont un two-way mixed-effects ANOVA avec comparaisons multiples (A) et un test Mantel-Cox (B).

2. La restriction alimentaire en méthionine influence le profil immunitaire en périphérie et l'infiltration centrale de cellules immunitaires

L'EAE active est une maladie auto-immune où l'infiltration de cellules immunitaires activées au sein du système nerveux central (SNC) entraîne des lésions inflammatoires responsables de l'apparition de déficits neurologiques. Puisque nous avons démontré que la MR est associée à une amélioration clinique de l'EAE active, l'impact de la MR sur l'activation et l'expansion leucocytaire dans les organes lymphoïdes secondaires (rate et ganglions lymphatiques) et l'infiltration leucocytaire dans le SNC a été caractérisé. Pour répondre à cet objectif, les cellules immunitaires provenant de la rate, des ganglions lymphatiques (GL) inguinaux et du SNC sont analysées à différentes périodes post-immunisation par cytométrie en flux. Les souris représentatives de leur groupe sont choisies à jour 7 post-immunisation, entre jour 10 et 13 post-immunisation, et entre jour 15 et 16 post-immunisation correspondant respectivement aux phases présymptomatique, onset/début des symptômes, et pic des symptômes (figures 8 et 9).

2.1. Impact de la restriction alimentaire en méthionine sur le profil immunitaire en périphérie (rate et ganglions lymphatiques)

Un exemple de stratégie de *gating* en cytométrie en flux des populations immunitaires dans la rate et les GL est fourni dans la figure 10.

Durant la phase présymptomatique (PRE), le nombre absolu total de cellules immunitaires CD45 est significativement réduit dans la rate des souris sous la MR (figure 11). Cette réduction dans le groupe MR par rapport au groupe MC est principalement attribuable à une réduction des populations lymphocytaires, dont les CD3 (lymphocytes T), CD4 (lymphocytes T CD4), CD8 (lymphocytes T CD8) et CD45R (principalement lymphocytes B). Au contraire, les populations myéloïdes CD11b ne montrent pas de différences significatives, et leur expression des marqueurs F4/80 (macrophages), Ly6G (neutrophiles) et CD11c (cellules dendritiques) est similaire chez les souris exposées à la diète MR et à la diète MC (figure 11).

Durant la phase de début des symptômes (ONS), le nombre absolu total de cellules immunitaires CD45 ne diffère plus entre les deux groupes au niveau de la rate (figure 11). Les populations lymphocytaires et myéloïdes ne présentent pas de différences significatives au niveau de la rate (figure 11) à l'apparition des symptômes dans le groupe MC par rapport au groupe MR.

Durant la phase de pic des symptômes (PIC), le nombre global de cellules immunitaires CD45 ne diffère pas significativement entre les deux groupes (figure 11) dans la rate. Les populations lymphocytaires et myéloïdes ne présentent pas de différences significatives au niveau de la rate (figure 11) lorsque les souris du groupe MC sont au pic des symptômes et les souris du groupe MR développent finalement des symptômes.

Ces observations sur le profil immunitaire en termes de nombres absolus dans la rate des souris sur les diètes MC ou MR (figure 11) se reflètent également au niveau des proportions des populations générales de cellules immunitaires CD4, CD8, CD45R et CD11b (figure 12). Au stade présymptomatique, les cellules myéloïdes CD11b sont présentes en proportion plus élevée dans la rate des souris du groupe MR, tandis que les populations lymphocytaires CD4, CD8 et CD45R sont proportionnellement plus élevées dans la rate des souris du groupe MC (figure 12). Cette distinction s'estompe durant les phases d'apparition et pic des symptômes d'EAE (figure 12).

Enfin, quel que soit la période post-immunisation, aucune différence significative n'est globalement observée dans les nombres absolus ou proportions des différentes populations leucocytaires dans les GL drainants (inguinaux) (figures 13 et 14). Les nombres absolus des populations CD3, F4/80, Ly6G et CD11c dans les GL ne sont pas disponibles au stade présymptomatique de l'EAE car un des deux marquages extracellulaires utilisés pour la cytométrie en flux n'a pas fonctionné pour des raisons techniques. Exceptionnellement, au stade présymptomatique, les nombres absolus des populations CD4 et CD8 sont calculés à partir de la population négative pour CD45R ($CD45^{high}CD11b^{-}CD45R^{-}$) et non la population positive pour CD3 ($CD45^{high}CD11b^{-}CD3^{+}$), ces deux populations représentent des populations lymphocytaires sans lymphocytes B (figure 10).

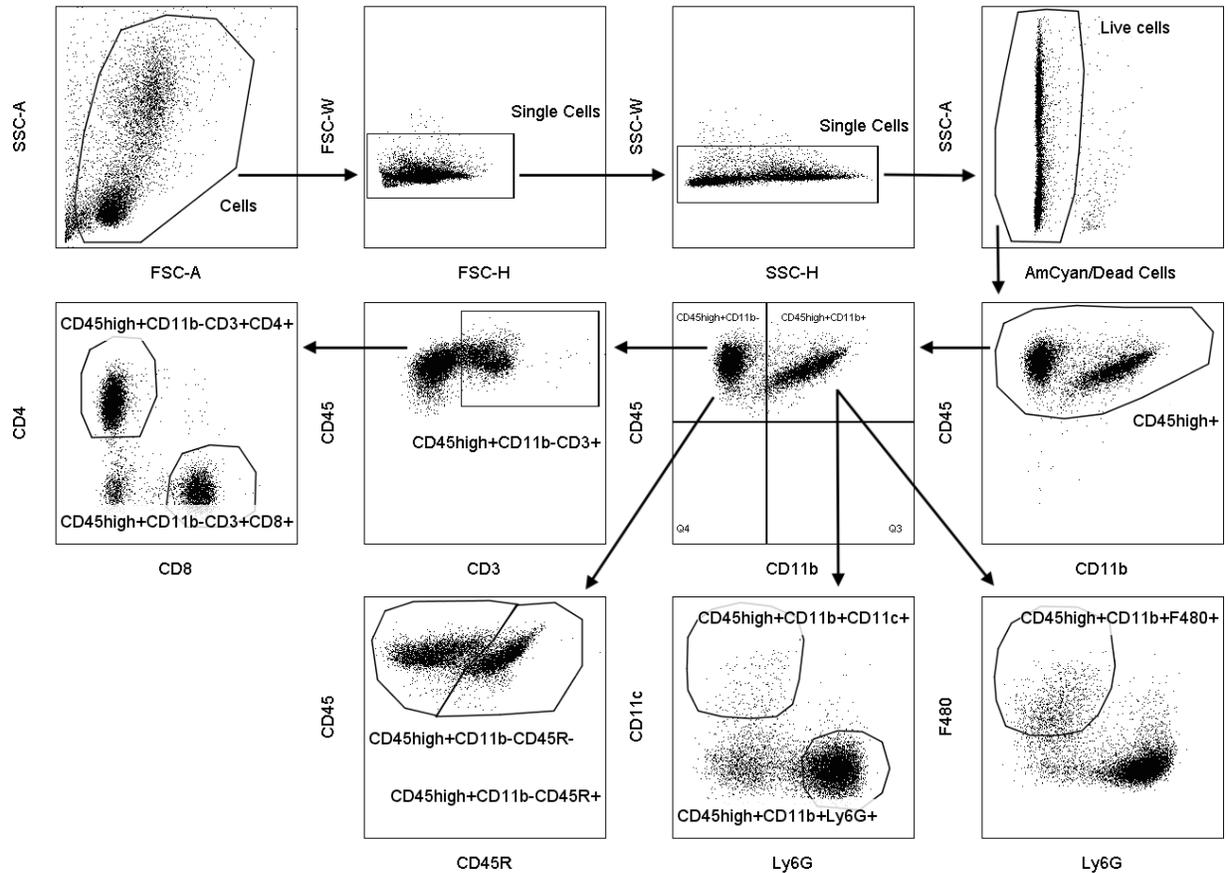


Figure 10. – Stratégie de *gating* dans la rate et les GL en cytométrie en flux

Exemple de stratégie de *gating* dans la rate et les GL en cytométrie en flux. Les cellules sont tout d'abord sélectionnées afin d'éliminer les doublets et cellules mortes. Les cellules CD45^{high} (ou CD45 dans les figures) représentant toutes les cellules immunitaires sont sélectionnées en premier. De cette sélection, sont séparées les cellules positives et négatives pour CD11b. Les cellules dendritiques (CD45^{high}CD11b⁺CD11c⁺ ou CD11c dans les figures), neutrophiles (CD45^{high}CD11b⁺Ly6G⁺ ou Ly6G dans les figures), et macrophages (CD45^{high}CD11b⁺F480⁺ ou F480 dans les figures) sont sélectionnés à partir de la population CD45^{high}CD11b⁺ (CD11b dans les figures) représentant les cellules myéloïdes. Les lymphocytes T (CD45^{high}CD11b⁻CD3⁺ ou CD3 dans les figures) et lymphocytes B (CD45^{high}CD11b⁻CD45R⁺ ou CD45R dans les figures) sont sélectionnés à partir de la population CD45^{high}CD11b⁻. Les lymphocytes T CD4 (CD45^{high}CD11b⁻CD3⁺CD4⁺ ou CD4 dans les figures) et CD8 (CD45^{high}CD11b⁻CD3⁺CD8⁺ ou CD8 dans les figures) sont sélectionnés à partir de la population de lymphocytes T (CD45^{high}CD11b⁻CD3⁺).

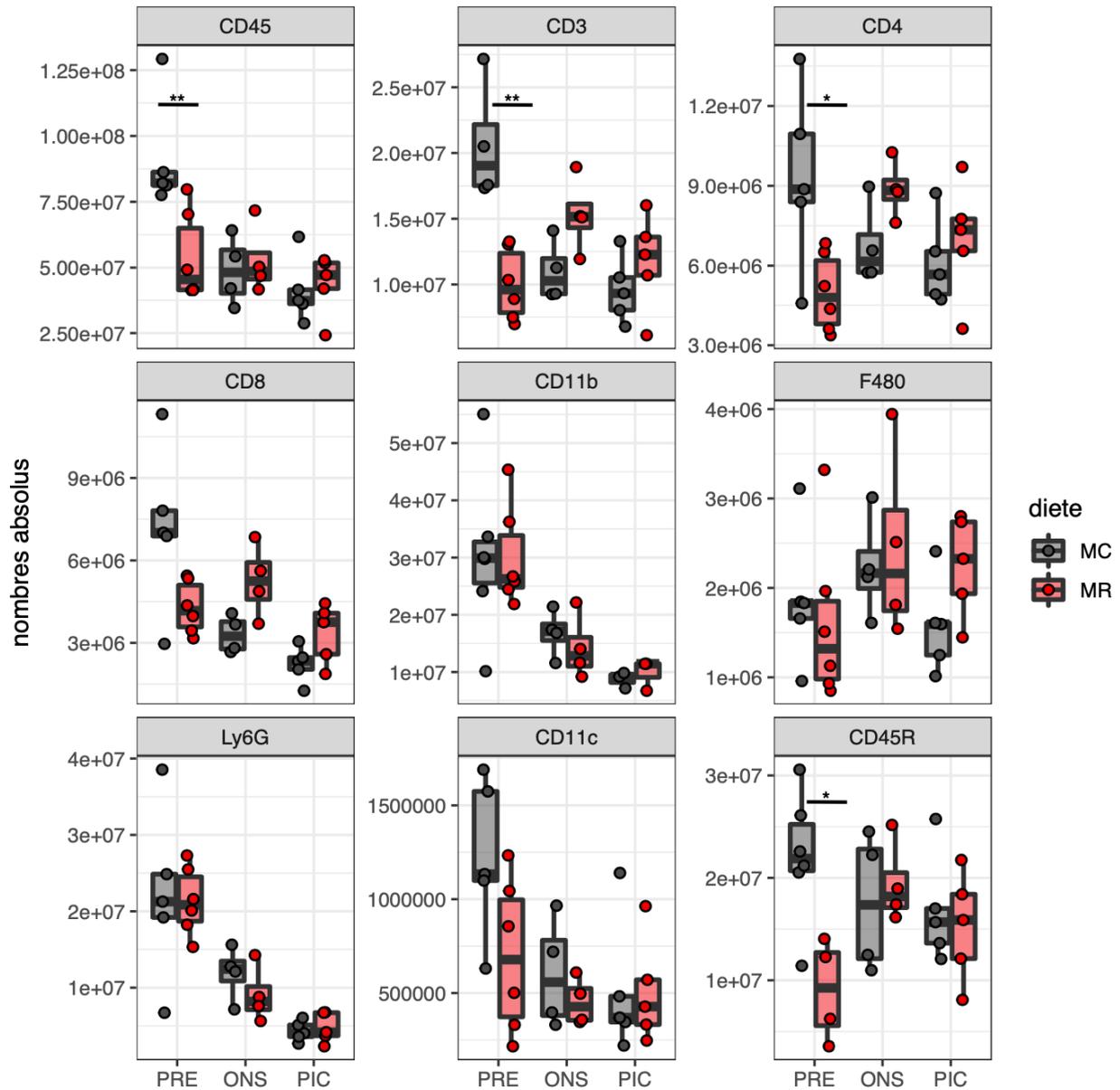


Figure 11. – Nombres absolus des populations leucocytaires présentes dans la rate en EAE active

Diagrammes en boîte représentant les valeurs moyennes, minimales, et maximales des nombres absolus des populations CD45 (toutes les cellules immunitaires), CD3 (lymphocytes T), CD4 (lymphocytes T CD4), CD8 (lymphocytes T CD8), CD11b (cellules myéloïdes), F480 (macrophages), Ly6G (neutrophiles), CD11c (cellules dendritiques) et CD45R (lymphocytes B) présentes dans la rate des souris sur la diète contrôle (MC) ou réduite en méthionine (MR) à différentes phases post-immunisation en EAE active: présymptomatique (PRE), début des symptômes (ONS) et pic des symptômes (PIC). Les analyses statistiques effectuées sont des tests Mann-Whitney. Chaque point représente une souris.

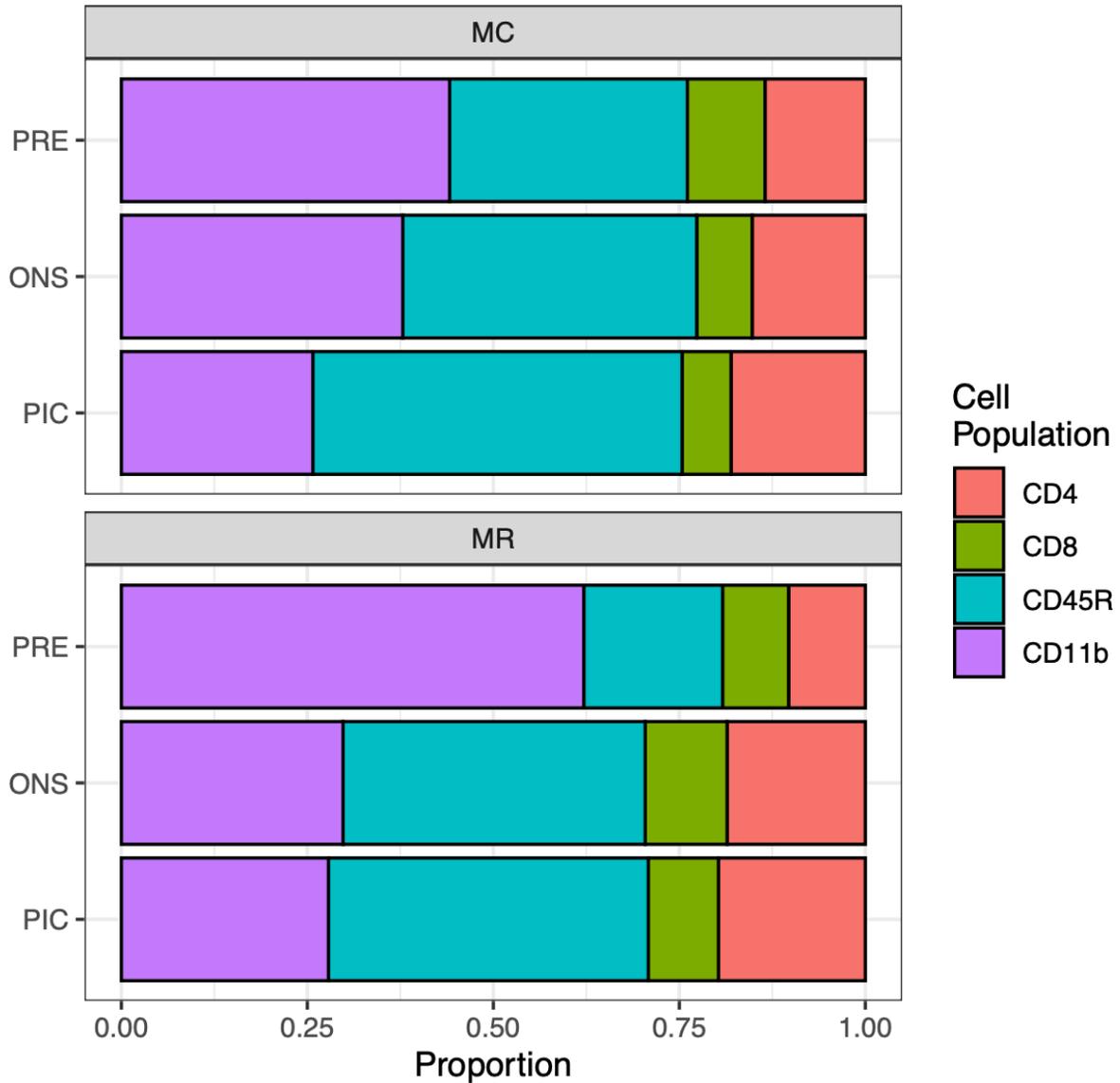


Figure 12. – Proportions des cellules immunitaires présentes dans la rate en EAE active

Proportions des populations de cellules immunitaires CD4 (lymphocytes T CD4), CD8 (lymphocytes T CD8), CD45R (lymphocytes B), et CD11b (cellules myéloïdes) présentes dans la rate des souris sur la diète contrôle (MC) ou réduite en méthionine (MR) à différentes phases post-immunisation en EAE active: présymptomatique (PRE), début des symptômes (ONS) et pic des symptômes (PIC).

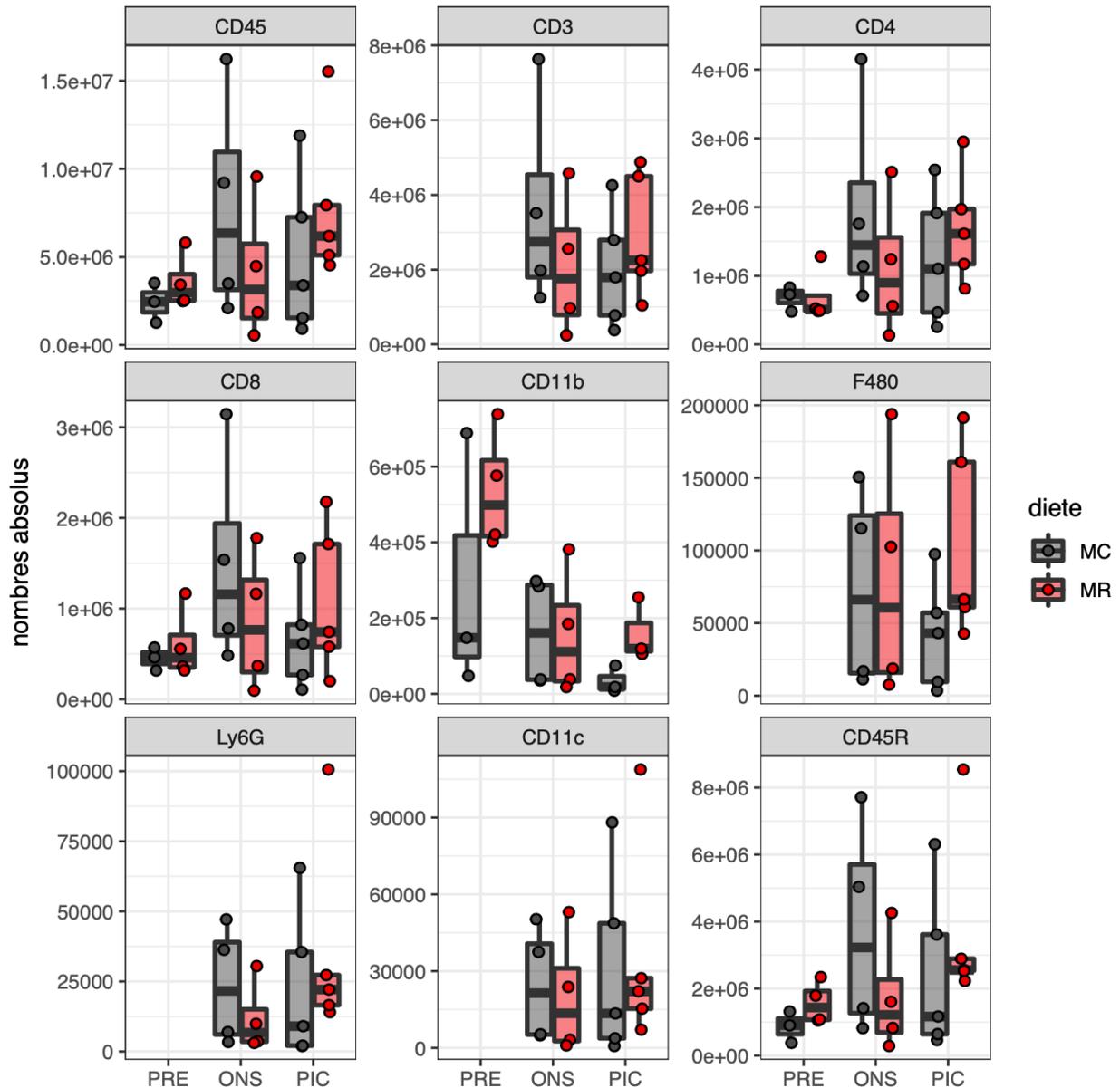


Figure 13. – Nombres absolus des populations leucocytaires présentes dans les GL en EAE active

Diagrammes en boîte représentant les valeurs moyennes, minimales, et maximales des nombres absolus des populations CD45 (toutes les cellules immunitaires), CD3 (lymphocytes T), CD4 (lymphocytes T CD4), CD8 (lymphocytes T CD8), CD11b (cellules myéloïdes), F480 (macrophages), Ly6G (neutrophiles), CD11c (cellules dendritiques) et CD45R (lymphocytes B) présentes dans les GL des souris sur la diète contrôle (MC) ou réduite en méthionine (MR) à différentes phases post-immunisation en EAE active: présymptomatique (PRE), début des symptômes (ONS) et pic des symptômes (PIC). Chaque point représente une souris.

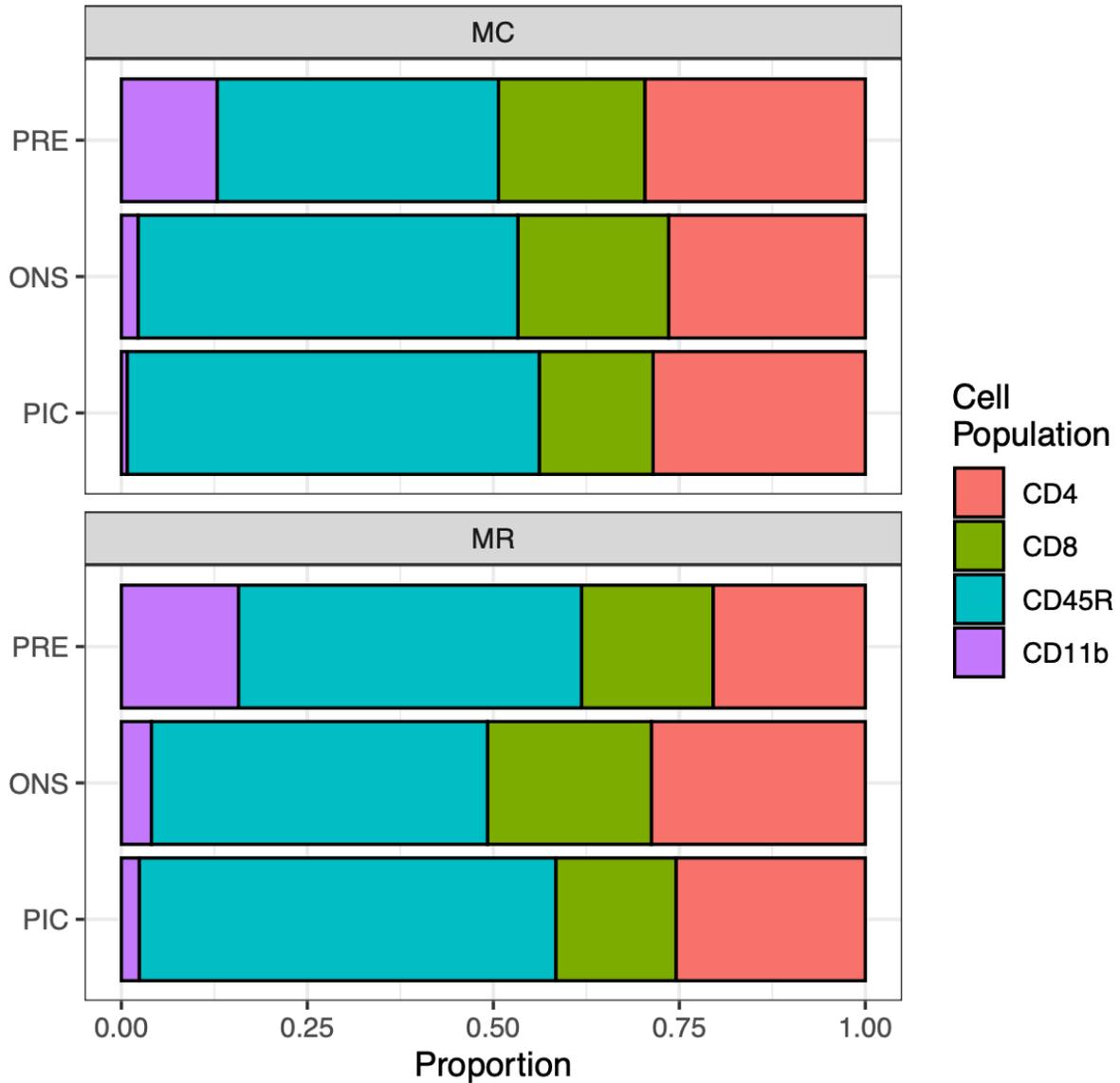


Figure 14. – Proportions des cellules immunitaires présentes dans les GL en EAE active

Proportions des populations de cellules immunitaires CD4 (lymphocytes T CD4), CD8 (lymphocytes T CD8), CD45R (lymphocytes B), et CD11b (cellules myéloïdes) présentes dans les GL des souris sur la diète contrôle (MC) ou réduite en méthionine (MR) à différentes phases post-immunisation en EAE active: présymptomatique (PRE), début des symptômes (ONS) et pic des symptômes (PIC).

2.2. Impact de la restriction alimentaire en méthionine sur l'infiltration de cellules immunitaires dans le SNC

Un exemple de stratégie de *gating* en cytométrie en flux des populations immunitaires dans le SNC est fourni dans la figure 15.

Un *heatmap* regroupe les échantillons similaires entre eux pour révéler des *clusters* formés avec un algorithme de *clustering* hiérarchique. Ici, le *heatmap* des nombres absolus des populations infiltrant le SNC au début et au pic des symptômes (figure 16) montre des distinctions notables entre les groupes MR et MC. Les cellules immunitaires infiltrant le SNC étant trop peu nombreuses en phase présymptomatique (jour 7), ce point n'a pas été inclus dans les analyses.

Durant la phase de début des symptômes (ONSET), les souris du groupe MR présentent une réduction significative du nombre de cellules immunitaires infiltrantes CD45^{high} (CD45) dans leur SNC par rapport aux souris du groupe MC (figure 17). Les populations lymphocytaires CD3 (CD4, et CD8) et CD45R, et myéloïdes CD11b (F4/80, Ly6G et CD11c) sont significativement réduites dans le SNC des souris sous la MR par rapport à celui des souris sous la MC (figure 17). À l'apparition des symptômes dans le groupe MC, les populations lymphocytaires, notamment les CD4, sont en proportion plus élevée dans le SNC des souris du groupe MC alors que les cellules myéloïdes CD11b sont proportionnellement plus élevées dans le SNC des souris du groupe MR (figure 18). Le nombre absolu de microglies CD45^{inter}CD11b (CD45^{inter}) n'est pas significativement différent dans le groupe MR par rapport au groupe contrôle (figure 17).

Durant la phase de pic des symptômes (PIC), l'infiltration de cellules immunitaires CD45 est également significativement réduite dans le SNC des souris sous la MR par rapport aux souris sous la MC (figure 17). Les populations lymphocytaires sont significativement réduites et les populations myéloïdes ont tendance à l'être dans le SNC des souris sous la MR (figure 17). À ce stade de l'EAE, les souris du groupe MC sont au pic de leurs symptômes, alors que les souris du groupe MR commencent à en développer, les populations lymphocytaires, notamment les CD4, sont cette fois proportionnellement plus élevées dans le SNC des souris du groupe MR (figure 18). Le nombre absolu de microglies CD45^{inter}CD11b (CD45^{inter}) n'est pas significativement différent (figure 17).

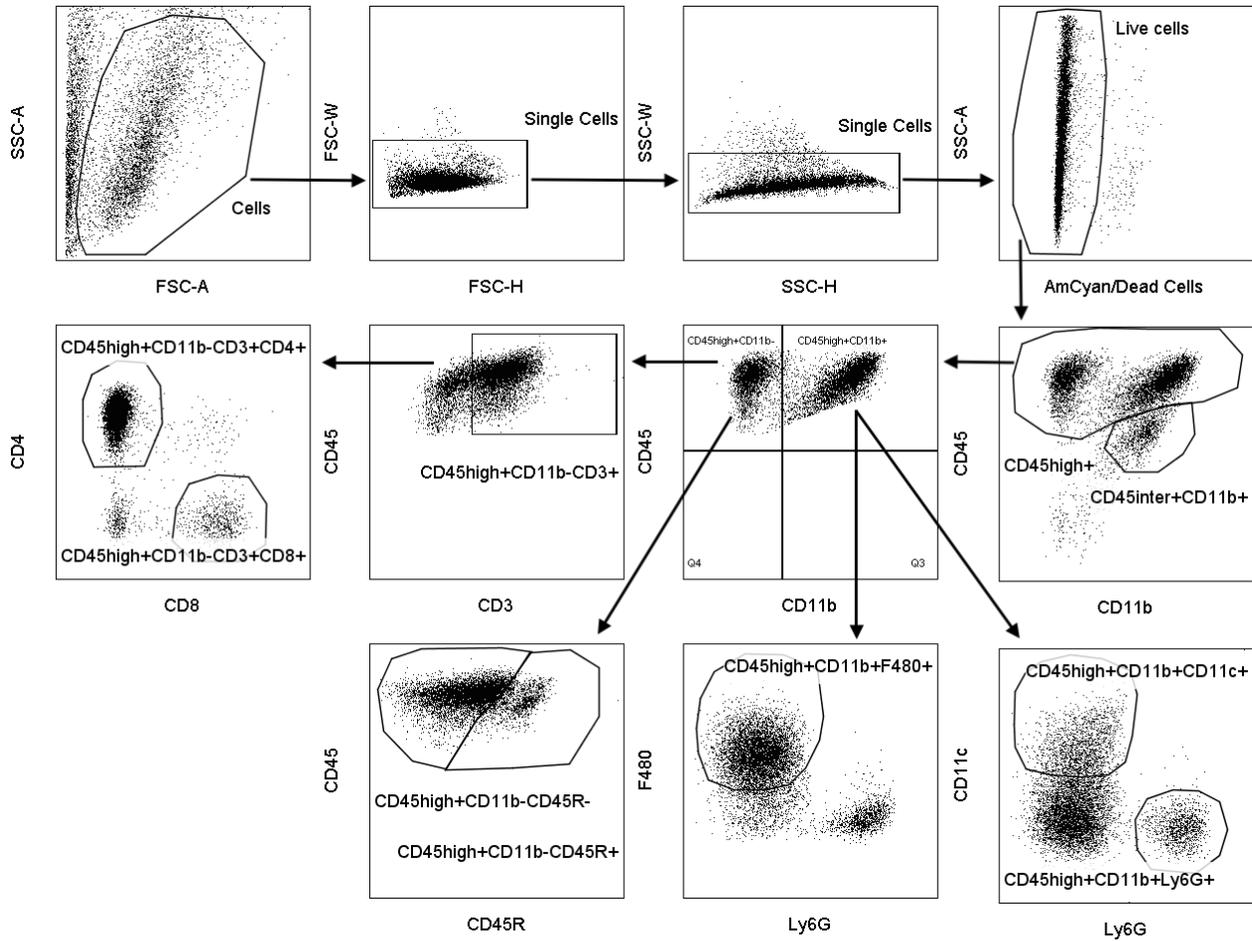


Figure 15. – Stratégie de *gating* dans le SNC en cytométrie en flux

Exemple de stratégie de *gating* dans le SNC en cytométrie en flux. Les cellules sont tout d’abord sélectionnées afin d’éliminer les doublets et cellules mortes. Les cellules CD45^{high} (ou CD45 dans les figures) représentant toutes les cellules immunitaires et les cellules CD45^{inter}CD11b⁺ (ou CD45inter dans les figures) représentant les microglies sont sélectionnées en premier. De cette sélection, sont séparées les cellules positives et négatives pour CD11b. Les cellules dendritiques (CD45^{high}CD11b⁺CD11c⁺ ou CD11c dans les figures), neutrophiles (CD45^{high}CD11b⁺Ly6G⁺ ou Ly6G dans les figures), et macrophages (CD45^{high}CD11b⁺F480⁺ ou F480 dans les figures) sont sélectionnés à partir de la population CD45^{high}CD11b⁺ (CD11b dans les figures) représentant les cellules myéloïdes. Les lymphocytes T (CD45^{high}CD11b⁻CD3⁺ ou CD3 dans les figures) et lymphocytes B (CD45^{high}CD11b⁻CD45R⁺ ou CD45R dans les figures) sont sélectionnés à partir de la population CD45^{high}CD11b⁻. Les lymphocytes T CD4 (CD45^{high}CD11b⁻CD3⁺CD4⁺ ou CD4 dans les figures) et CD8 (CD45^{high}CD11b⁻CD3⁺CD8⁺ ou CD8 dans les figures) sont sélectionnés à partir de la population de lymphocytes T (CD45^{high}CD11b⁻CD3⁺).

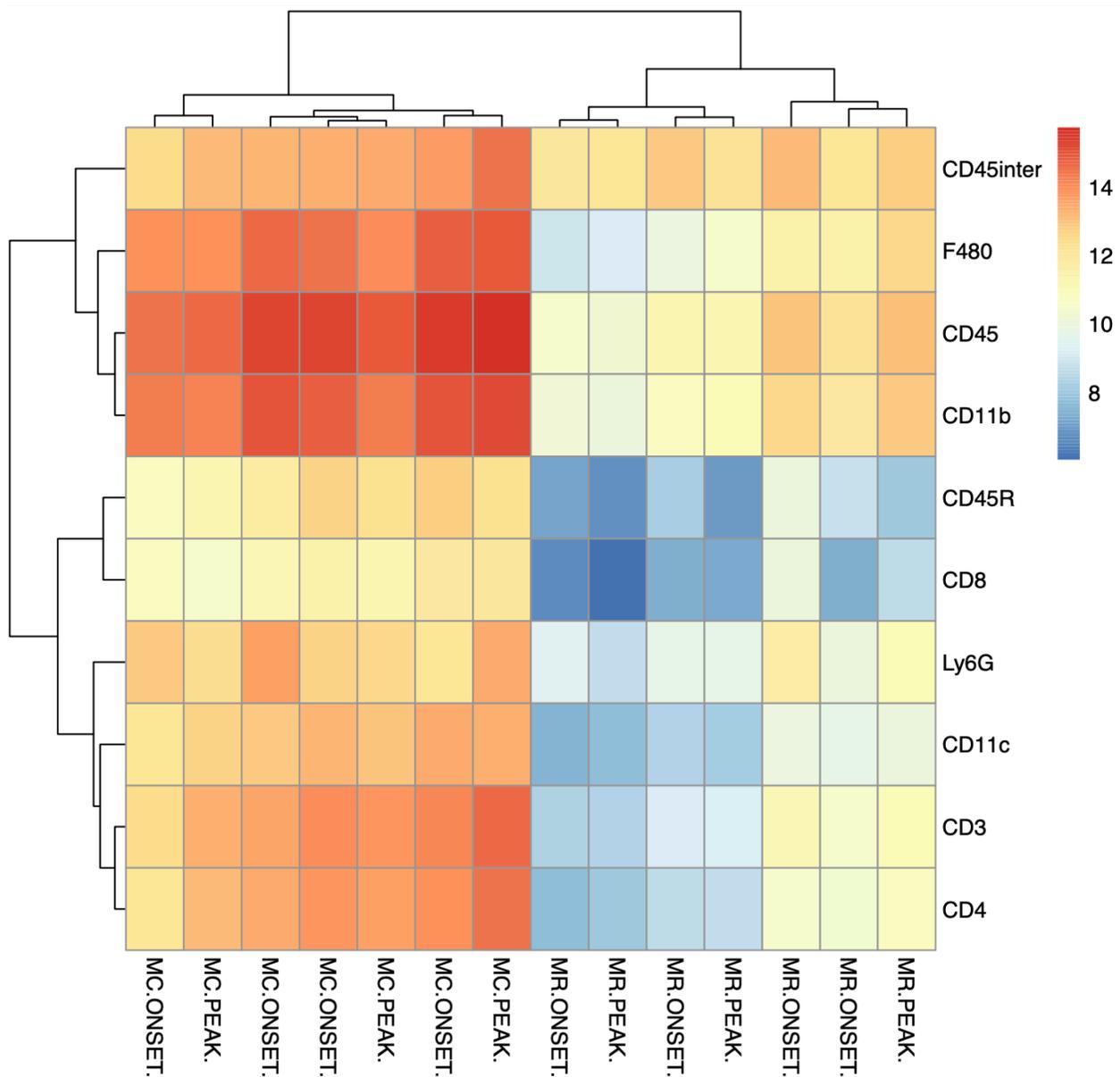


Figure 16. – *Heatmap* à partir des nombres absolus des populations de cellules immunitaires infiltrant le SNC en EAE active

Heatmap à partir des nombres absolus des populations de cellules immunitaires infiltrant le SNC des souris sur la diète contrôle (MC) ou réduite en méthionine (MR) à différentes phases post-immunisation en EAE active: début des symptômes (ONSET) et pic des symptômes (PEAK). Les nombres absolus sont sur une échelle logarithmique. Une colonne représente une souris.

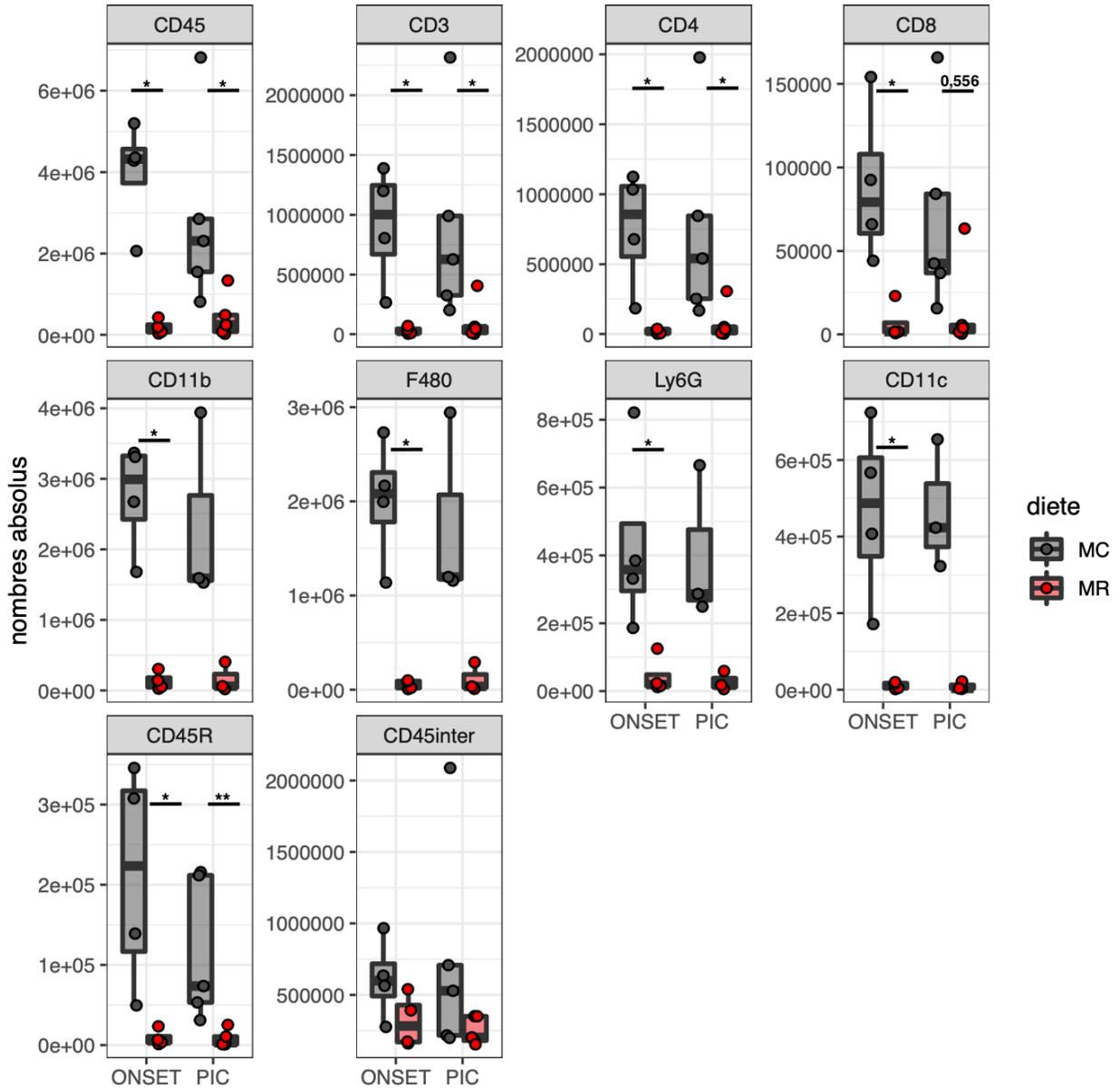


Figure 17. – Nombres absolus des populations leucocytaires infiltrant le SNC en EAE active

Diagrammes en boîte représentant les valeurs moyennes, minimales, et maximales des nombres absolus des populations CD45 (toutes les cellules immunitaires), CD3 (lymphocytes T), CD4 (lymphocytes T CD4), CD8 (lymphocytes T CD8), CD11b (cellules myéloïdes), F480 (macrophages), Ly6G (neutrophiles), CD11c (cellules dendritiques), CD45R (lymphocytes B) et CD45inter (microglies) infiltrant le SNC des souris sur la diète contrôle (MC) ou réduite en méthionine (MR) à différentes phases post-immunisation en EAE active: début des symptômes (ONSET) et pic des symptômes (PIC). Les analyses statistiques effectuées sont des tests Mann-Whitney. Chaque point représente une souris.

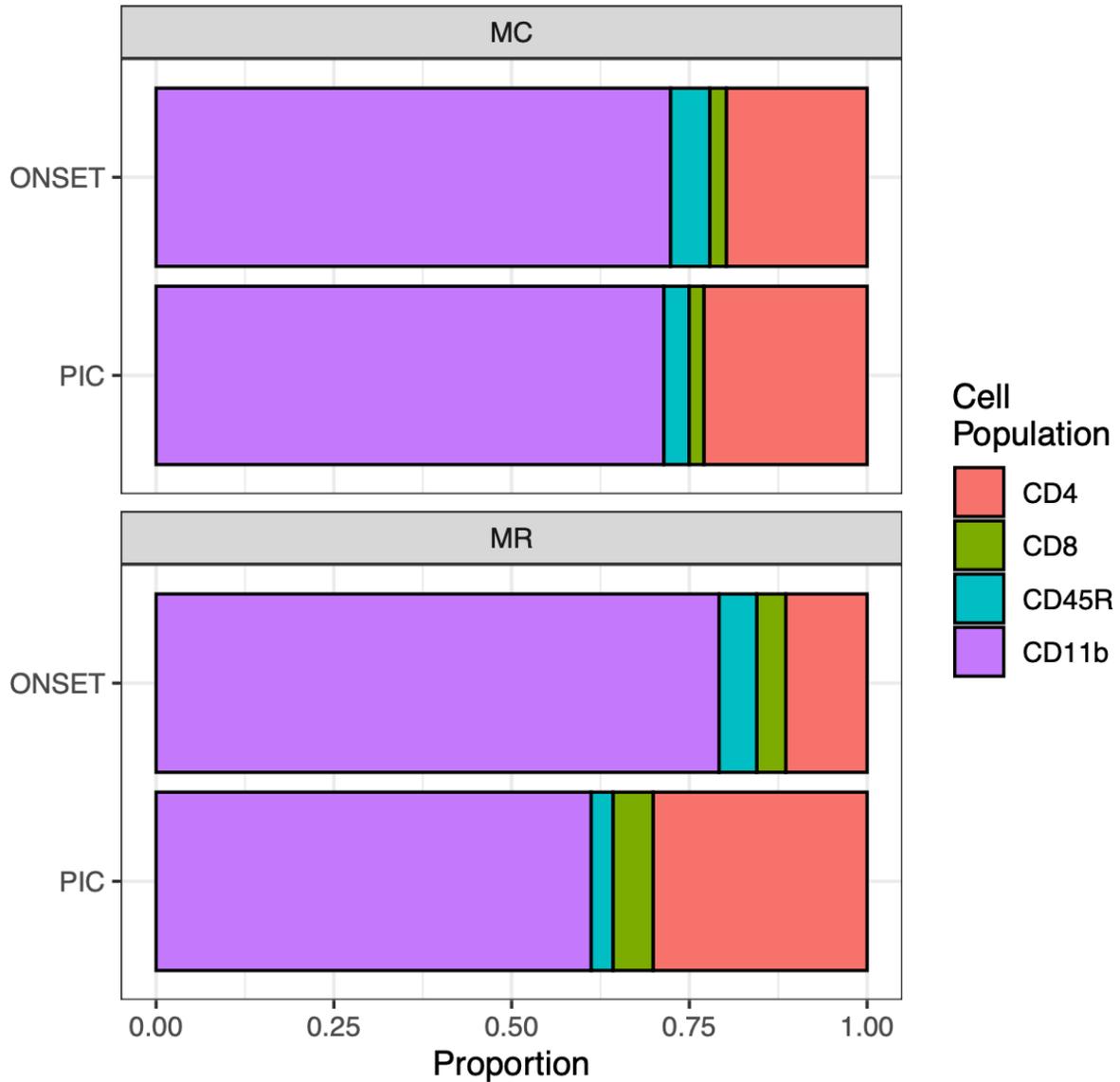


Figure 18. – Proportions des cellules immunitaires infiltrant le SNC en EAE active

Proportions des populations de cellules immunitaires CD4 (lymphocytes T CD4), CD8 (lymphocytes T CD8), CD45R (lymphocytes B), et CD11b (cellules myéloïdes) infiltrant le SNC des souris sur la diète contrôlée (MC) ou réduite en méthionine (MR) à différentes phases post-immunisation en EAE active: début des symptômes (ONSET) et pic des symptômes (PIC).

Ces résultats montrent que durant la phase présymptomatique, l'expansion des cellules immunitaires et en particulier des populations lymphocytaires est significativement limitée dans la rate des souris sous la MR par rapport aux souris sous la MC. Ces différences ne sont plus retrouvées dans les phases subséquentes d'apparition et de pic des symptômes en périphérie au niveau de la rate, mais la restriction alimentaire en méthionine (MR) est associée à une réduction significative de l'infiltration du SNC par les leucocytes périphériques, tant les populations lymphocytaires que les populations myéloïdes, par rapport à la diète contrôle.

3. La restriction alimentaire en méthionine influence le profil des lymphocytes périphériques et infiltrant le SNC

Les processus neuropathologiques sont orchestrés par les lymphocytes T pro-inflammatoires en EAE active induite par l'immunisation avec le peptide MOG. Puisque nous avons démontré que l'expansion des lymphocytes T en périphérie dans la rate en phase précoce (jour 7) et leur infiltration subséquente dans le compartiment du SNC (jours 10 et 15) sont significativement limitées par l'exposition à une diète restreinte en méthionine, leur profil d'activation et de production de cytokines a été caractérisé. Plusieurs marqueurs exprimés par les populations lymphocytaires murines, comme le marqueur d'activation CD44 permettant d'identifier les populations de lymphocytes T mémoires et effecteurs chez la souris, peuvent être quantifiés par cytométrie en flux afin de caractériser leur profil plus ou moins inflammatoire.

Les molécules d'adhérence cellulaire exprimées à la surface des lymphocytes T activés leur permettent d'interagir avec d'autres cellules exprimant le ligand correspondant, dont les cellules endothéliales de la barrière hémato-encéphalique (BHE), ce qui facilite leur transmigration vers le SNC. Les lymphocytes T activés augmentent leur expression de *intercellular adhesion molecule-1* (ICAM-1/CD54), et de *melanoma cell adhesion molecule* (MCAM/CD146), un marqueur de surface associé à la lignée TH17/1 retrouvé en proportion plus élevée chez les patients SEP (Larochelle et al. 2012; Larochelle et al. 2015). Les lymphocytes T expriment aussi des intégrines et des ligands de molécules d'adhérence retrouvées sur les cellules endothéliales, tel que

l'intégrine alpha 4 (CD49d) qui lie le *vascular cell adhesion protein 1* (VCAM-1) et le CD6 qui lie l'*activated leukocyte cell adhesion molecule* (ALCAM) (Greenwood et al. 2011).

Les lymphocytes T activés peuvent aussi exprimer des récepteurs de chimiokines qui favorisent leur recrutement aux sites d'inflammation. Parmi ceux-ci, on retrouve CD183/CXCR3 majoritairement exprimé par les TH1, et CD196/CCR6 majoritairement exprimé par les TH17 (Cui, Chu, and Chen 2020; Groom and Luster 2011).

Finalement, les lymphocytes pro-inflammatoires impliqués dans le développement de l'EAE et de la SEP, expriment des cytokines tel que le *tumor necrosis factor α* (TNF α) et l'interféron- γ (IFN- γ) majoritairement exprimés par les TH1 et le *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF) et l'interleukine-17A (IL-17A) majoritairement exprimés par les TH17 (El-Behi et al. 2011; Cheng et al. 2017).

3.1. Impact de la restriction alimentaire en méthionine sur le profil des lymphocytes T périphériques (rate et ganglions lymphatiques)

Des exemples de stratégie de *gating* en cytométrie en flux des marqueurs de surface sur les populations lymphocytaires CD4 et CD8 sont fournis dans les figures 19 et 20.

Durant les phases présymptomatique (PRES), début (ONS) et pic (PIC) des symptômes, dans la rate (figures 21 et 22) et dans les GL (figure 23), aucune différence significative n'est observée dans les nombres absolus ou proportions de lymphocytes T CD4 et CD8 exprimant CD146, CD183, CD196, CD44, CD49d, CD54, et CD6. Toutefois, une tendance à l'expression moindre de CD146, CD183, CD196, CD44, CD49d, et CD54 est observée tant sur les lymphocytes T CD4 que les lymphocytes T CD8 dans la rate des souris sous la MR au stade présymptomatique (figure 21). Les nombres absolus de lymphocytes exprimant CD6 ne sont pas disponibles dans la rate et les GL au stade présymptomatique car l'anticorps n'était pas disponible au moment de l'expérience, et les nombres absolus de lymphocytes exprimant CD49d ne sont pas disponibles dans les GL au stade présymptomatique car le marquage par cytométrie en flux n'a pas fonctionné pour des raisons techniques.

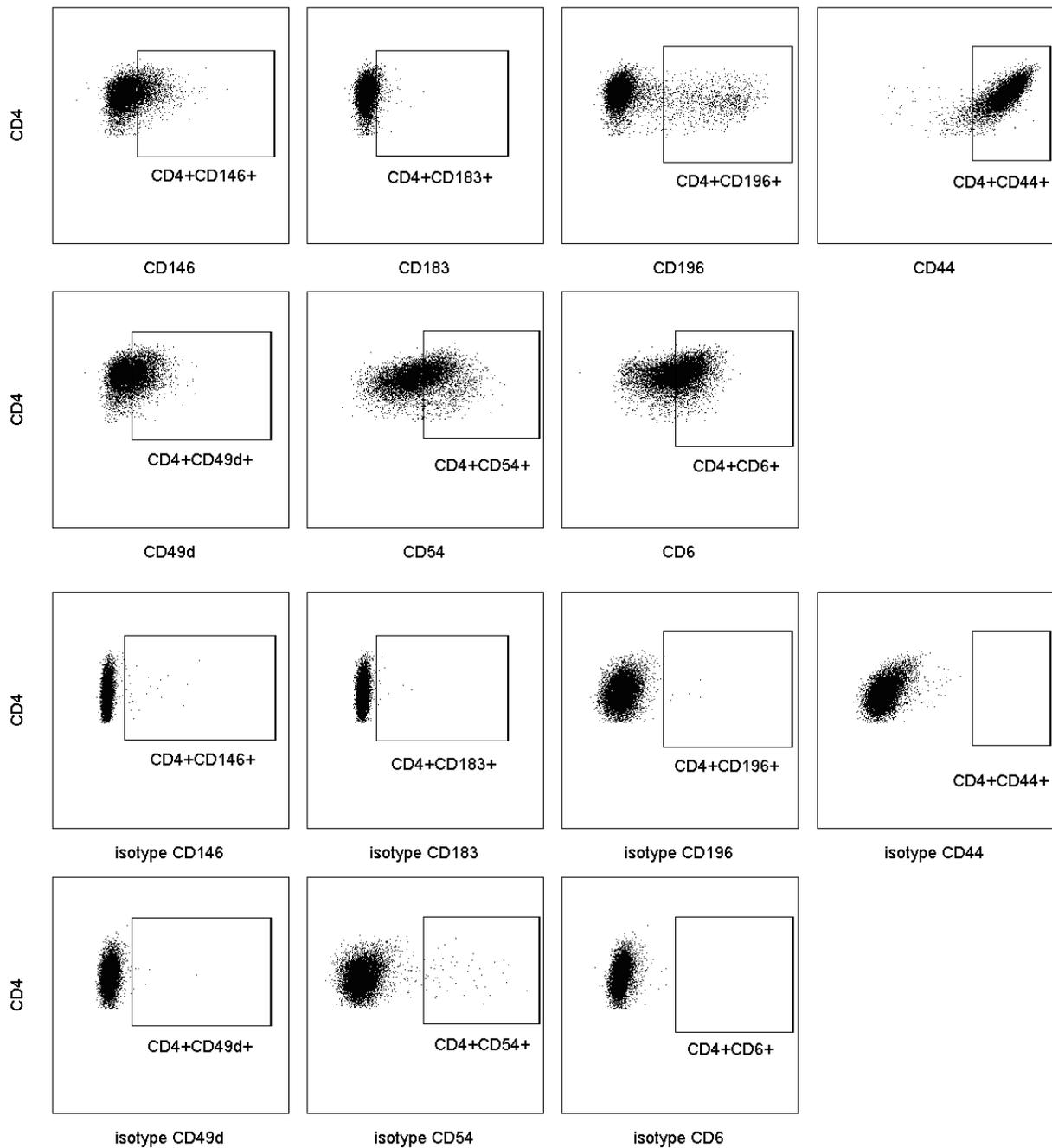


Figure 19. – Stratégie de *gating* sur les lymphocytes T CD4 en cytométrie en flux

Exemple de stratégie de *gating* des lymphocytes T CD4 exprimant CD146, CD183, CD196, CD44, CD49d, CD54 et CD6 en cytométrie en flux dans le SNC. Les isotypes sont des contrôles de *gating*.

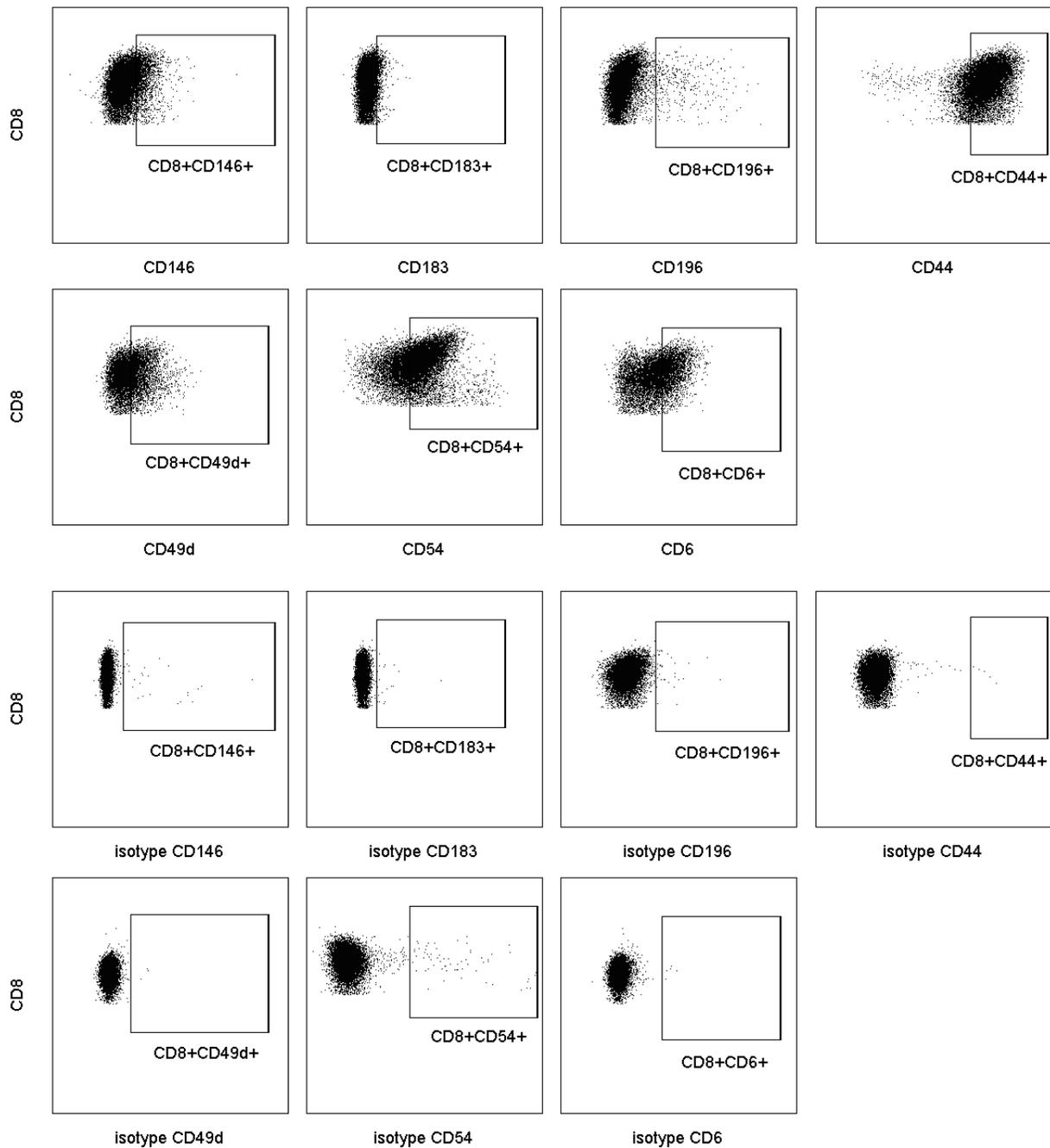


Figure 20. – Stratégie de *gating* sur les lymphocytes T CD8 en cytométrie en flux

Exemple de stratégie de *gating* des lymphocytes T CD8 exprimant CD146, CD183, CD196, CD44, CD49d, CD54 et CD6 en cytométrie en flux dans le SNC. Les isotypes sont des contrôles de *gating*.

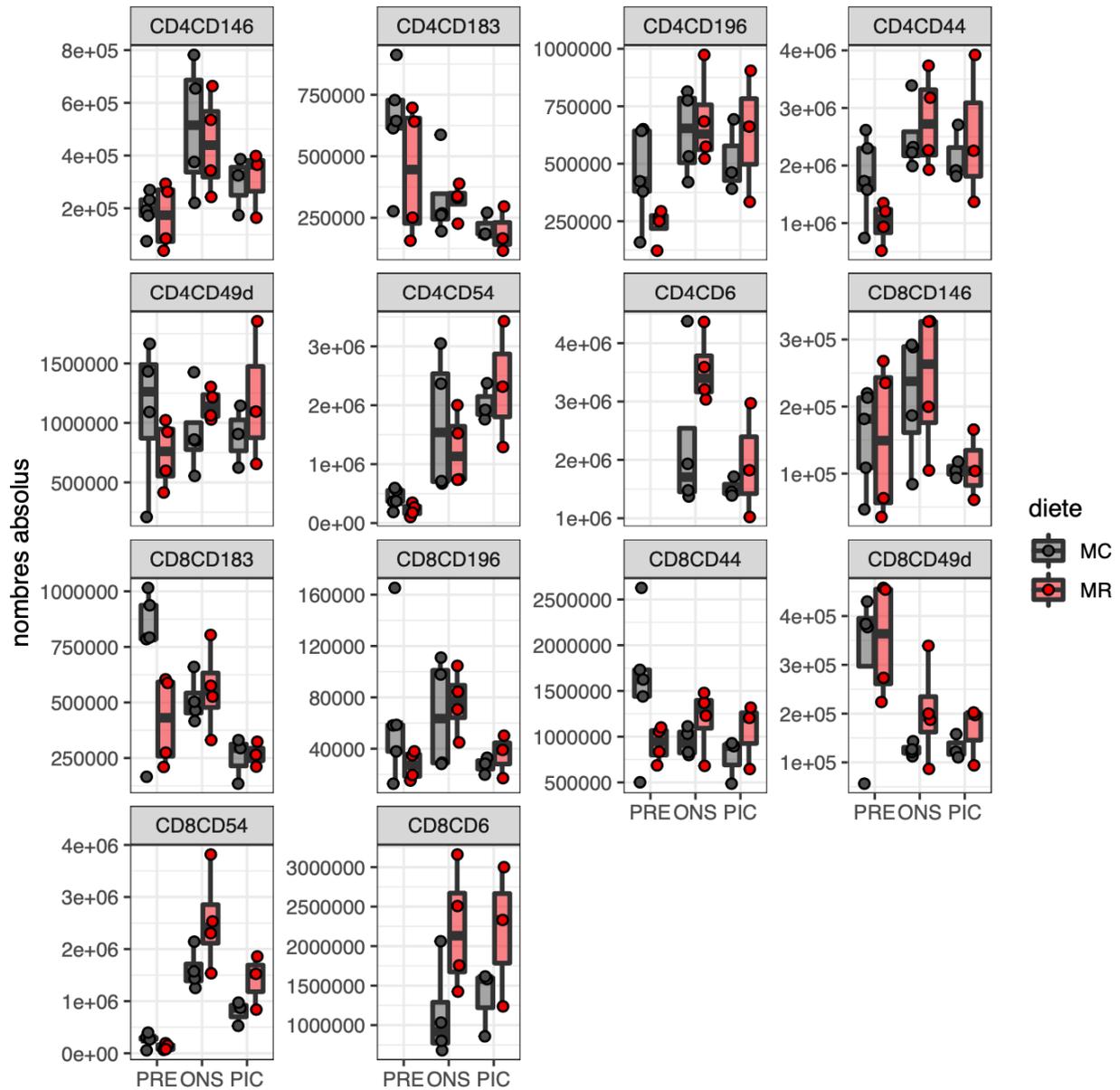


Figure 21. – Nombres absolus de lymphocytes T exprimant des marqueurs de surface dans la rate en EAE active

Diagrammes en boîte représentant les valeurs moyennes, minimales, et maximales des nombres absolus de lymphocytes T CD4 ou CD8 exprimant CD146, CD183, CD196, CD44, CD49d, CD54 ou CD6 dans la rate des souris sur la diète contrôle (MC) ou réduite en méthionine (MR) à différentes phases post-immunisation en EAE active: présymptomatique (PRE), début des symptômes (ONS) et pic des symptômes (PIC). Chaque point représente une souris.

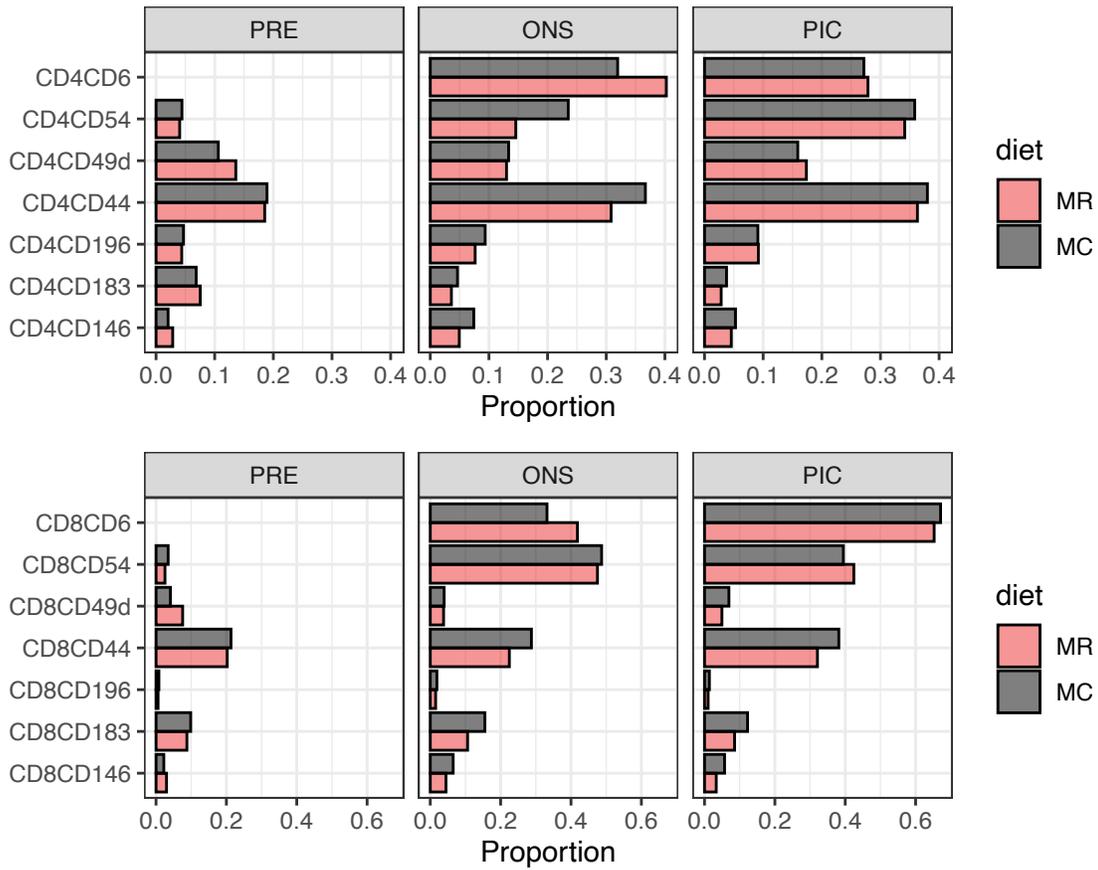


Figure 22. – Proportions de lymphocytes T exprimant des marqueurs de surface dans la rate en EAE active

Proportions de lymphocytes T CD4 (en haut) ou CD8 (en bas) exprimant CD6, CD54, CD49d, CD44, CD196, CD183 ou CD146 dans la rate des souris sur la diète contrôle (MC) ou réduite en méthionine (MR) à différentes phases post-immunisation en EAE active: présymptomatique (PRE), début des symptômes (ONS) et pic des symptômes (PIC).

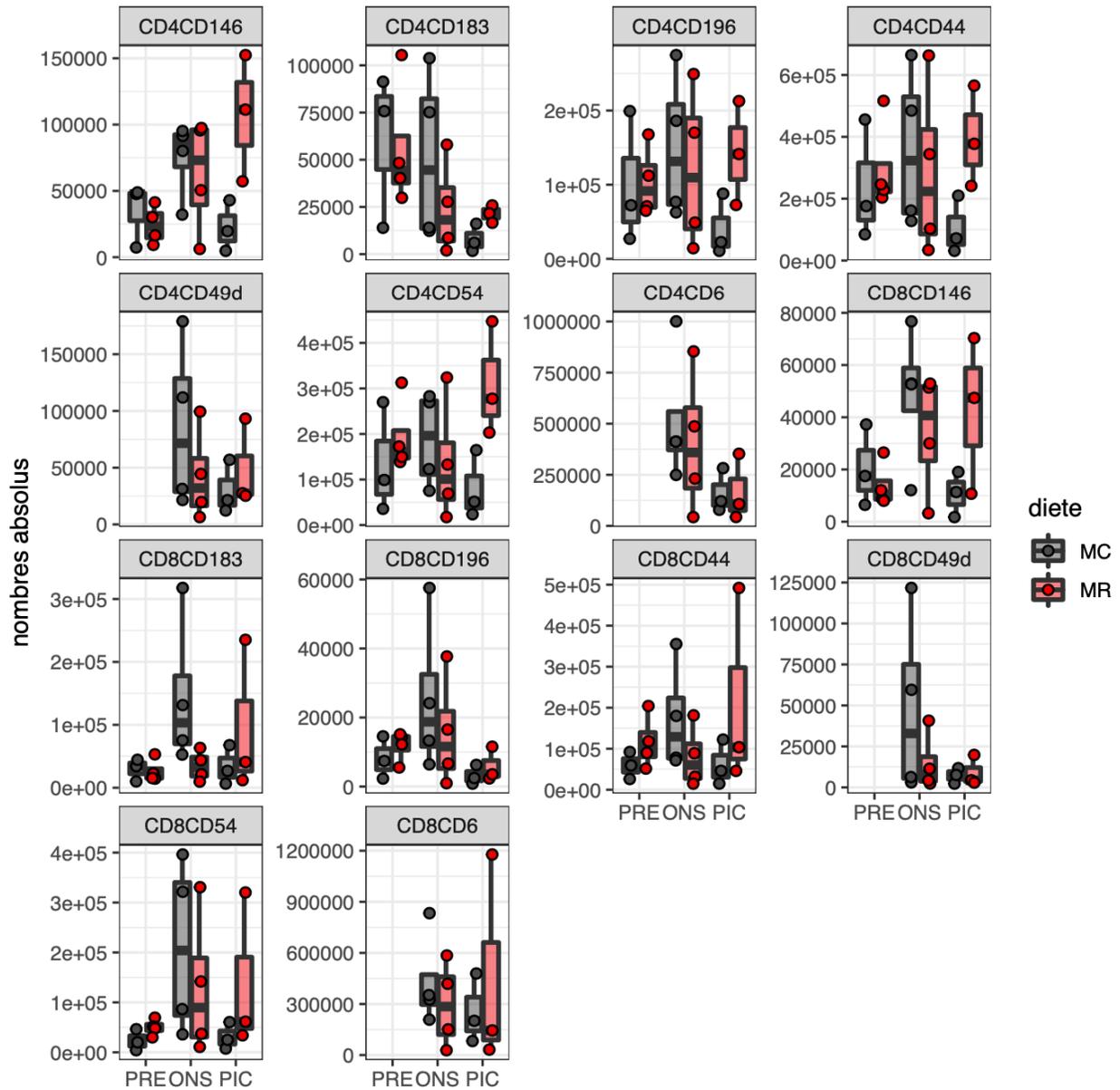


Figure 23. – Nombres absolus de lymphocytes T exprimant des marqueurs de surface dans les GL en EAE active

Diagrammes en boîte représentant les valeurs moyennes, minimales, et maximales des nombres absolus de lymphocytes T CD4 ou CD8 exprimant CD146, CD183, CD196, CD44, CD49d, CD54 ou CD6 dans les GL des souris sur la diète contrôle (MC) ou réduite en méthionine (MR) à différentes phases post-immunisation en EAE active: présymptomatique (PRE), début des symptômes (ONS) et pic des symptômes (PIC). Chaque point représente une souris.

Un exemple de stratégie de gating en cytométrie en flux des cytokines sur les populations lymphocytaires est fourni dans la figure 24 ci-dessous.

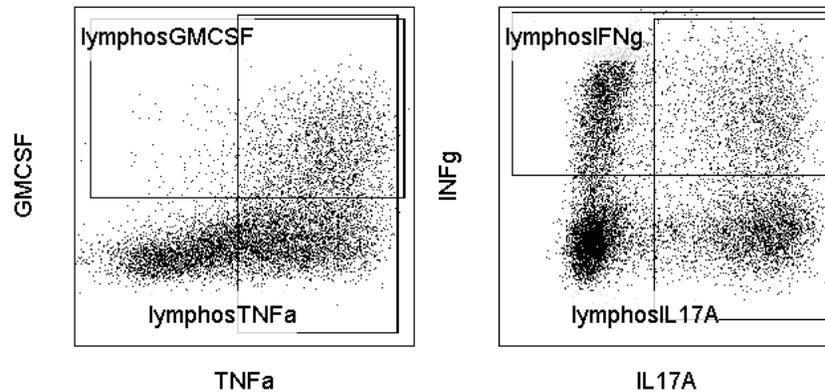


Figure 24. – Stratégie de *gating* sur les lymphocytes en cytométrie en flux

Exemple de stratégie de gating des lymphocytes CD45⁺CD11b⁻ exprimant GM-CSF, TNF α , IL17A, IFN- γ en cytométrie en flux.

Dans la rate, durant la phase présymptomatique (PRES), les nombres absolus de lymphocytes exprimant les cytokines pro-inflammatoires GM-CSF, IFN- γ , IL-17A et TNF α sont significativement réduits dans le groupe MR (figure 25). Ces différences au niveau des nombres absolus ne sont plus statistiquement significatives bien que la tendance soit la même durant la phase de début des symptômes, alors qu'elles sont complètement abolies en périphérie dans la rate au pic des symptômes (figure 25).

Dans les GL, les lymphocytes ne montrent pas de différences significatives dans l'expression de cytokines à aucune des phases de l'EAE étudiées (figure 26).

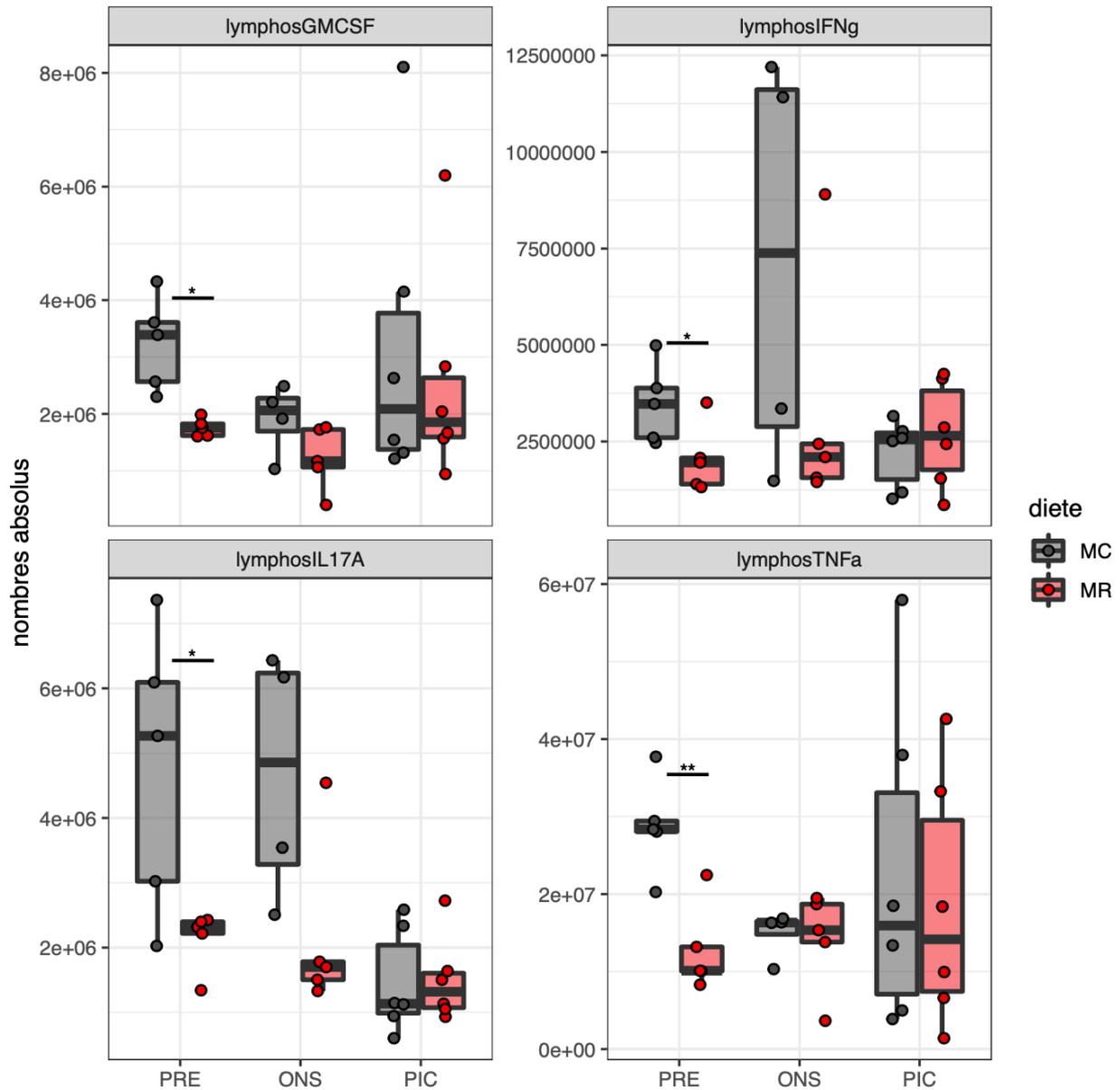


Figure 25. – Nombres absolus de lymphocytes exprimant des cytokines dans la rate en EAE active

Diagrammes en boîte représentant les valeurs moyennes, minimales, et maximales des nombres absolus de lymphocytes CD45⁺CD11b⁻ exprimant GM-CSF, IFN- γ , IL17A ou TNF α dans la rate des souris sur la diète contrôle (MC) ou réduite en méthionine (MR) à différentes phases post-immunisation en EAE active: présymptomatique (PRE), début des symptômes (ONS) et pic des symptômes (PIC). Les analyses statistiques effectuées sont des tests Mann-Whitney ou t de Student lorsqu'appropriés. Chaque point représente une souris.

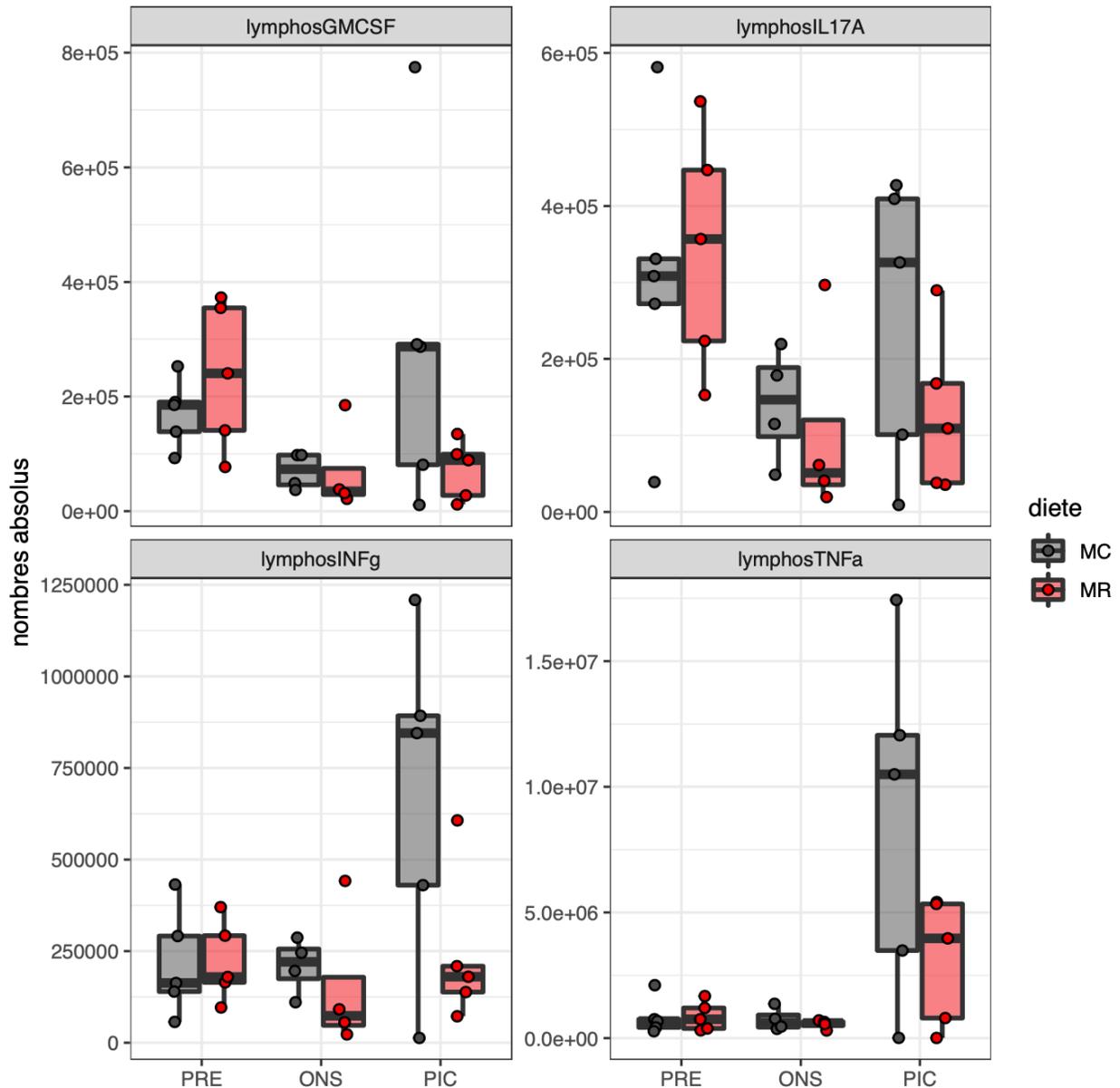


Figure 26. – Nombres absolus de lymphocytes exprimant des cytokines dans les GL en EAE active

Diagrammes en boîte représentant les valeurs moyennes, minimales, et maximales des nombres absolus de lymphocytes CD45⁺CD11b⁻ exprimant GM-CSF, IFNM-CSF, IFN γ , IL17A ou TNF α dans les GL des souris sur la diète contrôle (MC) ou réduite en méthionine (MR) à différentes phases post-immunisation en EAE active: présymptomatique (PRE), début des symptômes (ONS) et pic des symptômes (PIC). Chaque point représente une souris.

3.2. Impact de la restriction alimentaire en méthionine sur le profil des lymphocytes T infiltrant le SNC

Le *heatmap* des nombres absolus de lymphocytes T CD4 et CD8 exprimant des molécules d'adhérence ou ligands, et récepteurs de chimiokines et infiltrant le SNC au début et au pic des symptômes (figure 27) montre des distinctions notables entre les groupes MR et MC.

Durant les phases de début (ONSET) et pic (PIC) des symptômes, dans le SNC, les nombres absolus de lymphocytes T CD4 et CD8 exprimant CD146, CD44, CD49d, CD54, CD6, CD183, et CD196 sont significativement réduits ou tendent à être réduits dans le groupe MR (figure 28). Durant la phase de début (ONSET) des symptômes, lorsque les souris sous la MC commencent à développer des symptômes, la proportion de lymphocytes T CD4 et CD8 exprimant CD6, CD54, et CD44 est plus élevée dans le SNC des souris du groupe MC (figure 29). Durant la phase de pic (PIC) des symptômes, lorsque les souris du groupe MR commencent éventuellement à développer des symptômes, les lymphocytes T CD4 et CD8 qui expriment CD6, CD54, et CD146 sont proportionnellement moins élevés dans le SNC des souris sous la MR (figure 29).

Durant les phases de début (ONSET) et pic (PIC) des symptômes, les nombres absolus de lymphocytes exprimant GM-CSF, IFN- γ , IL-17A et TNF α ont tendance à être réduits dans le SNC des souris sous la MR, les différences sont statistiquement significatives pour GM-CSF et IL-17A au pic des symptômes (figure 30).

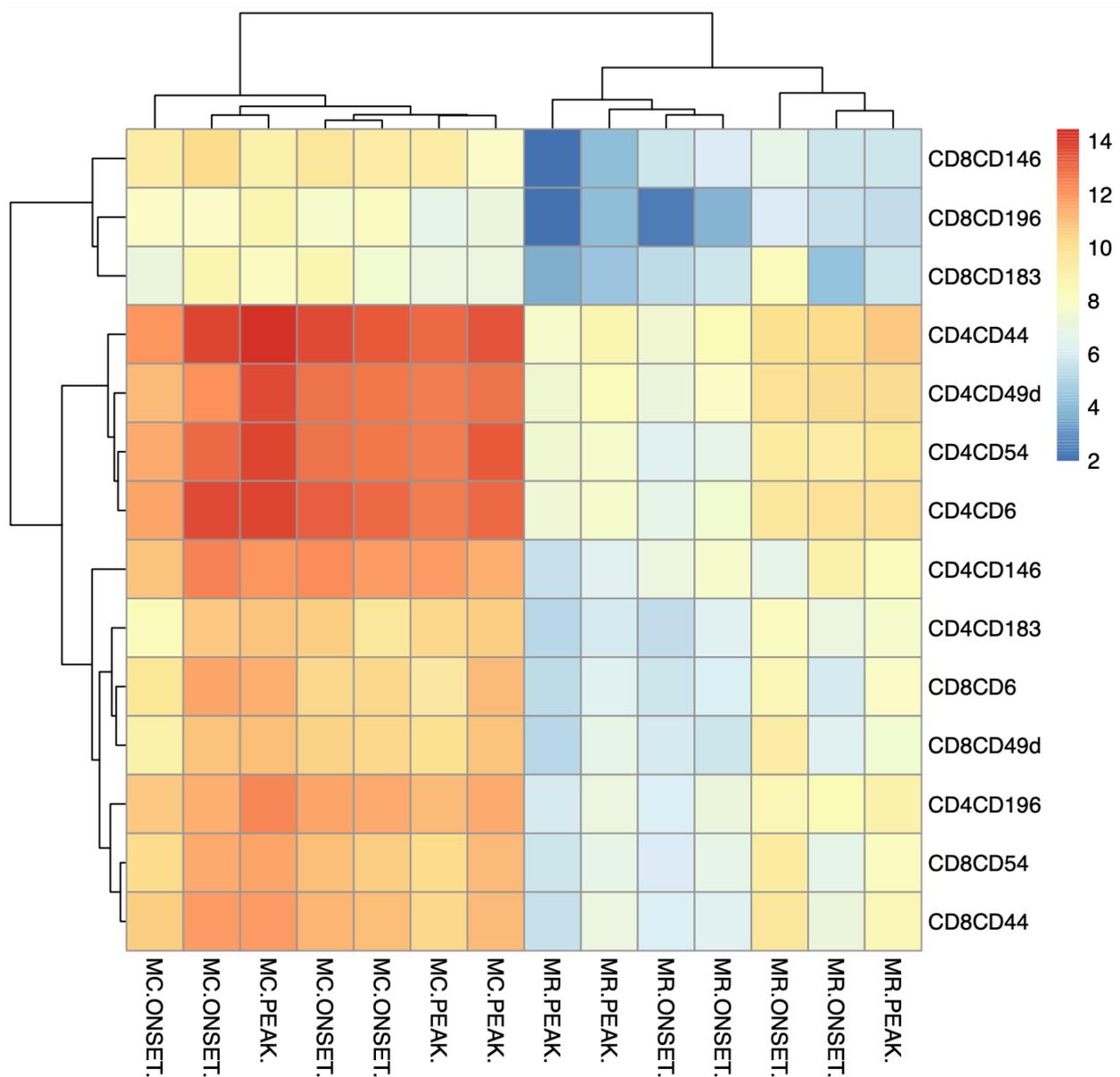


Figure 27. – *Heatmap* à partir des nombres absolus de lymphocytes T exprimant des marqueurs de surface et infiltrant le SNC en EAE active

Heatmap à partir des nombres absolus de lymphocytes T CD4 ou CD8 exprimant CD146, CD183, CD196, CD44, CD49d, CD54 ou CD6 infiltrant le SNC des souris sur la diète contrôle (MC) ou réduite en méthionine (MR) à différentes phases post-immunisation en EAE active: début des symptômes (ONSET) et pic des symptômes (PEAK). Les nombres absolus sont sur une échelle logarithmique. Une colonne représente une souris.

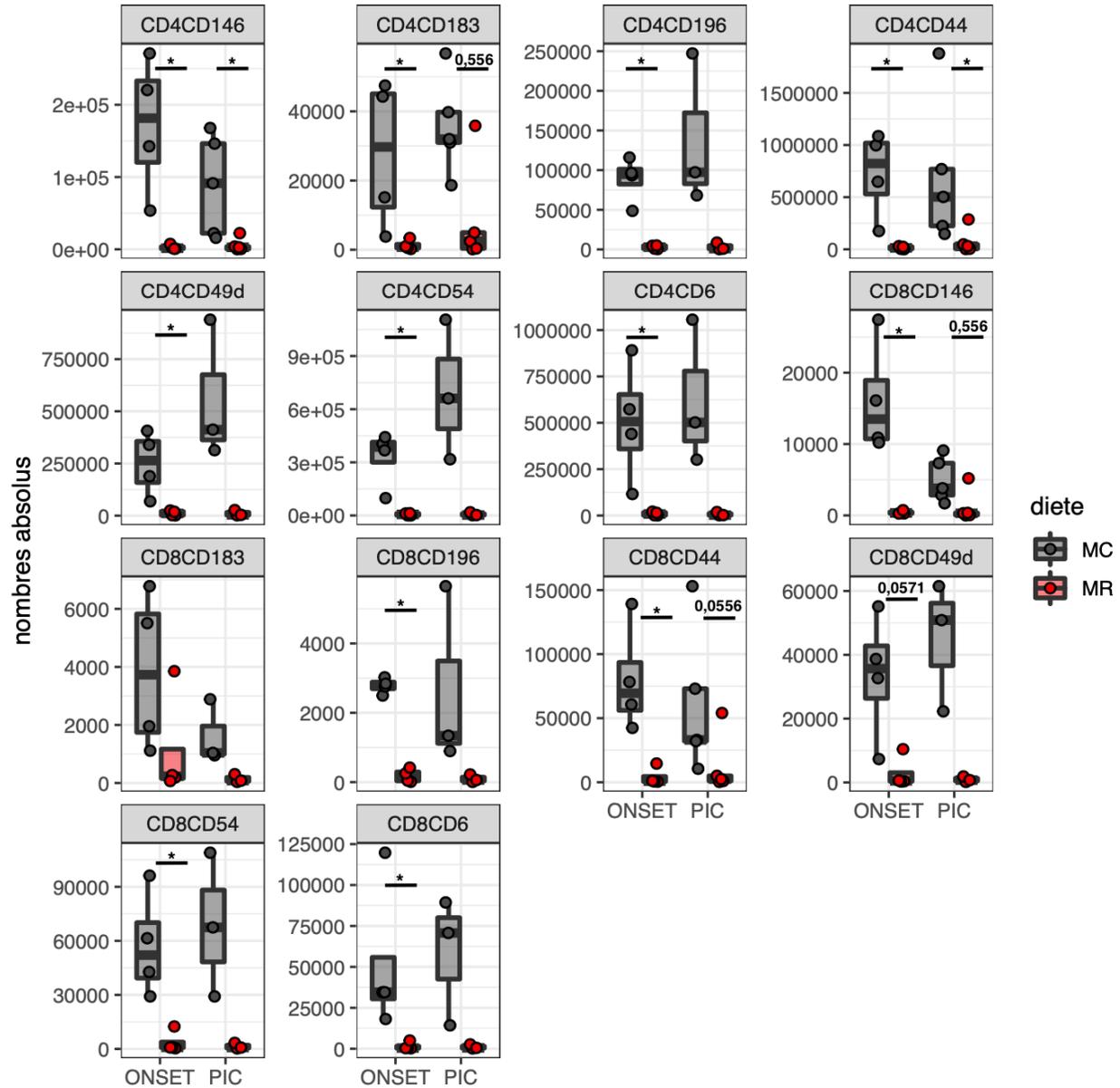


Figure 28. – Nombres absolus des lymphocytes T exprimant des marqueurs de surface dans le SNC en EAE active

Diagrammes en boîte représentant les valeurs moyennes, minimales, et maximales des nombres absolus de lymphocytes T CD4 ou CD8 exprimant CD146, CD183, CD196, CD44, CD49d, CD54 ou CD6 et infiltrant le SNC des souris sur la diète contrôle (MC) ou réduite en méthionine (MR) à différentes phases post-immunisation en EAE active: début des symptômes (ONSET) et pic des symptômes (PIC). Les analyses statistiques effectuées sont des tests Mann-Whitney. Chaque point représente une souris.

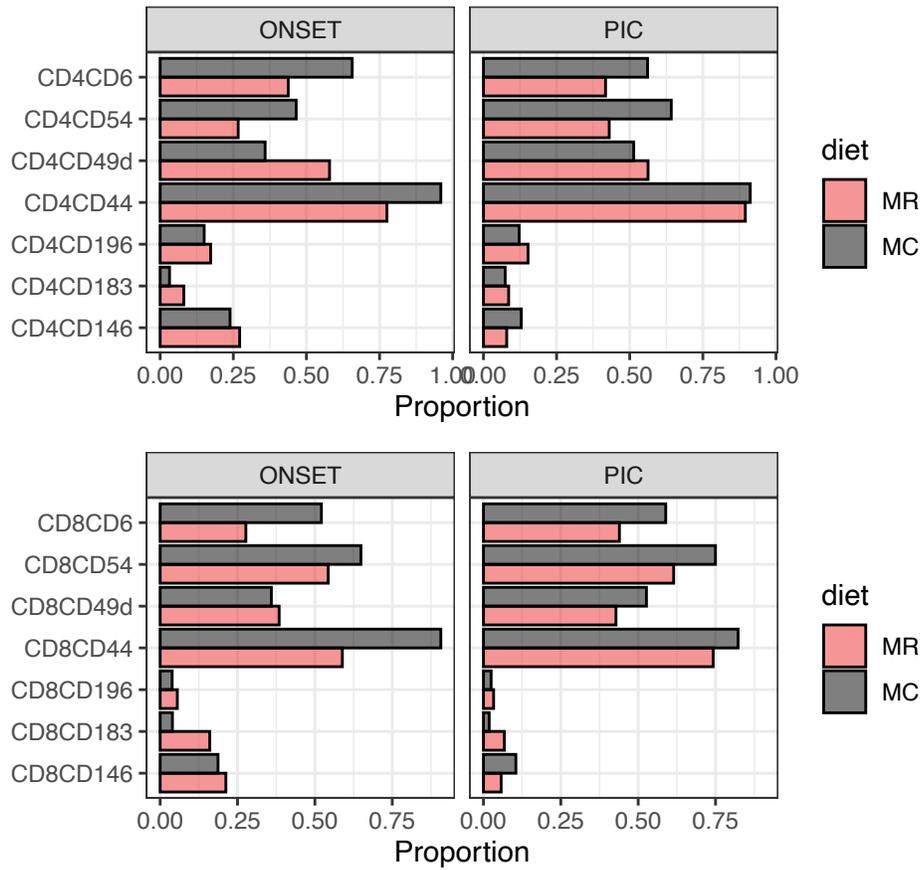


Figure 29. – Proportions de lymphocytes T exprimant des marqueurs de surface dans le SNC en EAE active

Proportions de lymphocytes T CD4 (en haut) ou CD8 (en bas) exprimant CD6, CD54, CD49d, CD44, CD196, CD183 ou CD146 et infiltrant le SNC des souris sur la diète contrôle (MC) ou réduite en méthionine (MR) à différentes phases post-immunisation en EAE active: début des symptômes (ONSET) et pic des symptômes (PIC).

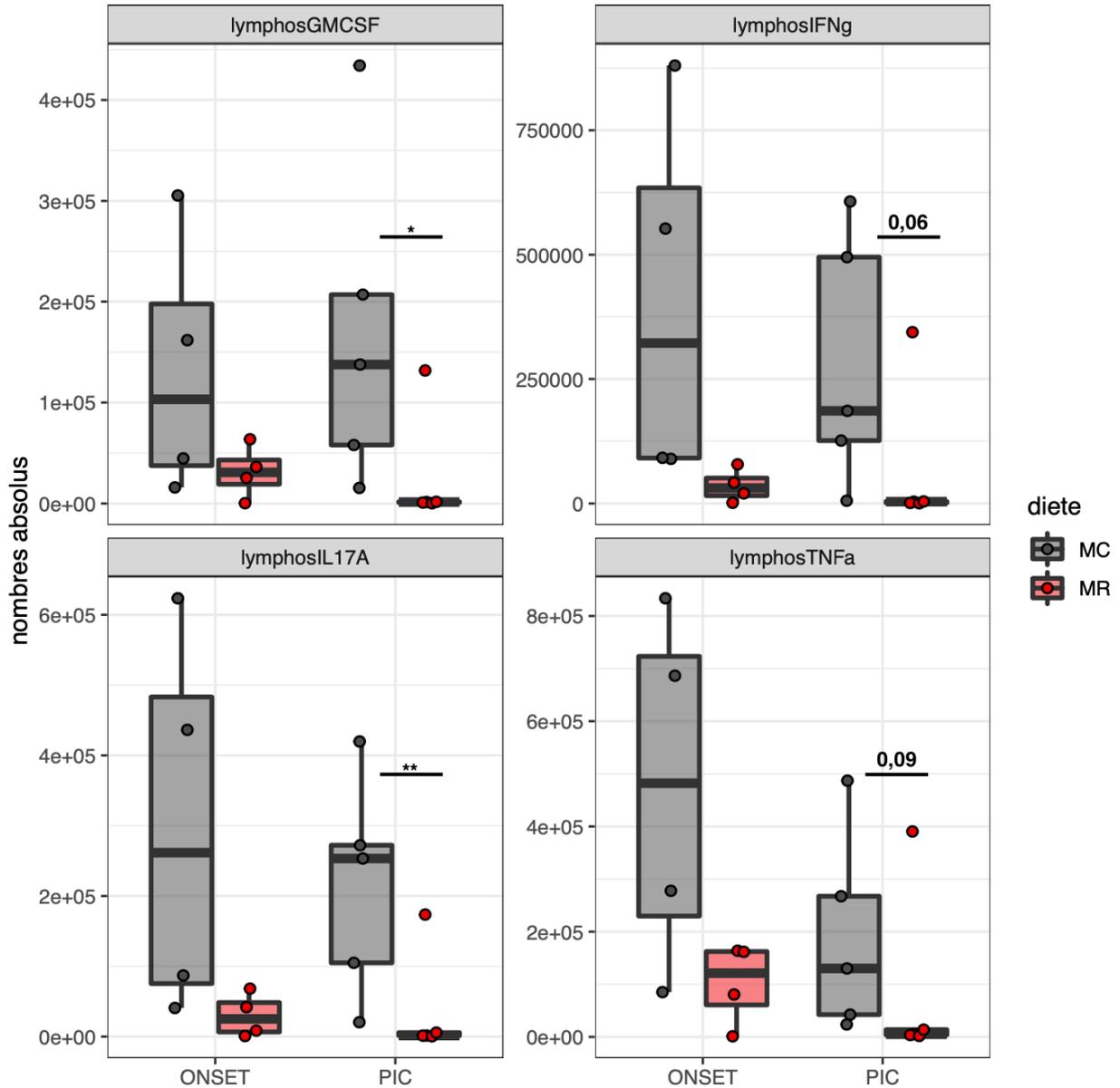


Figure 30. – Nombres absolus de lymphocytes exprimant des cytokines dans le SNC en EAE active

Diagrammes en boîte représentant les valeurs moyennes, minimales, et maximales des nombres absolus de lymphocytes CD45⁺CD11b⁻ exprimant GM-CSF, IFN- γ , IL17A ou TNF α et infiltrant le SNC des souris sur la diète contrôle (MC) ou réduite en méthionine (MR) à différentes phases post-immunisation en EAE active: début des symptômes (ONSET) et pic des symptômes (PIC). Les analyses statistiques effectuées sont des tests Mann-Whitney ou t de Student lorsqu'appropriés. Chaque point représente une souris.

En accord avec les observations précédentes qui ne démontrent pas de différences au niveau des populations leucocytaires dans les ganglions lymphatiques drainants aux stades de l'EAE étudiés, le profil des lymphocytes T dans les ganglions lymphatiques n'est pas différent chez les souris soumises à une diète MR par rapport à celles sous diète MC. Dans la rate, durant la phase présymptomatique, la diète MR est associée à une réduction non significative du nombre de lymphocytes T qui expriment des molécules d'adhérence ou ligands, et récepteurs de chimiokines, et à une réduction significative du nombre de lymphocytes exprimant des cytokines pro-inflammatoires. Ces différences sont moins notables durant les autres phases de l'EAE. Toutefois, au début et au pic des symptômes, les lymphocytes exprimant des marqueurs de surface et cytokines pro-inflammatoires sont en nombre réduit dans le SNC des souris sur la MR.

La restriction de la méthionine dans la diète est associée à un délai significatif de l'apparition et de la progression des déficits neurologiques cliniques en EAE active chez les femelles C57BL/6. La réduction significative de l'expansion et de l'activation des lymphocytes en périphérie (rate) observée chez les souris exposées à la diète MR est en accord avec le délai d'apparition des symptômes cliniques. Bien que le développement des déficits neurologiques soit significativement retardé par la MR, les souris du groupe MR développent éventuellement des symptômes, ce qui peut s'expliquer par l'atténuation des différences avec le temps. Le nombre de lymphocytes qui expriment des cytokines pouvant déstabiliser la BHE et recruter d'autres populations leucocytaires étant initialement significativement restreint par la diète MR, l'infiltration du SNC par les leucocytes périphériques est significativement diminuée, ce qui peut expliquer le retard d'apparition et la moindre sévérité des symptômes chez les souris du groupe MR par rapport au groupe MC. L'ensemble des résultats présentés montrent que la diète réduite en méthionine a des effets protecteurs en EAE en retardant l'activation immunitaire périphérique et l'infiltration du SNC qui lui sont associés.

4. L'inhibition de la conversion de la méthionine en SAM dans les lymphocytes T CD4 influence l'apparition des symptômes d'EAE passive et l'infiltration centrale de cellules immunitaires

L'inhibition de la conversion de la méthionine en SAM dans les lymphocytes TH17, à travers l'utilisation de petits ARN en épingle à cheveux ou *short hairpin RNA* (shRNA) dirigés contre Mat2a, induit une réduction des marques de méthylation au niveau des histones, notamment H3K4me3 associée à une transcription génique active (figure 31A), ainsi qu'une réduction du nombre de lymphocytes TH17 et TH1 (figure 31B-C) (Roy et al. 2020).

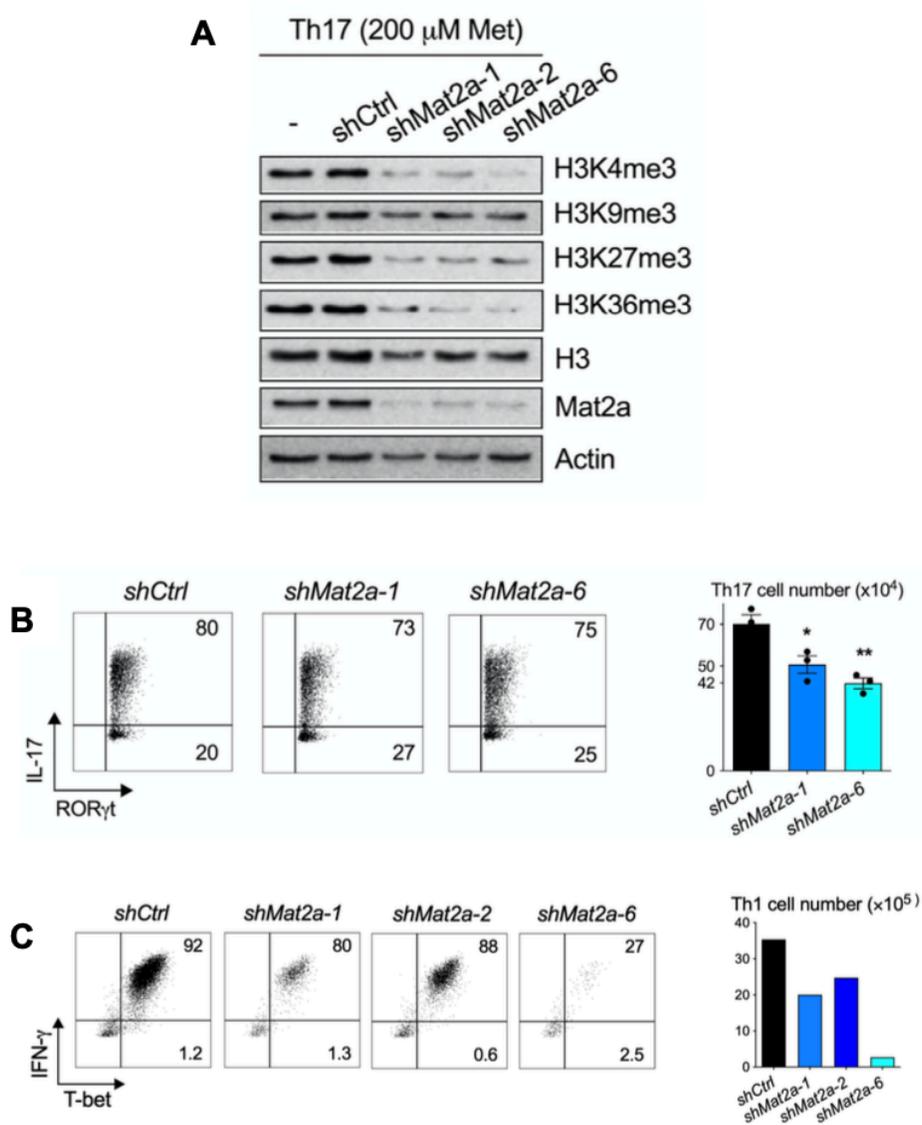


Figure 31. – Inhibition de la conversion de la méthionine en SAM in vitro

(A) Immunoblot des niveaux de méthylation H3K4me, H3K9me3, H3K27me3 et H3K36me3 des histones dans des lymphocytes TH17 exprimant un shRNA contrôle (shCtrl) ou ciblant Mat2a (shMat2a-1,2,6). Les niveaux de H3, Mat2a et actine sont indiqués comme contrôles. (B) Expression de ROR γ t et IL-17 par des lymphocytes TH17 exprimant un shRNA contrôle (shCtrl) ou ciblant (shMat2a-1,6) et nombre de lymphocytes TH17 récupérés après les différentes conditions de culture in vitro. (C) Expression de T-bet et IFN- γ par des lymphocytes TH1 exprimant un shRNA contrôle (shCtrl) ou ciblant (shMat2a-1,2,6) et nombre de lymphocytes TH1 récupérés après les différentes conditions de culture in vitro. Figures utilisées avec permission (Roy et al. 2020).

Les résultats *in vitro* et présentés en EAE active suggèrent que les effets protecteurs de la réduction du contenu en méthionine dans la diète en EAE active sont dus au moins en partie, à l'impact direct spécifique de la MR sur le métabolisme de la méthionine dans les lymphocytes T CD4, et en particulier son rôle dans la production de SAM. Afin de vérifier cette hypothèse et d'isoler l'impact de la manipulation du métabolisme de la méthionine dans la population des lymphocytes T CD4, nous avons utilisé un shRNA pour inhiber l'expression de Mat2a dans des lymphocytes T activés reconnaissant le MOG₃₅₋₅₅ avant transfert dans des souris RAG2^{-/-}. En se basant sur son efficacité *in vitro*, le shMat2a-6 a été testé dans un modèle d'EAE passive *in vivo* (figure 32).

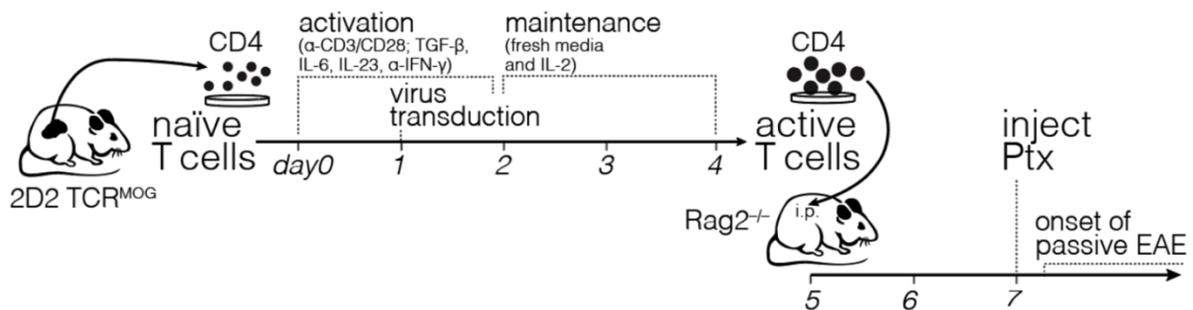


Figure 32. – Méthodologie expérimentale pour l'EAE passive

Les lymphocytes T CD4 des souris transgéniques 2D2 TCR^{MOG} sont isolés de leur rate et GL inguinaux et axillaires. Ils sont mis en culture pour les polariser en TH17 et sont infectés avec un shRNA contrôle ou un shRNA dirigé contre Mat2a. Après la culture, les cellules sont transférées dans des souris RAG2^{-/-}. Figure utilisée avec permission (Roy et al. 2020).

En accord avec les résultats en EAE active (figure 9), l'inhibition de Mat2a dans les lymphocytes T CD4 est associée à une incidence significativement diminuée des symptômes de l'EAE et un retard significatif de leur apparition (figure 33A). Le pourcentage de cellules positives pour amétrine, tag associé au shRNA utilisé, est mesuré avant le transfert des lymphocytes T CD4 aux souris RAG2^{-/-} et 2-3 semaines après celui-ci. La transduction des lymphocytes T CD4 avec le shRNA contrôle n'a

pas d'impact sur le développement de symptômes cliniques chez les souris receveuses et n'affecte pas la capacité des lymphocytes à proliférer dans la rate et à infiltrer le SNC (figure 33B). Cependant, l'incidence de l'EAE clinique est réduite et la proportion des cellules positives pour amétrine est significativement diminuée dans la rate et le SNC des souris receveuses de CD4 transduites avec le shRNA dirigé contre Mat2a, montrant que l'inhibition de Mat2a dans les CD4 est associée à une réduction de l'expansion des lymphocytes T CD4 qui expriment le shRNA Mat2a (figure 33B). De plus, l'inhibition de Mat2a dans les lymphocytes T CD4 inducteurs de la maladie (réactifs contre MOG) est associée avec une réduction du nombre de cellules immunitaires CD45 et de lymphocytes T CD4 dans le SNC (figure 33C-D).

Ces résultats démontrent qu'inhiber l'activité de Mat2a dans les lymphocytes T CD4, a un impact sur leur capacité à proliférer dans la rate, et sur leur capacité à proliférer dans le SNC et/ou l'infiltrer. Inhiber l'activité de Mat2a dans les lymphocytes T CD4 semble également avoir un impact bénéfique au niveau clinique.

Finalement, ceci suggère que les effets protecteurs de la diète réduite en méthionine en EAE active sont au moins en partie attribuables à l'impact de la manipulation du cycle de la méthionine dans les lymphocytes T CD4, qui a un impact sur la prolifération et la fonction des lymphocytes pro-inflammatoires et pathogènes.

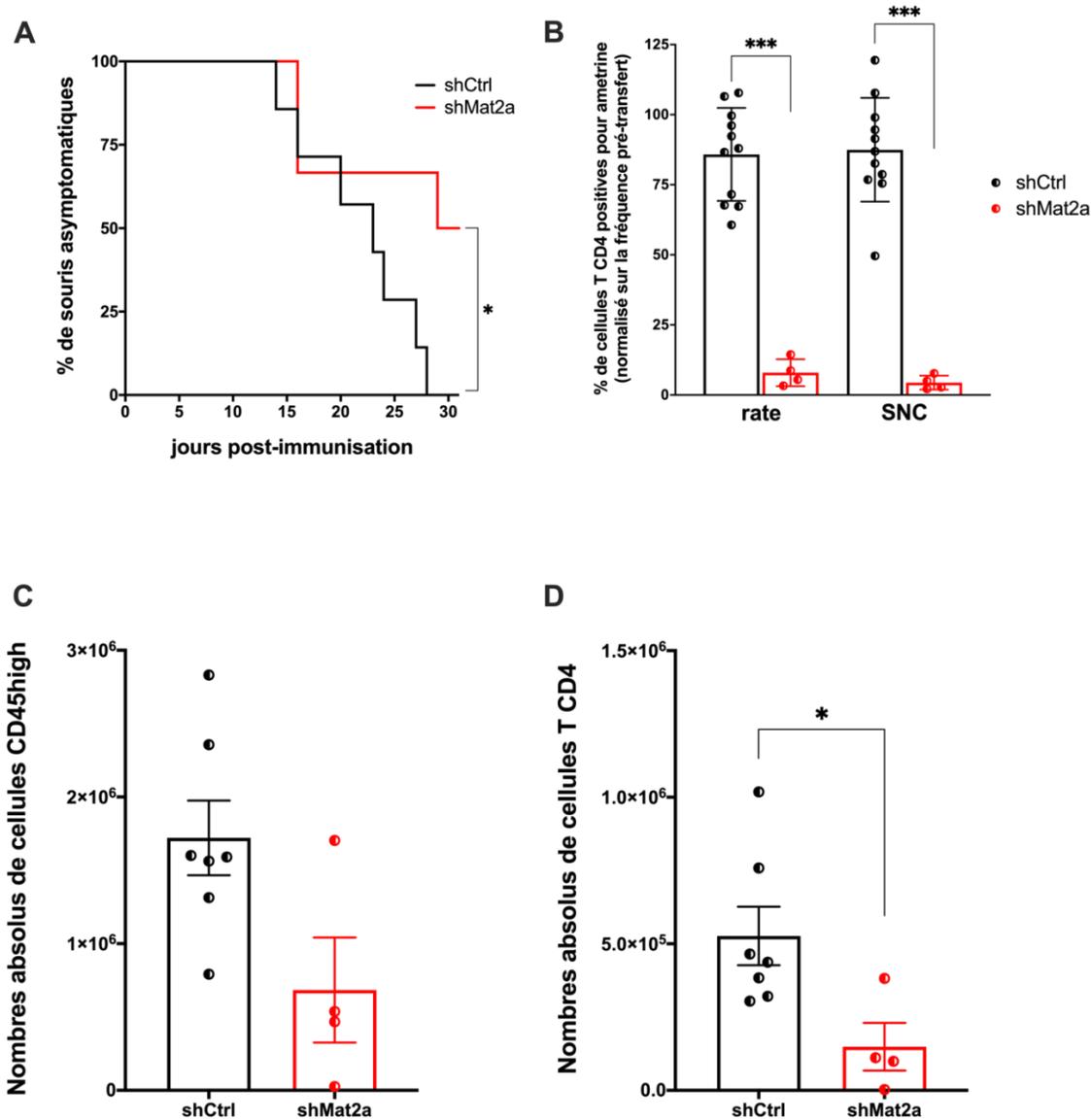


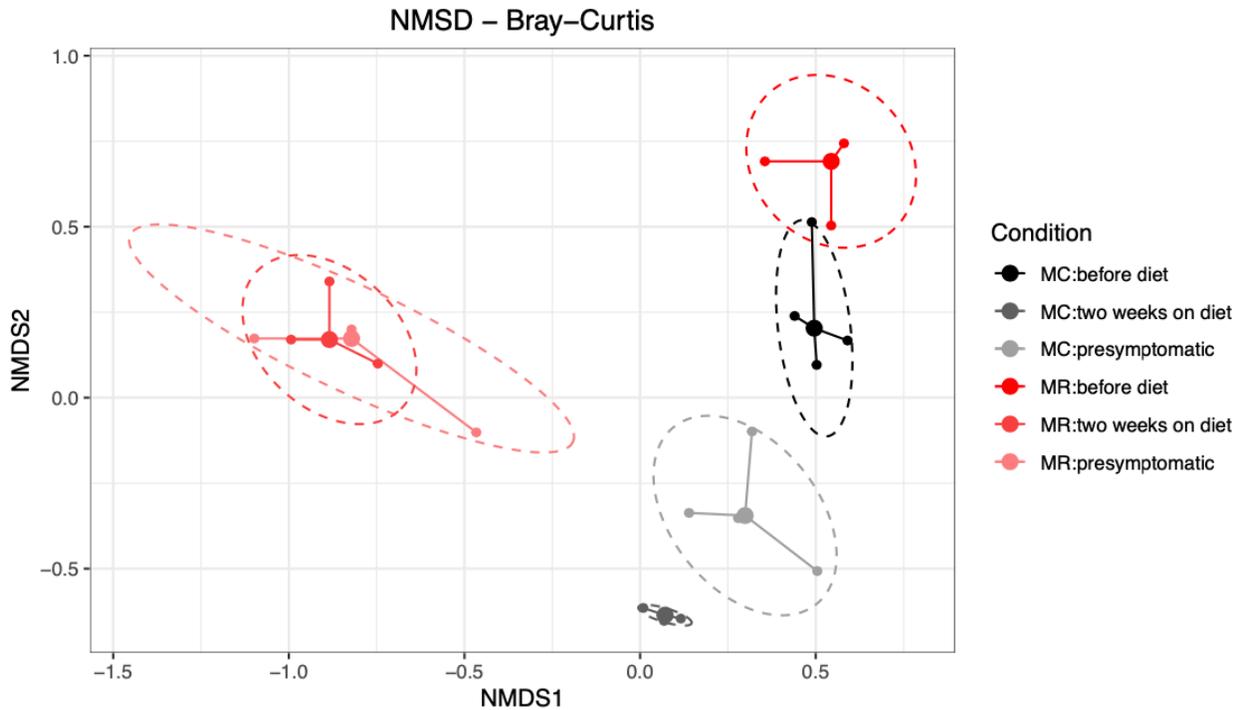
Figure 33. – Impact de l’inhibition de Mat2a dans les lymphocytes T CD4

(A) Proportion de souris RAG2^{-/-} asymptomatiques après transfert de lymphocytes T CD4 infectés avec un shRNA contrôle (shCtrl) ou un shRNA dirigé contre Mat2a (shMat2a). (B) Proportions de lymphocytes T CD4 positifs pour amétrine (marquage de la transduction contrôle (shCtrl) ou Mat2a (shMat2a)) normalisées sur la fréquence pré-transfert. (C, D) Nombres absolus de cellules CD45^{high} (C) et CD4 (D) infiltrant le SNC des souris RAG2^{-/-} après transfert de lymphocytes T CD4 infectés avec un shRNA contrôle (shCtrl) ou un shRNA dirigé contre Mat2a (shMat2a). Les résultats représentent la moyenne \pm SD (B) ou \pm SEM (C, D). Les analyses statistiques effectuées sont des tests Mantel-Cox (A), Kruskal-Wallis (B), et Mann-Whitney (D). Chaque point représente une souris.

5. La restriction alimentaire en méthionine influence la composition du microbiome intestinal

Le microbiome intestinal est altéré en SEP et influence l'évolution de l'EAE (Jangi et al. 2016; Berer et al. 2017; Ochoa-Reparaz et al. 2009). La diète est une intervention pouvant modifier le microbiome intestinal et l'évolution de la SEP et de l'EAE (Sanchez et al. 2020). La restriction en méthionine affecte la méthylation des histones et limite l'expansion des lymphocytes TH17 pro-inflammatoires (Roy et al. 2020). Nous avons démontré que la restriction diététique en méthionine retarde le développement des déficits neurologiques en EAE active, et réduit l'expansion et l'activation des lymphocytes en périphérie ainsi que l'infiltration de leucocytes dans le SNC. Afin de vérifier si la restriction alimentaire en méthionine influence la composition du microbiome intestinal dans notre modèle, nous avons effectué un séquençage de régions variables de l'ARNr 16S contenu dans les bactéries, à partir de la matière fécale de femelles C57BL/6, avant l'introduction à la MR ou la MC, deux semaines après l'introduction à la diète, et au stade présymptomatique de l'EAE, soit 7 jours après l'immunisation au MOG.

La diversité bêta est une mesure de la biodiversité consistant à comparer la diversité des espèces entre les échantillons. Elle peut se mesurer à l'aide de la distance de Bray-Curtis qui permet d'évaluer la dissimilarité entre deux échantillons, et qui est représentée sur une échelle multidimensionnelle (NMDS). Dans notre modèle, le microbiome est affecté dans le temps par la diète, mais pas de la même manière par la MC et la MR. Le microbiome change après deux semaines sur la diète contrôle MC et après immunisation des souris au MOG₃₅₋₅₅ alors qu'il change après deux semaines sur la diète réduite en méthionine MR mais reste stable au stade présymptomatique de l'EAE sur la diète MR. Toutefois, même si les différences sont statistiquement non significatives, le microbiome des souris du groupe MC diffère légèrement de celui des souris du groupe MR avant l'introduction à la diète, ce qui peut avoir influencé les résultats (figure 34).



PERMANOVA test :

- **Diète $p < 0.001$**
- **Temps $p < 0.001$**
- **Intéraction $p < 0.001$**

		MC		MR		
		2 weeks	presympt	before	2 weeks	presympt
MC	before	0.028	0.030	0.086	0.029	0.029
	2 weeks	-	0.028	0.029	0.029	0.029
	presympt	-	-	0.029	0.029	0.029
MR	before	-	-	-	0.10	0.10
	2 weeks	-	-	-	-	0.70

Figure 34. – Distance de Bray-Curtis et diversité bêta dans le microbiome des femelles C57BL/6

La distance de Bray-Curtis mesure la diversité bêta du microbiome des femelles C57BL/6 avant l'introduction à la diète contrôle MC ou réduite en méthionine MR (before diet), deux semaines après l'introduction à la diète (two weeks on diet), et au stade présymptomatique de l'EAE soit 7 jours après l'immunisation au MOG₃₅₋₅₅ (presymptomatic). Le test PERMANOVA est utilisé pour déterminer les différences significatives parmi les différents groupes, et le tableau représente les résultats des tests post-hoc.

Une analyse différentielle d'abondance permet ensuite de déterminer quelles bactéries différencient les microbiomes des souris sous la MC ou la MR (figure 35). La technique de séquençage utilisée permet de classifier les bactéries en différents niveaux : le phylum, la classe, l'ordre, la famille et le genre. Ainsi, toutes les classifications bactériennes suivantes sont plus abondantes dans le microbiome des souris sous la MC : le phylum *Verrucomicrobia*, la classe *Verrucomicrobiae*, l'ordre *Verrucomicrobiales*, la famille *Akkermansiaceae*, et le genre *Akkermansia*. En outre, *Akkermansia*, augmenté chez les patients SEP, est corrélé à des voies pro-inflammatoires comme la régulation à la hausse des gènes impliqués dans la présentation antigénique (Jangi et al. 2016).

Les acides gras à chaîne courte sont des métabolites produits par fermentation bactérienne de carbohydrates non digestibles et possédant des effets immunorégulateurs et anti-inflammatoires. Les acides gras à chaîne courte les plus abondants sont l'acétate, le propionate et le butyrate produits par des espèces dans les phylums *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, et *Actinobacteria* (Melbye et al. 2019). Le genre *Faecalibaculum* appartenant au phylum *Firmicutes* est augmenté dans le microbiome des souris du groupe MR (figure 35). La classe de bactéries *Bacilli*, dans laquelle on retrouve l'ordre *Lactobacillales* contenant le genre *Lactobacillus* de la famille *Lactobacillaceæ*, fait partie du phylum *Firmicutes*. Du phylum au genre, ils sont tous plus abondants dans le microbiome des souris sous la MR (figure 35). De surcoût, *Lactobacillus reuteri*, appartenant à la famille *Lactobacillaceae*, est associé à une réduction de la sévérité de l'EAE à travers une réduction de la proportion des lymphocytes TH1 et TH17 en périphérie (He et al. 2019). Le genre *Lactobacillus* est négativement corrélé au score clinique d'EAE, indiquant une amélioration, alors que le genre *Turicibacter*, plus abondant dans le microbiome des souris sous la MC, corrèle positivement avec le score clinique (He et al. 2019).

Ces résultats préliminaires démontrent que la restriction alimentaire en méthionine influence la composition du microbiome. Les souris sous la MR semblent posséder un microbiome enrichi en bactéries ayant des propriétés anti-inflammatoires et des effets bénéfiques en EAE.

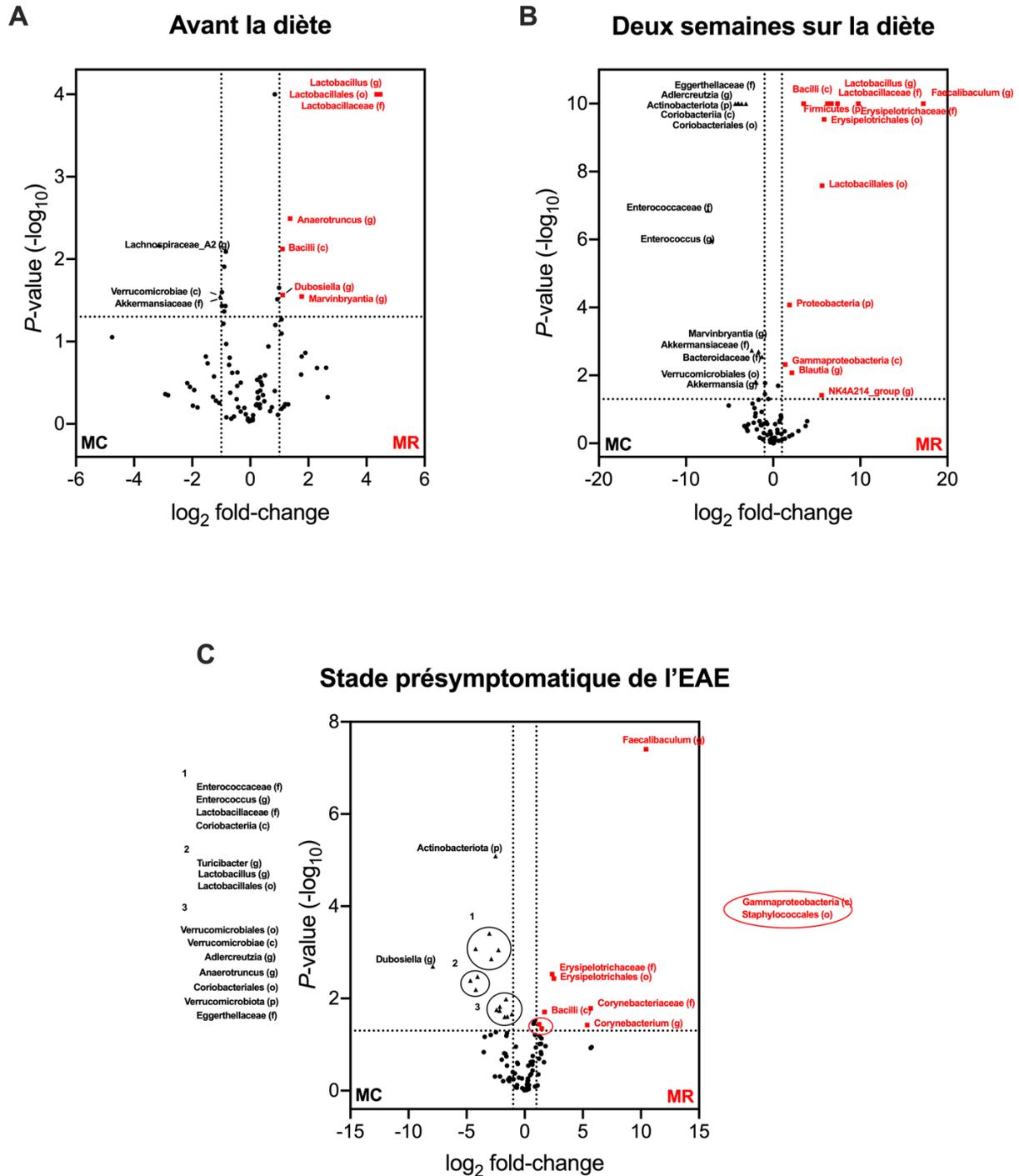


Figure 35. – Analyse différentielle d'abondance dans le microbiome des femelles C57BL/6

Analyse différentielle d'abondance dans le microbiome des souris (A) avant l'introduction à la diète contrôle MC ou réduite en méthionine MR, (B) deux semaines après l'introduction de la diète, et (C) au stade présymptomatique de l'EAE, soit 7 jours après l'immunisation.

Discussion

La méthionine joue un rôle important dans les processus de méthylation, étant l'unique source permettant de générer SAM, le donneur méthyl universel. Le métabolisme de la méthionine est induit lorsque les lymphocytes T sont activés, et ceux-ci utilisent la méthionine exogène pour synthétiser SAM. À travers notamment une modification des marques de méthylation sur les histones, la restriction en méthionine a un impact sur l'expression de gènes impliqués dans la prolifération et la fonction effectrice des lymphocytes TH17 in vitro (Roy et al. 2020). Une récente étude montre que les lymphocytes T naïfs expriment les enzymes clés appartenant au cycle de la méthionine mais ne peuvent pas transporter suffisamment de méthionine pour alimenter le cycle. Ce dernier est initié lorsque le récepteur des lymphocytes T est activé par exemple contre un antigène et induit l'expression de transporteurs de la méthionine comme SLC7A5, déjà démontré important pour la différenciation des lymphocytes T in vitro et in vivo à travers notamment le transport de la leucine régulant l'activité de mTORC1. En outre, des lymphocytes T CD4 activés en l'absence de méthionine se développent incorrectement et ont une croissance anormale (Sinclair et al. 2019). Ceci corrobore nos résultats et suggère que l'activation, la fonction effectrice, et la prolifération des lymphocytes T dépendent de l'apport en méthionine extracellulaire et ne peuvent pas s'appuyer sur la voie de récupération de la méthionine.

La restriction diététique en méthionine prolonge la durée de vie de plusieurs espèces animales, augmente la dépense énergétique, et réduit l'accumulation des graisses. Ce régime alimentaire s'est prouvé bénéfique dans plusieurs conditions comme l'obésité, le diabète et le cancer. Fondée sur nos résultats in vitro et l'amélioration du profil inflammatoire en périphérie apportée par la réduction de la méthionine dans l'alimentation, l'hypothèse était que la manipulation du métabolisme des lymphocytes T via la restriction diététique en méthionine représente une nouvelle voie thérapeutique pour contrôler les maladies neuroinflammatoires comme la SEP.

Tout d'abord, nous avons montré que la restriction alimentaire en méthionine est associée à un délai significatif de l'apparition des symptômes en EAE active avec des femelles C57BL/6 immunisées au MOG₃₅₋₅₅. La restriction alimentaire en méthionine semble également associée à

une moindre sévérité des symptômes neurologiques. Le score clinique des souris sous la MR atteint son pic lorsque le score clinique des souris sous la MC diminue après avoir atteint son maximum, ce qui correspond à la période post-immunisation où les courbes de score clinique d'EAE se rejoignent. Au niveau périphérique, aucune différence significative n'est observée dans les ganglions lymphatiques notamment durant le stade présymptomatique de l'EAE. Les cellules immunitaires d'abord présentes dans les ganglions lymphatiques drainants migrent dans la rate et infiltrent ensuite le SNC. Ainsi, des différences auraient possiblement été observées si le profil immunitaire des souris avait également été analysé autour du jour 4 post-immunisation (Larochelle et al. 2015). Toutefois, l'expansion des cellules immunitaires, en particulier les populations lymphocytaires, est significativement limitée en périphérie dans la rate des souris sous la MR durant le stade présymptomatique de l'EAE. Les nombres absolus de lymphocytes exprimant les cytokines pro-inflammatoires GM-CSF, IFN- γ , IL-17A et TNF α sont significativement réduits ou tendent à être réduits dans la rate des souris sous la MR durant les stades présymptomatique et début des symptômes de l'EAE. Une tendance à l'expression moindre des molécules d'adhérence (MCAM, ICAM-1) ou ligands (CD49d, CD6) et récepteurs de chimiokines (CCR6, CXCR3) sur les lymphocytes est également observée en périphérie dans la rate des souris sous la MR durant le stade présymptomatique de l'EAE. Les cytokines TNF α et IFN- γ peuvent moduler l'expression des chimiokines, cytokines et molécules d'adhérence par les cellules endothéliales de la BHE, elles induisent notamment l'expression des chimiokines CXCL10 et CXCL9, ligands de CXCR3, et des molécules d'adhérence VCAM-1 et ALCAM qui interagissent avec CD49d et CD6 respectivement. La cytokine IL-17A, quant à elle, promeut la perturbation de la BHE et la migration de leucocytes. L'infiltration leucocytaire dans le SNC des souris sous la MR est significativement réduite durant les stades d'apparition et pic des symptômes de l'EAE. Ceci pourrait s'expliquer par l'expansion significativement limitée des cellules immunitaires en périphérie dans la rate, ainsi que par l'expansion limitée de lymphocytes exprimant des cytokines pro-inflammatoires favorisant la perturbation de la BHE, l'interaction des lymphocytes avec les cellules endothéliales de la BHE et le recrutement de leucocytes dans le SNC.

L'EAE est le modèle animal le plus utilisé pour étudier la SEP, et une part importante de nos connaissances sur la pathobiologie de la SEP découlent des recherches avec celui-ci. L'EAE partage

des caractéristiques cliniques et pathologiques avec la SEP, et est couramment utilisé pour analyser les mécanismes moléculaires de la réponse inflammatoire auto-immune, ainsi que pour développer et tester des nouvelles thérapies pour la SEP. Néanmoins, plusieurs disparités importantes et à prendre en considération existent entre la SEP et l'EAE. Par exemple, les agents infectieux constituent un facteur de risque pour la SEP, et les patients peuvent également développer de nouvelles infections, tandis que les souris sont préservées dans un environnement sans pathogène. La SEP est une maladie spontanée alors que l'EAE active ou passive est une maladie induite par immunisation avec un peptide de myéline ou transfert adoptif de cellules réactivées contre un peptide de myéline. L'EAE active par immunisation au MOG₃₅₋₅₅ des souris C57BL/6 est monophasique, alors que la SEP peut se présenter sous plusieurs formes, la forme poussé-rémission étant la plus courante. De plus, chez les souris C57BL/6 l'EAE chez les mâles et les femelles est relativement similaire, alors que la SEP est plus fréquente chez les femmes. L'EAE est majoritairement médiée par l'action des lymphocytes pro-inflammatoires TH1 et TH17. Dans le cadre de notre étude, le choix de ce modèle est approprié pour étudier l'effet in vivo de la restriction en méthionine car nous avons montré in vitro qu'elle a un impact sur l'expansion et la fonction de ces lymphocytes. Toutefois, de manière générale, l'EAE limite la variabilité des voies pathogéniques pouvant être étudiées et ne reflète pas l'hétérogénéité des mécanismes de la SEP (Friese et al. 2006). En particulier, l'EAE active est un modèle basé sur la réponse CD4 et le rôle des lymphocytes B ou T CD8 est vraisemblablement moins important en EAE active qu'en SEP (Rangachari et al. 2017).

La restriction alimentaire en méthionine aurait des effets métaboliques différents en fonction du sexe. En effet, une étude démontre qu'une privation en méthionine à court terme induit une augmentation de la consommation d'énergie à travers des mécanismes différents chez les mâles et femelles même si elle apporte des bénéfices métaboliques similaires. Il s'agit de la première étude proposant que des mécanismes dimorphiques seraient impliqués dans l'effet de la méthionine alimentaire sur le métabolisme (Yu et al. 2018).

Basé sur cette assertion, les limitations du modèle d'EAE active induite par le MOG, et le dimorphisme sexuel observé en SEP, il serait pertinent d'étudier l'impact de la manipulation du cycle de la méthionine et de la restriction alimentaire en méthionine sur l'activation périphérique

et centrale en neuroinflammation en fonction du sexe. Les souris transgéniques SJL/TCR1640, disponibles dans notre laboratoire, constituent un bon modèle pour remplir cet objectif. Les femelles sont généralement atteintes d'une forme poussée-rémission de l'EAE et sont plus susceptibles de développer des symptômes par rapport aux mâles, reproduisant les différences hommes/femmes observées en SEP. Contrairement à l'EAE active qui nécessite une immunisation, les souris TCR1640 possèdent à la surface de leurs lymphocytes T un TCR transgénique reconnaissant le MOG₉₂₋₁₀₆ et développent spontanément des symptômes moteurs. Les souris peuvent être suivies pendant plusieurs mois, ce qui en fait un bon modèle d'EAE chronique, et ceci est particulièrement intéressant pour évaluer l'impact de la restriction alimentaire en méthionine sur l'inflammation périphérique et centrale à long terme.

Ensuite, nous avons montré que l'inhibition de la conversion de la méthionine en SAM dans les lymphocytes T CD4, à travers l'utilisation d'un shRNA ciblant l'expression de Mat2a, est associée à une incidence significativement diminuée des symptômes moteurs en EAE passive, et une réduction significative du nombre de lymphocytes T CD4 dans le SNC. Ces résultats suggèrent que les effets protecteurs de la restriction alimentaire en méthionine en EAE active seraient en partie attribuables à l'impact de la manipulation du cycle de la méthionine dans les lymphocytes T CD4. Cette piste pourra être approfondie grâce à l'utilisation de la souris Mat2a-flox, développée par nos collaborateurs, pouvant être croisée avec la souris CD4-cre. Ainsi, il sera possible de déterminer l'impact de la délétion de Mat2a dans les lymphocytes T CD4 en EAE active ou passive, ainsi que d'évaluer l'impact de la délétion de Mat2a dans d'autres types cellulaires comme les lymphocytes B ou les oligodendrocytes en croisant la souris Mat2a-flox avec une souris CD19-cre ou CNP-cre respectivement. Les résultats en EAE active montrent que la restriction alimentaire en méthionine affecte en périphérie et au niveau central non seulement les nombres absolus de lymphocytes T CD4 et CD8 et lymphocytes B, mais également de cellules myéloïdes comme les cellules dendritiques connues pour leur fonction de présentation antigénique. Jusqu'à présent, nos recherches sont focalisées sur l'impact du métabolisme de la méthionine sur la prolifération et la fonction des lymphocytes T CD4, mais il y aurait vraisemblablement un effet sur d'autres types cellulaires, ce qui serait intéressant à explorer.

La restriction alimentaire en méthionine est possible chez l'humain mais peut s'avérer difficilement réalisable, deux alternatives attrayantes sont les inhibiteurs de Mat2a et les méthioninases. Le potentiel thérapeutique des inhibiteurs de Mat2a fait l'objet d'une étude clinique pour le cancer à la suite d'une étude préclinique suggérant leur effet bénéfique (Sanderson et al. 2019). Deux autres composés ciblant Mat2a ont été décrits, le premier est un inhibiteur naturel, et le deuxième est un modulateur allostérique qui inhibe Mat2a lorsque les niveaux de méthionine et de SAM sont élevés (Bai et al. 2019; Quinlan et al. 2017). Cibler l'activité de l'enzyme Mat2a pour manipuler le métabolisme de la méthionine est donc une possibilité en développement. Alternativement, les méthioninases dégradent la méthionine en α -cétobutyrate, méthanethiol et ammoniac, plutôt qu'en SAM (Kreis and Hession 1973). Des essais cliniques ont démontré auparavant que l'administration de méthioninase est tolérable et diminue les niveaux de méthionine dans le sérum (Tan et al. 1997; Tan et al. 1996). Le potentiel des méthioninases n'a pas été approfondi depuis la publication de ces recherches mais fait l'objet d'un récent regain d'intérêt. Précédemment administrées par injection, les méthioninases recombinantes peuvent être administrées oralement et sont efficaces dans un modèle murin de cancer pancréatique (Kawaguchi et al. 2018). Les méthioninases recombinantes orales sont associées à la prévention de maladie hépatique non alcoolique, de l'obésité et du diabète chez des souris nourries d'une diète riche en gras, ainsi qu'à la régression de la croissance tumorale dans un modèle murin de cancer du côlon lorsque combinées à des traitements chimiothérapeutiques (Tashiro, Han, Tan, Sugisawa, Yamamoto, Nishino, Inubushi, Higuchi, et al. 2020; Tashiro, Han, Tan, Sugisawa, Yamamoto, Nishino, Inubushi, Sun, Lim, et al. 2020; Tashiro, Han, Tan, Sugisawa, Yamamoto, Nishino, Inubushi, Sun, Zhu, et al. 2020; Park et al. 2019). L'administration de méthioninases recombinantes orales chez l'humain diminue les niveaux circulants de méthionine et n'aurait pas d'effets secondaires majeurs (Han, Tan, and Hoffman 2020). Ces résultats, tant chez l'humain que dans des modèles animaux, sont prometteurs concernant l'utilisation des méthioninases pour manipuler le métabolisme de la méthionine, mais leur impact en neuroinflammation n'est pas connu.

Enfin, nous avons montré que la restriction alimentaire en méthionine semble influencer la composition du microbiome intestinal des femelles C57BL/6. Les résultats préliminaires

suggèrent que le microbiome des souris sous la MR est enrichi en bactéries ayant des propriétés anti-inflammatoires et des effets bénéfiques en EAE. Même si les différences ne sont pas statistiquement significatives, le microbiome des souris est différent entre les deux groupes avant l'introduction à la diète. Cet écart pourrait être causé par la provenance des souris de cages d'élevage différentes, mais ceci peut être rectifié à l'avenir lors de futures expériences en contrôlant la répartition des souris dans les cages pour que chaque groupe de diète ait partagé le même environnement jusqu'au prélèvement des matières fécales du *baseline* et l'assignation à la diète expérimentale.

Les effets de la restriction alimentaire en méthionine sur le profil du microbiome intestinal sont encore peu rapportés et certains résultats peuvent se contredire (Nichenametla et al. 2020; Wallis, Melnyk, and Miousse 2020; Yang et al. 2019). Ces études ont été réalisées avec des mâles C57BL/6 âgés de 21 semaines (Nichenametla et al. 2020; Yang et al. 2019) ou 5 semaines (Yang et al. 2019) ou des femelles et mâles C57BL/6 âgés de 5 mois (Wallis, Melnyk, and Miousse 2020) au début des expériences. Les différentes diètes contenaient 0,12% (Nichenametla et al. 2020), 0,17% (Yang et al. 2019) ou 0,15% (Wallis, Melnyk, and Miousse 2020) de méthionine. Concernant le séquençage 16S, celui-ci a été réalisé après extraction de l'ADN bactérien provenant des selles (Nichenametla et al. 2020), du colon (Yang et al. 2019) ou du cæcum (Wallis, Melnyk, and Miousse 2020) des souris. Les expériences ayant été conceptualisées différemment, ceci pourrait expliquer la contradiction de certains résultats. En effet, le sexe, l'âge, le poids et la prise alimentaire des souris, la formulation de la diète et l'échantillon utilisé pour le séquençage 16S sont des facteurs pouvant être responsables de ces différences. Tous ces facteurs ont éventuellement influencé nos résultats également, notamment l'augmentation de l'acide glutamique pour compenser la réduction en méthionine par rapport à notre diète contrôle. En accord avec nos résultats, des études observent une augmentation de l'abondance du phylum Firmicutes (Nichenametla et al. 2020; Yang et al. 2019) et du genre *Lactobacillus* (Yang et al. 2019). Cependant, la tendance inverse est observée pour l'abondance des Firmicutes dans une autre étude (Wallis, Melnyk, and Miousse 2020). Cette différence pourrait s'expliquer par la présence de cystéine seulement dans la formulation de la diète utilisée dans cette dernière étude et qui peut abroger certains phénotypes de la MR (Nichenametla et al. 2020). De façon intéressante, une étude rapporte une

augmentation de l'abondance de la famille Bacteroidaceae et du genre Akkermansia dans le microbiome intestinal des souris sous une diète contenant 0,65% de méthionine (Wallis, Melnyk, and Miousse 2020), et la même tendance est observée dans le microbiome intestinal de nos souris sur la diète contrôle. Également en accord avec nos résultats, une autre étude rapporte une augmentation de l'abondance du genre Akkermansia dans le microbiome intestinal des souris sous une diète contenant 0,86% de méthionine (Yang et al. 2019).

La dysbiose intestinale en SEP et EAE a beaucoup gagné en popularité et fait l'objet de beaucoup de recherches. Le microbiome intestinal est un environnement très dynamique, influencé par une multitude de facteurs comme l'âge, le sexe et l'alimentation. Les résultats entre études peuvent se contredire, ce qui soulève des considérations importantes à prendre en compte concernant la méthodologie et la conception des études. Par exemple, étant donné que le microbiome intestinal est influencé par la région géographique, le recrutement des patients devrait se faire à partir de plusieurs géolocalisations afin d'avoir une meilleure représentation (Yatsunenkov et al. 2012). Les différents traitements des patients SEP peuvent avoir des effets variables sur le microbiome intestinal et ceci est à prendre en considération lorsque des patients non traités et traités sont inclus dans une étude (Katz Sand et al. 2019). Il pourrait être difficile de comparer plusieurs recherches si les protocoles d'extraction d'ADN, de séquençage, et de méta-analyse sont différents car ils peuvent affecter les résultats (D'Amore et al. 2016; Pollock et al. 2018). La plupart des études sur le microbiome intestinal n'adresse pas les différences hommes/femmes ou mâles/femelles, or la SEP atteint majoritairement des femmes.

Nos futures expériences, en utilisant les modèles d'EAE active avec les souris C57BL/6 et spontanée avec les souris TCR1640, permettront d'approfondir nos connaissances par rapport à l'effet de la prise alimentaire en méthionine sur la composition du microbiome intestinal entre les mâles et femelles. Elles permettront également d'évaluer les effets du microbiome des souris sous la MC ou la MR en le transférant dans des souris sans germes et en induisant une EAE. Les effets de l'alimentation et du microbiome intestinal en SEP et EAE ont majoritairement été étudiés séparément, mais quelques recherches font le lien entre l'alimentation, le microbiome, et la SEP et EAE. Une étude montre qu'une alimentation riche en sodium est associée à une réduction dans l'intestin de *Lactobacillus murinis*, qui supprime la réponse TH17 lorsqu'utilisé

comme traitement en EAE. Des souris sans germes, nourries d'une diète riche en sodium, ne montrent aucun changement de fréquence des TH17, suggérant l'importance du microbiome intestinal sur l'effet de la diète riche en sodium (Wilck et al. 2017). Une autre étude montre que le jeûne intermittent améliore l'EAE et modifie le microbiome intestinal. Le transfert du microbiome des souris sous jeûne intermittent dans des souris sans germe récapitule les effets bénéfiques observés (Cignarella et al. 2018).

La restriction alimentaire en méthionine est bénéfique pour l'inflammation en périphérie et nos résultats suggèrent qu'elle l'est également en neuroinflammation. Elle peut être contraignante mais des sondages auprès d'individus atteints de SEP suggèrent que beaucoup de patients sont intéressés à modifier leur alimentation pour réduire la sévérité de la maladie (Russell, Black, and Begley 2020). Une étude démontre que des patients SEP constatent et perçoivent que la nutrition, le stress, la température ambiante et l'activité physique ont un effet direct sur la gravité des manifestations symptomatiques quotidiennes (Karnoe et al. 2019). L'alimentation et le mode de vie peuvent influencer l'activité de la SEP mais il n'existe pas de lignes directrices concluantes sur lesquelles les patients peuvent s'appuyer. Différents essais d'intervention nutritionnelle ont été réalisés, mais le manque de conception robuste d'essais cliniques, la taille limitée des populations, et la durée limitée des études restent des défis à relever qui permettront ultimement d'établir les interventions nutritionnelles bénéfiques pour traiter la SEP et d'apporter des réponses aux patients. Si les effets bénéfiques de la réduction de la prise alimentaire de méthionine se confirment dans le modèle d'EAE spontanée TCR1640, il serait intéressant par la suite d'effectuer une étude pilote chez l'humain comparant par exemple une diète faible en méthionine avec suppléments de méthionine versus placebo, et d'en observer l'impact sur le profil immunitaire dans le sang périphérique et la composition du microbiome dans l'intestin. Bien que plusieurs expériences soient encore nécessaires avant de pouvoir conclure au potentiel thérapeutique de la manipulation du métabolisme de la méthionine en SEP, nos résultats suggèrent qu'il s'agit d'une avenue prometteuse.

Conclusion

La SEP est une maladie inflammatoire et démyélinisante du SNC, et les lymphocytes pro-inflammatoires CD4 TH1 et TH17 sont considérés pathogéniques en SEP et dans son modèle animal EAE. Notre collaborateur Dr Russell Jones a récemment montré que le métabolisme de la méthionine est induit lorsque les lymphocytes T sont activés in vitro. La restriction en méthionine affecte la méthylation des histones, et limite les marques permissives H3K4me3 sur les régions promotrices de gènes impliqués dans la prolifération et la fonction des lymphocytes TH17. La restriction alimentaire en méthionine étant associée à une amélioration du profil inflammatoire en périphérie, l'hypothèse était que la manipulation du métabolisme des lymphocytes T via la restriction diététique en méthionine représente une nouvelle voie thérapeutique pour contrôler les maladies neuroinflammatoires telles que la SEP. Nos résultats montrent que la restriction alimentaire en méthionine est associée à un délai significatif de l'apparition des symptômes en EAE active chez des femelles C57BL/6 immunisées au MOG₃₅₋₅₅. L'expansion des leucocytes, particulièrement les lymphocytes, est significativement limitée dans la rate des souris sous la MR au stade présymptomatique de l'EAE, et l'infiltration de cellules immunitaires pro-inflammatoires dans le SNC de ces souris est significativement réduite durant les stades d'apparition et de pic des symptômes de l'EAE. De plus, l'inhibition de la conversion de la méthionine en SAM dans les lymphocytes T CD4 est associée à une incidence significativement diminuée des symptômes moteurs en EAE passive. Cibler l'expression de Mat2a dans les lymphocytes T CD4 est également associé à une réduction significative de ces cellules dans le SNC. Finalement, les résultats préliminaires suggèrent que la restriction alimentaire en méthionine influence la composition du microbiome intestinal des souris C57BL/6. Le microbiome des souris sous la MR, différent de celui des souris sous la MC, semble favoriser les bactéries ayant des propriétés anti-inflammatoires et des effets bénéfiques en EAE. Ainsi, la restriction alimentaire en méthionine est protectrice en EAE, et ceci serait en partie attribuable à son impact sur la manipulation du cycle de la méthionine dans les lymphocytes T CD4, et potentiellement sur la composition du microbiome intestinal.

Références bibliographiques

- Ables, G. P., C. E. Perrone, D. Orentreich, and N. Orentreich. 2012. 'Methionine-restricted C57BL/6J mice are resistant to diet-induced obesity and insulin resistance but have low bone density', *PLoS One*, 7: e51357.
- Aharoni, R. 2013. 'The mechanism of action of glatiramer acetate in multiple sclerosis and beyond', *Autoimmun Rev*, 12: 543-53.
- Alcina, A., M. Abad-Grau Mdel, M. Fedetz, G. Izquierdo, M. Lucas, O. Fernandez, D. Ndagire, A. Catala-Rabasa, A. Ruiz, J. Gayan, C. Delgado, C. Arnal, and F. Matesanz. 2012. 'Multiple sclerosis risk variant HLA-DRB1*1501 associates with high expression of DRB1 gene in different human populations', *PLoS One*, 7: e29819.
- Alter, M., M. Yamoor, and M. Harshe. 1974. 'Multiple sclerosis and nutrition', *Arch Neurol*, 31: 267-72.
- Ambring, A., M. Johansson, M. Axelsen, L. Gan, B. Strandvik, and P. Friberg. 2006. 'Mediterranean-inspired diet lowers the ratio of serum phospholipid n-6 to n-3 fatty acids, the number of leukocytes and platelets, and vascular endothelial growth factor in healthy subjects', *Am J Clin Nutr*, 83: 575-81.
- Anderson, A. C., R. Chandwaskar, D. H. Lee, J. M. Sullivan, A. Solomon, R. Rodriguez-Manzanet, B. Greve, R. A. Sobel, and V. K. Kuchroo. 2012. 'A transgenic model of central nervous system autoimmunity mediated by CD4+ and CD8+ T and B cells', *J Immunol*, 188: 2084-92.
- Babaloo, Z., M. R. Aliparasti, F. Babaiea, S. Almasi, B. Baradaran, and M. Farhoudi. 2015. 'The role of Th17 cells in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis: interleukin-17A and interleukin-17F serum levels', *Immunol Lett*, 164: 76-80.
- Bai, J., Y. Gao, L. Chen, Q. Yin, F. Lou, Z. Wang, Z. Xu, H. Zhou, Q. Li, W. Cai, Y. Sun, L. Niu, H. Wang, Z. Wei, S. Lu, A. Zhou, J. Zhang, and H. Wang. 2019. 'Identification of a natural inhibitor of methionine adenosyltransferase 2A regulating one-carbon metabolism in keratinocytes', *EBioMedicine*, 39: 575-90.
- Barr, T. A., P. Shen, S. Brown, V. Lampropoulou, T. Roch, S. Lawrie, B. Fan, R. A. O'Connor, S. M. Anderton, A. Bar-Or, S. Fillatreau, and D. Gray. 2012. 'B cell depletion therapy ameliorates autoimmune disease through ablation of IL-6-producing B cells', *J Exp Med*, 209: 1001-10.
- Bartosik-Psujek, H., and M. Psujek. 2019. 'Vitamin D as an immune modulator in multiple sclerosis', *Neurol Neurochir Pol*, 53: 113-22.
- Becher, B., B. G. Durell, and R. J. Noelle. 2002. 'Experimental autoimmune encephalitis and inflammation in the absence of interleukin-12', *J Clin Invest*, 110: 493-7.
- Berer, K., L. A. Gerdes, E. Cekanaviciute, X. Jia, L. Xiao, Z. Xia, C. Liu, L. Klotz, U. Stauffer, S. E. Baranzini, T. Kumpfel, R. Hohlfeld, G. Krishnamoorthy, and H. Wekerle. 2017. 'Gut microbiota from multiple sclerosis patients enables spontaneous autoimmune encephalomyelitis in mice', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 114: 10719-24.
- Berer, K., I. Martinez, A. Walker, B. Kunkel, P. Schmitt-Kopplin, J. Walter, and G. Krishnamoorthy. 2018. 'Dietary non-fermentable fiber prevents autoimmune neurological disease by changing gut metabolic and immune status', *Sci Rep*, 8: 10431.

- Berer, K., M. Mues, M. Koutrolos, Z. A. Rasbi, M. Boziki, C. Johner, H. Wekerle, and G. Krishnamoorthy. 2011. 'Commensal microbiota and myelin autoantigen cooperate to trigger autoimmune demyelination', *Nature*, 479: 538-41.
- Bettelli, E., M. Pagany, H. L. Weiner, C. Lington, R. A. Sobel, and V. K. Kuchroo. 2003. 'Myelin oligodendrocyte glycoprotein-specific T cell receptor transgenic mice develop spontaneous autoimmune optic neuritis', *J Exp Med*, 197: 1073-81.
- Bettelli, E., B. Sullivan, S. J. Szabo, R. A. Sobel, L. H. Glimcher, and V. K. Kuchroo. 2004. 'Loss of T-bet, but not STAT1, prevents the development of experimental autoimmune encephalomyelitis', *J Exp Med*, 200: 79-87.
- Bettini, M., K. Rosenthal, and B. D. Evavold. 2009. 'Pathogenic MOG-reactive CD8+ T cells require MOG-reactive CD4+ T cells for sustained CNS inflammation during chronic EAE', *J Neuroimmunol*, 213: 60-8.
- Buc, M. 2013. 'Role of regulatory T cells in pathogenesis and biological therapy of multiple sclerosis', *Mediators Inflamm*, 2013: 963748.
- Buck, M. D., D. O'Sullivan, and E. L. Pearce. 2015. 'T cell metabolism drives immunity', *J Exp Med*, 212: 1345-60.
- Cabreiro, F., C. Au, K. Y. Leung, N. Vergara-Irigaray, H. M. Cocheme, T. Noori, D. Weinkove, E. Schuster, N. D. Greene, and D. Gems. 2013. 'Metformin retards aging in *C. elegans* by altering microbial folate and methionine metabolism', *Cell*, 153: 228-39.
- Cakina, S., O. Ocak, A. Ozkan, S. Yucel, and H. I. Ozisik Karaman. 2019. 'Relationship between genetic polymorphisms MTHFR (C677T, A1298C), MTR (A2756G) and MTRR (A66G) genes and multiple sclerosis: a case-control study', *Folia Neuropathol*, 57: 36-40.
- Caro, P., J. Gomez, M. Lopez-Torres, I. Sanchez, A. Naudi, M. Jove, R. Pamplona, and G. Barja. 2008. 'Forty percent and eighty percent methionine restriction decrease mitochondrial ROS generation and oxidative stress in rat liver', *Biogerontology*, 9: 183-96.
- Castano-Martinez, T., F. Schumacher, S. Schumacher, B. Kochlik, D. Weber, T. Grune, R. Biemann, A. McCann, K. Abraham, C. Weikert, B. Kleuser, A. Schurmann, and T. Laeger. 2019. 'Methionine restriction prevents onset of type 2 diabetes in NZO mice', *FASEB J*, 33: 7092-102.
- Cekanaviciute, E., B. B. Yoo, T. F. Runia, J. W. Debelius, S. Singh, C. A. Nelson, R. Kanner, Y. Bencosme, Y. K. Lee, S. L. Hauser, E. Crabtree-Hartman, I. K. Sand, M. Gacias, Y. Zhu, P. Casaccia, B. A. C. Cree, R. Knight, S. K. Mazmanian, and S. E. Baranzini. 2017. 'Gut bacteria from multiple sclerosis patients modulate human T cells and exacerbate symptoms in mouse models', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 114: 10713-18.
- Chen, J., N. Chia, K. R. Kalari, J. Z. Yao, M. Novotna, M. M. Paz Soldan, D. H. Luckey, E. V. Marietta, P. R. Jeraldo, X. Chen, B. G. Weinschenker, M. Rodriguez, O. H. Kantarci, H. Nelson, J. A. Murray, and A. K. Mangalam. 2016. 'Multiple sclerosis patients have a distinct gut microbiota compared to healthy controls', *Sci Rep*, 6: 28484.
- Cheng, Y., L. Sun, Z. Xie, X. Fan, Q. Cao, J. Han, J. Zhu, and T. Jin. 2017. 'Diversity of immune cell types in multiple sclerosis and its animal model: Pathological and therapeutic implications', *J Neurosci Res*, 95: 1973-83.
- Choi, I. Y., L. Piccio, P. Childress, B. Bollman, A. Ghosh, S. Brandhorst, J. Suarez, A. Michalsen, A. H. Cross, T. E. Morgan, M. Wei, F. Paul, M. Bock, and V. D. Longo. 2016. 'A Diet Mimicking

- Fasting Promotes Regeneration and Reduces Autoimmunity and Multiple Sclerosis Symptoms', *Cell Rep*, 15: 2136-46.
- Cignarella, F., C. Cantoni, L. Ghezzi, A. Salter, Y. Dorsett, L. Chen, D. Phillips, G. M. Weinstock, L. Fontana, A. H. Cross, Y. Zhou, and L. Piccio. 2018. 'Intermittent Fasting Confers Protection in CNS Autoimmunity by Altering the Gut Microbiota', *Cell Metab*, 27: 1222-35 e6.
- Constantinescu, C. S., N. Farooqi, K. O'Brien, and B. Gran. 2011. 'Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) as a model for multiple sclerosis (MS)', *Br J Pharmacol*, 164: 1079-106.
- Costantino, C. M., C. Baecher-Allan, and D. A. Hafler. 2008. 'Multiple sclerosis and regulatory T cells', *J Clin Immunol*, 28: 697-706.
- Cui, L. Y., S. F. Chu, and N. H. Chen. 2020. 'The role of chemokines and chemokine receptors in multiple sclerosis', *Int Immunopharmacol*, 83: 106314.
- D'Amore, R., U. Z. Ijaz, M. Schirmer, J. G. Kenny, R. Gregory, A. C. Darby, M. Shakya, M. Podar, C. Quince, and N. Hall. 2016. 'A comprehensive benchmarking study of protocols and sequencing platforms for 16S rRNA community profiling', *BMC Genomics*, 17: 55.
- Dankers, W., E. M. Colin, J. P. van Hamburg, and E. Lubberts. 2016. 'Vitamin D in Autoimmunity: Molecular Mechanisms and Therapeutic Potential', *Front Immunol*, 7: 697.
- Dendrou, C. A., L. Fugger, and M. A. Friese. 2015. 'Immunopathology of multiple sclerosis', *Nat Rev Immunol*, 15: 545-58.
- Dhaeze, T., C. Lachance, L. Tremblay, C. Grasmuck, L. Bourbonniere, S. Larouche, O. Saint-Laurent, M. A. Lecuyer, R. M. Rebillard, S. Zandee, and A. Prat. 2019. 'Sex-dependent factors encoded in the immune compartment dictate relapsing or progressive phenotype in demyelinating disease', *JCI Insight*, 4.
- Didonna, A., and J. R. Oksenberg. 2015. 'Genetic determinants of risk and progression in multiple sclerosis', *Clin Chim Acta*, 449: 16-22.
- Domingues, H. S., M. Mues, H. Lassmann, H. Wekerle, and G. Krishnamoorthy. 2010. 'Functional and pathogenic differences of Th1 and Th17 cells in experimental autoimmune encephalomyelitis', *PLoS One*, 5: e15531.
- Duffy, S. S., J. G. Lees, and G. Moalem-Taylor. 2014. 'The contribution of immune and glial cell types in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis', *Mult Scler Int*, 2014: 285245.
- El-Behi, M., B. Ciric, H. Dai, Y. Yan, M. Cullimore, F. Safavi, G. X. Zhang, B. N. Dittel, and A. Rostami. 2011. 'The encephalitogenicity of T(H)17 cells is dependent on IL-1- and IL-23-induced production of the cytokine GM-CSF', *Nat Immunol*, 12: 568-75.
- Encinas, J. A., L. S. Wicker, L. B. Peterson, A. Mukasa, C. Teuscher, R. Sobel, H. L. Weiner, C. E. Seidman, J. G. Seidman, and V. K. Kuchroo. 1999. 'QTL influencing autoimmune diabetes and encephalomyelitis map to a 0.15-cM region containing Il2', *Nat Genet*, 21: 158-60.
- Engelhardt, B., and R. M. Ransohoff. 2012. 'Capture, crawl, cross: the T cell code to breach the blood-brain barriers', *Trends Immunol*, 33: 579-89.
- Esmailzadeh, E., M. Soleimani, D. Zare-Abdollahi, B. Jameie, and H. R. Khorram Khorshid. 2019. 'Curcumin ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis in a C57BL/6 mouse model', *Drug Dev Res*, 80: 629-36.

- Evans, E., V. Levasseur, A. H. Cross, and L. Piccio. 2019. 'An overview of the current state of evidence for the role of specific diets in multiple sclerosis', *Mult Scler Relat Disord*, 36: 101393.
- Fan, X., C. Lin, J. Han, X. Jiang, J. Zhu, and T. Jin. 2015. 'Follicular Helper CD4+ T Cells in Human Neuroautoimmune Diseases and Their Animal Models', *Mediators Inflamm*, 2015: 638968.
- Farez, M. F., M. P. Fiol, M. I. Gaitan, F. J. Quintana, and J. Correale. 2015. 'Sodium intake is associated with increased disease activity in multiple sclerosis', *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 86: 26-31.
- Ferber, I. A., S. Brocke, C. Taylor-Edwards, W. Ridgway, C. Dinisco, L. Steinman, D. Dalton, and C. G. Fathman. 1996. 'Mice with a disrupted IFN-gamma gene are susceptible to the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE)', *J Immunol*, 156: 5-7.
- Fernando, V., S. Omura, F. Sato, E. Kawai, N. E. Martinez, S. F. Elliott, K. Yoh, S. Takahashi, and I. Tsunoda. 2014. 'Regulation of an autoimmune model for multiple sclerosis in Th2-biased GATA3 transgenic mice', *Int J Mol Sci*, 15: 1700-18.
- Filippi, M., and M. A. Rocca. 2011. 'MR imaging of multiple sclerosis', *Radiology*, 259: 659-81.
- Fontana, L. 2009. 'Neuroendocrine factors in the regulation of inflammation: excessive adiposity and calorie restriction', *Exp Gerontol*, 44: 41-5.
- Ford, M. L., and B. D. Evavold. 2005. 'Specificity, magnitude, and kinetics of MOG-specific CD8+ T cell responses during experimental autoimmune encephalomyelitis', *Eur J Immunol*, 35: 76-85.
- Friese, M. A., X. Montalban, N. Willcox, J. I. Bell, R. Martin, and L. Fugger. 2006. 'The value of animal models for drug development in multiple sclerosis', *Brain*, 129: 1940-52.
- Frohman, E. M., M. K. Racke, and C. S. Raine. 2006. 'Multiple sclerosis--the plaque and its pathogenesis', *N Engl J Med*, 354: 942-55.
- Gao, X., S. M. Sanderson, Z. Dai, M. A. Reid, D. E. Cooper, M. Lu, J. P. Richie, Jr., A. Ciccarella, A. Calcagnotto, P. G. Mikhael, S. J. Mentch, J. Liu, G. Ables, D. G. Kirsch, D. S. Hsu, S. N. Nichenametla, and J. W. Locasale. 2019. 'Dietary methionine influences therapy in mouse cancer models and alters human metabolism', *Nature*, 572: 397-401.
- Ghasemi, N., S. Razavi, and E. Nikzad. 2017. 'Multiple Sclerosis: Pathogenesis, Symptoms, Diagnoses and Cell-Based Therapy', *Cell J*, 19: 1-10.
- Ghosh, S., D. Wanders, K. P. Stone, N. T. Van, C. C. Cortez, and T. W. Gettys. 2014. 'A systems biology analysis of the unique and overlapping transcriptional responses to caloric restriction and dietary methionine restriction in rats', *FASEB J*, 28: 2577-90.
- Gianfrancesco, M. A., M. M. Glymour, S. Walter, B. Rhead, X. Shao, L. Shen, H. Quach, A. Hubbard, I. Jonsdottir, K. Stefansson, P. Strid, J. Hillert, A. Hedstrom, T. Olsson, I. Kockum, C. Schaefer, L. Alfredsson, and L. F. Barcellos. 2017. 'Causal Effect of Genetic Variants Associated With Body Mass Index on Multiple Sclerosis Susceptibility', *Am J Epidemiol*, 185: 162-71.
- Goodin, D. S., E. M. Frohman, G. P. Garmany, Jr., J. Halper, W. H. Likosky, F. D. Lublin, D. H. Silberberg, W. H. Stuart, S. van den Noort, Therapeutics, Neurology Technology Assessment Subcommittee of the American Academy of, and M. S. Council for Clinical Practice Guidelines the. 2002. 'Disease modifying therapies in multiple sclerosis: report of the Therapeutics and Technology Assessment Subcommittee of the American Academy of Neurology and the MS Council for Clinical Practice Guidelines', *Neurology*, 58: 169-78.

- Goverman, J. 2009. 'Autoimmune T cell responses in the central nervous system', *Nat Rev Immunol*, 9: 393-407.
- Gran, B., G. X. Zhang, S. Yu, J. Li, X. H. Chen, E. S. Ventura, M. Kamoun, and A. Rostami. 2002. 'IL-12p35-deficient mice are susceptible to experimental autoimmune encephalomyelitis: evidence for redundancy in the IL-12 system in the induction of central nervous system autoimmune demyelination', *J Immunol*, 169: 7104-10.
- Greenwood, J., S. J. Heasman, J. I. Alvarez, A. Prat, R. Lyck, and B. Engelhardt. 2011. 'Review: leucocyte-endothelial cell crosstalk at the blood-brain barrier: a prerequisite for successful immune cell entry to the brain', *Neuropathol Appl Neurobiol*, 37: 24-39.
- Groom, J. R., and A. D. Luster. 2011. 'CXCR3 in T cell function', *Exp Cell Res*, 317: 620-31.
- Guerrero, B. L., and N. L. Sicotte. 2020. 'Microglia in Multiple Sclerosis: Friend or Foe?', *Front Immunol*, 11: 374.
- Han, Q., Y. Tan, and R. M. Hoffman. 2020. 'Oral dosing of Recombinant Methioninase Is Associated With a 70% Drop in PSA in a Patient With Bone-metastatic Prostate Cancer and 50% Reduction in Circulating Methionine in a High-stage Ovarian Cancer Patient', *Anticancer Res*, 40: 2813-19.
- Hardmeier, M., L. Leocani, and P. Fuhr. 2017. 'A new role for evoked potentials in MS? Repurposing evoked potentials as biomarkers for clinical trials in MS', *Mult Scler*, 23: 1309-19.
- Hasek, B. E., L. K. Stewart, T. M. Henagan, A. Boudreau, N. R. Lenard, C. Black, J. Shin, P. Huypens, V. L. Malloy, E. P. Plaisance, R. A. Krajcik, N. Orentreich, and T. W. Gettys. 2010. 'Dietary methionine restriction enhances metabolic flexibility and increases uncoupled respiration in both fed and fasted states', *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 299: R728-39.
- He, B., T. K. Hoang, X. Tian, C. M. Taylor, E. Blanchard, M. Luo, M. B. Bhattacharjee, J. Freeborn, S. Park, J. Couturier, J. W. Lindsey, D. Q. Tran, J. M. Rhoads, and Y. Liu. 2019. 'Lactobacillus reuteri Reduces the Severity of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis in Mice by Modulating Gut Microbiota', *Front Immunol*, 10: 385.
- Hedstrom, A. K., L. Alfredsson, and T. Olsson. 2016. 'Environmental factors and their interactions with risk genotypes in MS susceptibility', *Curr Opin Neurol*, 29: 293-8.
- Hedstrom, A. K., I. Lima Bomfim, L. Barcellos, M. Gianfrancesco, C. Schaefer, I. Kockum, T. Olsson, and L. Alfredsson. 2014. 'Interaction between adolescent obesity and HLA risk genes in the etiology of multiple sclerosis', *Neurology*, 82: 865-72.
- Hedstrom, A. K., T. Olsson, and L. Alfredsson. 2012. 'High body mass index before age 20 is associated with increased risk for multiple sclerosis in both men and women', *Mult Scler*, 18: 1334-6.
- Hoffman, R. M. 2019. 'Methionine Restriction and Life-Span Extension', *Methods Mol Biol*, 1866: 263-66.
- Ineichen, B. V., S. Keskitalo, M. Farkas, N. Bain, U. Kallweit, M. Weller, L. Klotz, and M. Linnebank. 2014. 'Genetic variants of homocysteine metabolism and multiple sclerosis: a case-control study', *Neurosci Lett*, 562: 75-8.
- Jangi, S., R. Gandhi, L. M. Cox, N. Li, F. von Glehn, R. Yan, B. Patel, M. A. Mazzola, S. Liu, B. L. Glanz, S. Cook, S. Tankou, F. Stuart, K. Melo, P. Nejad, K. Smith, B. D. Topcuolu, J. Holden, P. Kivisakk, T. Chitnis, P. L. De Jager, F. J. Quintana, G. K. Gerber, L. Bry, and H. L. Weiner.

2016. 'Alterations of the human gut microbiome in multiple sclerosis', *Nat Commun*, 7: 12015.
- Ji, Z., S. Wu, Y. Xu, J. Qi, X. Su, and L. Shen. 2019. 'Obesity Promotes EAE Through IL-6 and CCL-2-Mediated T Cells Infiltration', *Front Immunol*, 10: 1881.
- Johnson, M. O., P. J. Siska, D. C. Contreras, and J. C. Rathmell. 2016. 'Nutrients and the microenvironment to feed a T cell army', *Semin Immunol*, 28: 505-13.
- Karnoe, A., L. M. Pedersen, S. Karlsen, F. Boesen, L. Skovgaard, and L. Kayser. 2019. 'How people with multiple sclerosis experience the influence of nutrition and lifestyle factors on the disease', *Disabil Rehabil*: 1-12.
- Katz Sand, I., Y. Zhu, A. Ntranos, J. C. Clemente, E. Cekanaviciute, R. Brandstadter, E. Crabtree-Hartman, S. Singh, Y. Bencosme, J. Debelius, R. Knight, B. A. C. Cree, S. E. Baranzini, and P. Casaccia. 2019. 'Disease-modifying therapies alter gut microbial composition in MS', *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*, 6: e517.
- Kawaguchi, K., K. Miyake, Q. Han, S. Li, Y. Tan, K. Igarashi, T. Kiyuna, M. Miyake, T. Higuchi, H. Oshiro, Z. Zhang, S. Razmjooei, S. Wangsiricharoen, M. Bouvet, S. R. Singh, M. Unno, and R. M. Hoffman. 2018. 'Oral recombinant methioninase (o-rMETase) is superior to injectable rMETase and overcomes acquired gemcitabine resistance in pancreatic cancer', *Cancer Lett*, 432: 251-59.
- Kieseier, B. C. 2011. 'The mechanism of action of interferon-beta in relapsing multiple sclerosis', *CNS Drugs*, 25: 491-502.
- Korn, T., E. Bettelli, M. Oukka, and V. K. Kuchroo. 2009. 'IL-17 and Th17 Cells', *Annu Rev Immunol*, 27: 485-517.
- Kouchaki, E., O. R. Tamtaji, M. Salami, F. Bahmani, R. Daneshvar Kakhaki, E. Akbari, M. Tajabadi-Ebrahimi, P. Jafari, and Z. Asemi. 2017. 'Clinical and metabolic response to probiotic supplementation in patients with multiple sclerosis: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial', *Clin Nutr*, 36: 1245-49.
- Kreis, W., and C. Hession. 1973. 'Isolation and purification of L-methionine-alpha-deamino-gamma-mercaptomethane-lyase (L-methioninase) from *Clostridium sporogenes*', *Cancer Res*, 33: 1862-5.
- Kumar, V., K. Stellrecht, and E. Sercarz. 1996. 'Inactivation of T cell receptor peptide-specific CD4 regulatory T cells induces chronic experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE)', *J Exp Med*, 184: 1609-17.
- Langer-Gould, A., S. M. Brara, B. E. Beaver, and C. Koebnick. 2013. 'Childhood obesity and risk of pediatric multiple sclerosis and clinically isolated syndrome', *Neurology*, 80: 548-52.
- Larochelle, C., J. I. Alvarez, and A. Prat. 2011. 'How do immune cells overcome the blood-brain barrier in multiple sclerosis?', *FEBS Lett*, 585: 3770-80.
- Larochelle, C., R. Cayrol, H. Kebir, J. I. Alvarez, M. A. Lecuyer, I. Ifergan, E. Viel, L. Bourbonniere, D. Beauseigle, S. Terouz, L. Hachehouche, S. Gendron, J. Poirier, C. Jobin, P. Duquette, K. Flanagan, T. Yednock, N. Arbour, and A. Prat. 2012. 'Melanoma cell adhesion molecule identifies encephalitogenic T lymphocytes and promotes their recruitment to the central nervous system', *Brain*, 135: 2906-24.
- Larochelle, C., M. A. Lecuyer, J. I. Alvarez, M. Charabati, O. Saint-Laurent, S. Ghannam, H. Kebir, K. Flanagan, T. Yednock, P. Duquette, N. Arbour, and A. Prat. 2015. 'Melanoma cell

- adhesion molecule-positive CD8 T lymphocytes mediate central nervous system inflammation', *Ann Neurol*, 78: 39-53.
- Lawrence, S. M., R. Corriden, and V. Nizet. 2020. 'How Neutrophils Meet Their End', *Trends Immunol*, 41: 531-44.
- Lazarevic, V., L. H. Glimcher, and G. M. Lord. 2013. 'T-bet: a bridge between innate and adaptive immunity', *Nat Rev Immunol*, 13: 777-89.
- Lecuyer, M. A., H. Kebir, and A. Prat. 2016. 'Glial influences on BBB functions and molecular players in immune cell trafficking', *Biochim Biophys Acta*, 1862: 472-82.
- Lee, B. C., A. Kaya, S. Ma, G. Kim, M. V. Gerashchenko, S. H. Yim, Z. Hu, L. G. Harshman, and V. N. Gladyshev. 2014. 'Methionine restriction extends lifespan of *Drosophila melanogaster* under conditions of low amino-acid status', *Nat Commun*, 5: 3592.
- Lee, Y. K., J. S. Menezes, Y. Umesaki, and S. K. Mazmanian. 2011. 'Proinflammatory T-cell responses to gut microbiota promote experimental autoimmune encephalomyelitis', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108 Suppl 1: 4615-22.
- Leuenberger, T., M. Paterka, E. Reuter, J. Herz, R. A. Niesner, H. Radbruch, T. Bopp, F. Zipp, and V. Siffrin. 2013. 'The role of CD8+ T cells and their local interaction with CD4+ T cells in myelin oligodendrocyte glycoprotein35-55-induced experimental autoimmune encephalomyelitis', *J Immunol*, 191: 4960-8.
- Lim, S. Y., and C. S. Constantinescu. 2010. 'Current and future disease-modifying therapies in multiple sclerosis', *Int J Clin Pract*, 64: 637-50.
- Link, H., and Y. M. Huang. 2006. 'Oligoclonal bands in multiple sclerosis cerebrospinal fluid: an update on methodology and clinical usefulness', *J Neuroimmunol*, 180: 17-28.
- Liston, A., R. E. Kohler, S. Townley, S. Haylock-Jacobs, I. Comerford, A. C. Caon, J. Webster, J. M. Harrison, J. Swann, I. Clark-Lewis, H. Korner, and S. R. McColl. 2009. 'Inhibition of CCR6 function reduces the severity of experimental autoimmune encephalomyelitis via effects on the priming phase of the immune response', *J Immunol*, 182: 3121-30.
- Liu, G., L. Yu, J. Fang, C. A. Hu, J. Yin, H. Ni, W. Ren, V. Duraipandiyar, S. Chen, N. A. Al-Dhabi, and Y. Yin. 2017. 'Methionine restriction on oxidative stress and immune response in dss-induced colitis mice', *Oncotarget*, 8: 44511-20.
- Lloyd, A. F., and V. E. Miron. 2019. 'The pro-remyelination properties of microglia in the central nervous system', *Nat Rev Neurol*, 15: 447-58.
- Luo, C., C. Jian, Y. Liao, Q. Huang, Y. Wu, X. Liu, D. Zou, and Y. Wu. 2017. 'The role of microglia in multiple sclerosis', *Neuropsychiatr Dis Treat*, 13: 1661-67.
- Luo, Q., Y. Sun, F. Y. Gong, W. Liu, W. Zheng, Y. Shen, Z. C. Hua, and Q. Xu. 2014. 'Blocking initial infiltration of pioneer CD8(+) T-cells into the CNS via inhibition of SHP-2 ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis in mice', *Br J Pharmacol*, 171: 1706-21.
- Machado-Santos, J., E. Saji, A. R. Troscher, M. Paunovic, R. Liblau, G. Gabriely, C. G. Bien, J. Bauer, and H. Lassmann. 2018. 'The compartmentalized inflammatory response in the multiple sclerosis brain is composed of tissue-resident CD8+ T lymphocytes and B cells', *Brain*, 141: 2066-82.
- MacIver, N. J., R. D. Michalek, and J. C. Rathmell. 2013. 'Metabolic regulation of T lymphocytes', *Annu Rev Immunol*, 31: 259-83.

- Malloy, V. L., R. A. Krajcik, S. J. Bailey, G. Hristopoulos, J. D. Plummer, and N. Orentreich. 2006. 'Methionine restriction decreases visceral fat mass and preserves insulin action in aging male Fischer 344 rats independent of energy restriction', *Aging Cell*, 5: 305-14.
- Malloy, V. L., C. E. Perrone, D. A. Mattocks, G. P. Ables, N. S. Caliendo, D. S. Orentreich, and N. Orentreich. 2013. 'Methionine restriction prevents the progression of hepatic steatosis in leptin-deficient obese mice', *Metabolism*, 62: 1651-61.
- Mangalam, A., S. K. Shahi, D. Luckey, M. Karau, E. Marietta, N. Luo, R. S. Choung, J. Ju, R. Sompallae, K. Gibson-Corley, R. Patel, M. Rodriguez, C. David, V. Taneja, and J. Murray. 2017. 'Human Gut-Derived Commensal Bacteria Suppress CNS Inflammatory and Demyelinating Disease', *Cell Rep*, 20: 1269-77.
- Marrie, R. A. 2017. 'Comorbidity in multiple sclerosis: implications for patient care', *Nat Rev Neurol*, 13: 375-82.
- Matthews, W. B., J. R. Wattam-Bell, and E. Pountney. 1982. 'Evoked potentials in the diagnosis of multiple sclerosis: a follow up study', *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 45: 303-7.
- Mattson, M. P., V. D. Longo, and M. Harvie. 2017. 'Impact of intermittent fasting on health and disease processes', *Ageing Res Rev*, 39: 46-58.
- McGeachy, M. J., Y. Chen, C. M. Tato, A. Laurence, B. Joyce-Shaikh, W. M. Blumenschein, T. K. McClanahan, J. J. O'Shea, and D. J. Cua. 2009. 'The interleukin 23 receptor is essential for the terminal differentiation of interleukin 17-producing effector T helper cells in vivo', *Nat Immunol*, 10: 314-24.
- McRae, B. L., M. K. Kennedy, L. J. Tan, M. C. Dal Canto, K. S. Picha, and S. D. Miller. 1992. 'Induction of active and adoptive relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) using an encephalitogenic epitope of proteolipid protein', *J Neuroimmunol*, 38: 229-40.
- Melbye, P., A. Olsson, T. H. Hansen, H. B. Sondergaard, and A. Bang Oturai. 2019. 'Short-chain fatty acids and gut microbiota in multiple sclerosis', *Acta Neurol Scand*, 139: 208-19.
- Mentch, S. J., M. Mehrmohamadi, L. Huang, X. Liu, D. Gupta, D. Mattocks, P. Gomez Padilla, G. Ables, M. M. Bamman, A. E. Thalacker-Mercer, S. N. Nichenametla, and J. W. Locasale. 2015. 'Histone Methylation Dynamics and Gene Regulation Occur through the Sensing of One-Carbon Metabolism', *Cell Metab*, 22: 861-73.
- Michel, L., C. Laroche, and A. Prat. 2015. 'Update on treatments in multiple sclerosis', *Presse Med*, 44: e137-51.
- Michel, L., H. Touil, N. B. Pikor, J. L. Gommerman, A. Prat, and A. Bar-Or. 2015. 'B Cells in the Multiple Sclerosis Central Nervous System: Trafficking and Contribution to CNS-Compartmentalized Inflammation', *Front Immunol*, 6: 636.
- Miller, D. H., F. Fazekas, X. Montalban, S. C. Reingold, and M. Trojano. 2014. 'Pregnancy, sex and hormonal factors in multiple sclerosis', *Mult Scler*, 20: 527-36.
- Miller, R. A., G. Buehner, Y. Chang, J. M. Harper, R. Sigler, and M. Smith-Wheelock. 2005. 'Methionine-deficient diet extends mouse lifespan, slows immune and lens aging, alters glucose, T4, IGF-I and insulin levels, and increases hepatocyte MIF levels and stress resistance', *Aging Cell*, 4: 119-25.
- Mokry, L. E., S. Ross, N. J. Timpson, S. Sawcer, G. Davey Smith, and J. B. Richards. 2016. 'Obesity and Multiple Sclerosis: A Mendelian Randomization Study', *PLoS Med*, 13: e1002053.
- Mulero, P., L. Midaglia, and X. Montalban. 2018. 'Ocrelizumab: a new milestone in multiple sclerosis therapy', *Ther Adv Neurol Disord*, 11: 1756286418773025.

- Munger, K. L., T. Chitnis, and A. Ascherio. 2009. 'Body size and risk of MS in two cohorts of US women', *Neurology*, 73: 1543-50.
- Murray, P. J., and T. A. Wynn. 2011. 'Protective and pathogenic functions of macrophage subsets', *Nat Rev Immunol*, 11: 723-37.
- Nichenametla, S. N., D. A. L. Mattocks, V. Midya, and J. Shneyder. 2020. 'Differential effects of sulfur amino acid-restricted and low-calorie diets on gut microbiome profile and bile acid composition in male C57BL6/J mice', *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*.
- Noseworthy, J. H., C. Lucchinetti, M. Rodriguez, and B. G. Weinshenker. 2000. 'Multiple sclerosis', *N Engl J Med*, 343: 938-52.
- Nylander, A., and D. A. Hafler. 2012. 'Multiple sclerosis', *J Clin Invest*, 122: 1180-8.
- O'Gorman, C., R. Lucas, and B. Taylor. 2012. 'Environmental risk factors for multiple sclerosis: a review with a focus on molecular mechanisms', *Int J Mol Sci*, 13: 11718-52.
- Ochoa-Reparaz, J., D. W. Mielcarz, L. E. Ditrio, A. R. Burroughs, D. M. Foureau, S. Haque-Begum, and L. H. Kasper. 2009. 'Role of gut commensal microflora in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis', *J Immunol*, 183: 6041-50.
- Olafsson, S., P. Stridh, S. D. Bos, A. Ingason, J. Euesden, P. Sulem, G. Thorleifsson, O. Gustafsson, A. Johannesson, A. J. Geirsson, A. V. Thorsson, B. Sigurgeirsson, B. R. Ludviksson, E. Olafsson, H. Kristjansdottir, J. G. Jonasson, J. H. Olafsson, K. B. Orvar, R. Benediktsson, R. Bjarnason, S. Kristjansdottir, T. Gislason, T. Valdimarsson, E. Mikaelssdottir, S. Sigurdsson, S. Jonsson, T. Rafnar, D. Aarsland, S. Djurovic, T. Fladby, G. P. Knudsen, E. G. Celius, K. M. Myhr, G. Grondal, K. Steinsson, H. Valdimarsson, S. Bjornsson, U. S. Bjornsdottir, E. S. Bjornsson, B. Nilsson, O. A. Andreassen, L. Alfredsson, J. Hillert, I. S. Kockum, G. Masson, U. Thorsteinsdottir, D. F. Gudbjartsson, H. Stefansson, H. Hjaltason, H. F. Harbo, T. Olsson, I. Jonsdottir, and K. Stefansson. 2017. 'Fourteen sequence variants that associate with multiple sclerosis discovered by meta-analysis informed by genetic correlations', *NPJ Genom Med*, 2: 24.
- Orentreich, N., J. R. Matias, A. DeFelice, and J. A. Zimmerman. 1993. 'Low methionine ingestion by rats extends life span', *J Nutr*, 123: 269-74.
- Pani, G. 2015. 'Neuroprotective effects of dietary restriction: Evidence and mechanisms', *Semin Cell Dev Biol*, 40: 106-14.
- Park, J. H., Q. Han, M. Zhao, Y. Tan, T. Higuchi, S. N. Yoon, N. Sugisawa, J. Yamamoto, M. Bouvet, B. Clary, S. R. Singh, and R. M. Hoffman. 2019. 'Oral recombinant methioninase combined with oxaliplatin and 5-fluorouracil regressed a colon cancer growing on the peritoneal surface in a patient-derived orthotopic xenograft mouse model', *Tissue Cell*, 61: 109-14.
- Pearce, E. L., M. C. Poffenberger, C. H. Chang, and R. G. Jones. 2013. 'Fueling immunity: insights into metabolism and lymphocyte function', *Science*, 342: 1242454.
- Perrone, C. E., V. L. Malloy, D. S. Orentreich, and N. Orentreich. 2013. 'Metabolic adaptations to methionine restriction that benefit health and lifespan in rodents', *Exp Gerontol*, 48: 654-60.
- Piccio, L., J. L. Stark, and A. H. Cross. 2008. 'Chronic calorie restriction attenuates experimental autoimmune encephalomyelitis', *J Leukoc Biol*, 84: 940-8.
- Pinto, A., A. Bonucci, E. Maggi, M. Corsi, and R. Businaro. 2018. 'Anti-Oxidant and Anti-Inflammatory Activity of Ketogenic Diet: New Perspectives for Neuroprotection in Alzheimer's Disease', *Antioxidants (Basel)*, 7.

- Plaisance, E. P., F. L. Greenway, A. Boudreau, K. L. Hill, W. D. Johnson, R. A. Krajcik, C. E. Perrone, N. Orentreich, W. T. Cefalu, and T. W. Gettys. 2011. 'Dietary methionine restriction increases fat oxidation in obese adults with metabolic syndrome', *J Clin Endocrinol Metab*, 96: E836-40.
- Pollinger, B., G. Krishnamoorthy, K. Berer, H. Lassmann, M. R. Bosl, R. Dunn, H. S. Domingues, A. Holz, F. C. Kurschus, and H. Wekerle. 2009. 'Spontaneous relapsing-remitting EAE in the SJL/J mouse: MOG-reactive transgenic T cells recruit endogenous MOG-specific B cells', *J Exp Med*, 206: 1303-16.
- Pollock, J., L. Glendinning, T. Wisedchanwet, and M. Watson. 2018. 'The Madness of Microbiome: Attempting To Find Consensus "Best Practice" for 16S Microbiome Studies', *Appl Environ Microbiol*, 84.
- Polman, C. H., P. W. O'Connor, E. Havrdova, M. Hutchinson, L. Kappos, D. H. Miller, J. T. Phillips, F. D. Lublin, G. Giovannoni, A. Wajgt, M. Toal, F. Lynn, M. A. Panzara, A. W. Sandrock, and Affirm Investigators. 2006. 'A randomized, placebo-controlled trial of natalizumab for relapsing multiple sclerosis', *N Engl J Med*, 354: 899-910.
- Quinlan, C. L., S. E. Kaiser, B. Bolanos, D. Nowlin, R. Grantner, S. Karlicek-Bryant, J. L. Feng, S. Jenkinson, K. Freeman-Cook, S. G. Dann, X. Wang, P. A. Wells, V. R. Fantin, A. E. Stewart, and S. K. Grant. 2017. 'Targeting S-adenosylmethionine biosynthesis with a novel allosteric inhibitor of Mat2A', *Nat Chem Biol*, 13: 785-92.
- Rangachari, M., S. M. Kerfoot, N. Arbour, and J. I. Alvarez. 2017. 'Editorial: Lymphocytes in MS and EAE: More Than Just a CD4(+) World', *Front Immunol*, 8: 133.
- Ren, W., G. Liu, J. Yin, B. Tan, G. Wu, F. W. Bazer, Y. Peng, and Y. Yin. 2017. 'Amino-acid transporters in T-cell activation and differentiation', *Cell Death Dis*, 8: e2655.
- Roy, D. G., J. Chen, V. Mamane, E. H. Ma, B. M. Muhire, R. D. Sheldon, T. Shorstova, R. Koning, R. M. Johnson, E. Esaulova, K. S. Williams, S. Hayes, M. Steadman, B. Samborska, A. Swain, A. Daigneault, V. Chubukov, T. P. Roddy, W. Foulkes, J. A. Pospisilik, M. C. Bourgeois-Daigneault, M. N. Artyomov, M. Witcher, C. M. Krawczyk, C. Larochelle, and R. G. Jones. 2020. 'Methionine Metabolism Shapes T Helper Cell Responses through Regulation of Epigenetic Reprogramming', *Cell Metab*, 31: 250-66 e9.
- Ruckenstuhl, C., C. Netzberger, I. Entfellner, D. Carmona-Gutierrez, T. Kickenweiz, S. Stekovic, C. Gleixner, C. Schmid, L. Klug, A. G. Sorgo, T. Eisenberg, S. Buttner, G. Marino, R. Koziel, P. Jansen-Durr, K. U. Frohlich, G. Kroemer, and F. Madeo. 2014. 'Lifespan extension by methionine restriction requires autophagy-dependent vacuolar acidification', *PLoS Genet*, 10: e1004347.
- Russell, R. D., L. J. Black, and A. Begley. 2020. 'The unresolved role of the neurologist in providing dietary advice to people with multiple sclerosis', *Mult Scler Relat Disord*, 44: 102304.
- Sanchez, J. M. S., A. B. DePaula-Silva, J. E. Libbey, and R. S. Fujinami. 2020. 'Role of diet in regulating the gut microbiota and multiple sclerosis', *Clin Immunol*: 108379.
- Sanderson, S. M., X. Gao, Z. Dai, and J. W. Locasale. 2019. 'Methionine metabolism in health and cancer: a nexus of diet and precision medicine', *Nat Rev Cancer*, 19: 625-37.
- Schmidt, A., N. Oberle, and P. H. Krammer. 2012. 'Molecular mechanisms of treg-mediated T cell suppression', *Front Immunol*, 3: 51.

- Sinclair, L. V., A. J. Howden, A. Brenes, L. Spinelli, J. L. Hukelmann, A. N. Macintyre, X. Liu, S. Thomson, P. M. Taylor, J. C. Rathmell, J. W. Locasale, A. I. Lamond, and D. A. Cantrell. 2019. 'Antigen receptor control of methionine metabolism in T cells', *Elife*, 8.
- Sonner, J. K., M. Keil, M. Falk-Paulsen, N. Mishra, A. Rehman, M. Kramer, K. Deumelandt, J. Rowe, K. Sanghvi, L. Wolf, A. von Landenberg, H. Wolff, R. Bharti, I. Oezen, T. V. Lanz, F. Wanke, Y. Tang, I. Brandao, S. R. Mohapatra, L. Epping, A. Grill, R. Roth, B. Niesler, S. G. Meuth, C. A. Opitz, J. G. Okun, C. Reinhardt, F. C. Kurschus, W. Wick, H. B. Bode, P. Rosenstiel, and M. Platten. 2019. 'Dietary tryptophan links encephalogenicity of autoreactive T cells with gut microbial ecology', *Nat Commun*, 10: 4877.
- Sporici, R., and T. B. Issekutz. 2010. 'CXCR3 blockade inhibits T-cell migration into the CNS during EAE and prevents development of adoptively transferred, but not actively induced, disease', *Eur J Immunol*, 40: 2751-61.
- Steinbach, K., M. Piedavent, S. Bauer, J. T. Neumann, and M. A. Friese. 2013. 'Neutrophils amplify autoimmune central nervous system infiltrates by maturing local APCs', *J Immunol*, 191: 4531-9.
- Stromnes, I. M., and J. M. Goverman. 2006a. 'Active induction of experimental allergic encephalomyelitis', *Nat Protoc*, 1: 1810-9.
- . 2006b. 'Passive induction of experimental allergic encephalomyelitis', *Nat Protoc*, 1: 1952-60.
- Sun, L., A. A. Sadighi Akha, R. A. Miller, and J. M. Harper. 2009. 'Life-span extension in mice by preweaning food restriction and by methionine restriction in middle age', *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 64: 711-22.
- Syed, Y. Y. 2018. 'Ocrelizumab: A Review in Multiple Sclerosis', *CNS Drugs*, 32: 883-90.
- t Hart, B. A., J. D. Laman, and Y. S. Kap. 2018. 'Reverse Translation for Assessment of Confidence in Animal Models of Multiple Sclerosis for Drug Discovery', *Clin Pharmacol Ther*, 103: 262-70.
- Tai, Y., Q. Wang, H. Korner, L. Zhang, and W. Wei. 2018. 'Molecular Mechanisms of T Cells Activation by Dendritic Cells in Autoimmune Diseases', *Front Pharmacol*, 9: 642.
- Tan, Y., J. Zavala, Sr., Q. Han, M. Xu, X. Sun, X. Tan, X. Tan, R. Magana, J. Geller, and R. M. Hoffman. 1997. 'Recombinant methioninase infusion reduces the biochemical endpoint of serum methionine with minimal toxicity in high-stage cancer patients', *Anticancer Res*, 17: 3857-60.
- Tan, Y., J. Zavala, Sr., M. Xu, J. Zavala, Jr., and R. M. Hoffman. 1996. 'Serum methionine depletion without side effects by methioninase in metastatic breast cancer patients', *Anticancer Res*, 16: 3937-42.
- Tankou, S. K., K. Regev, B. C. Healy, L. M. Cox, E. Tjon, P. Kivisakk, I. P. Vanande, S. Cook, R. Gandhi, B. Glanz, J. Stankiewicz, and H. L. Weiner. 2018. 'Investigation of probiotics in multiple sclerosis', *Mult Scler*, 24: 58-63.
- Tashiro, Y., Q. Han, Y. Tan, N. Sugisawa, J. Yamamoto, H. Nishino, S. Inubushi, T. Higuchi, T. Aoki, M. Murakami, and R. M. Hoffman. 2020. 'Oral Recombinant Methioninase Prevents Obesity in Mice on a High-fat Diet', *In Vivo*, 34: 489-94.
- Tashiro, Y., Q. Han, Y. Tan, N. Sugisawa, J. Yamamoto, H. Nishino, S. Inubushi, Y. U. Sun, H. Lim, T. Aoki, M. Murakami, Y. Takahashi, M. Bouvet, and R. M. Hoffman. 2020. 'Oral Recombinant

- Methioninase Prevents Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Mice on a High Fat Diet', *In Vivo*, 34: 979-84.
- Tashiro, Y., Q. Han, Y. Tan, N. Sugisawa, J. Yamamoto, H. Nishino, S. Inubushi, Y. U. Sun, G. Zhu, H. Lim, T. Aoki, M. Murakami, M. Bouvet, and R. M. Hoffman. 2020. 'Oral Recombinant Methioninase Inhibits Diabetes Onset in Mice on a High-fat Diet', *In Vivo*, 34: 973-78.
- Teitelbaum, D., R. Aharoni, E. Klinger, R. Kreitman, E. Raymond, A. Malley, R. Shofti, M. Sela, and R. Arnon. 2004. 'Oral glatiramer acetate in experimental autoimmune encephalomyelitis: clinical and immunological studies', *Ann N Y Acad Sci*, 1029: 239-49.
- Teitelbaum, D., R. Arnon, and M. Sela. 1999. 'Immunomodulation of experimental autoimmune encephalomyelitis by oral administration of copolymer 1', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96: 3842-7.
- Teitelbaum, D., M. Fridkis-Hareli, R. Arnon, and M. Sela. 1996. 'Copolymer 1 inhibits chronic relapsing experimental allergic encephalomyelitis induced by proteolipid protein (PLP) peptides in mice and interferes with PLP-specific T cell responses', *J Neuroimmunol*, 64: 209-17.
- Teitelbaum, D., A. Meshorer, T. Hirshfeld, R. Arnon, and M. Sela. 1971. 'Suppression of experimental allergic encephalomyelitis by a synthetic polypeptide', *Eur J Immunol*, 1: 242-8.
- Tettey, P., S. Simpson, Jr., B. V. Taylor, and I. A. van der Mei. 2014. 'Vascular comorbidities in the onset and progression of multiple sclerosis', *J Neurol Sci*, 347: 23-33.
- Trichopoulou, A., T. Costacou, C. Bamia, and D. Trichopoulos. 2003. 'Adherence to a Mediterranean diet and survival in a Greek population', *N Engl J Med*, 348: 2599-608.
- Tuohy, V. K., Z. Lu, R. A. Sobel, R. A. Laursen, and M. B. Lees. 1989. 'Identification of an encephalitogenic determinant of myelin proteolipid protein for SJL mice', *J Immunol*, 142: 1523-7.
- van der Veen, R. C., J. A. Kapp, and J. L. Trotter. 1993. 'Fine-specificity differences in the recognition of an encephalitogenic peptide by T helper 1 and 2 cells', *J Neuroimmunol*, 48: 221-6.
- Veldhoen, M., R. J. Hocking, R. A. Flavell, and B. Stockinger. 2006. 'Signals mediated by transforming growth factor-beta initiate autoimmune encephalomyelitis, but chronic inflammation is needed to sustain disease', *Nat Immunol*, 7: 1151-6.
- Viglietta, V., C. Baecher-Allan, H. L. Weiner, and D. A. Hafler. 2004. 'Loss of functional suppression by CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis', *J Exp Med*, 199: 971-9.
- Wade, B. J. 2014. 'Spatial analysis of global prevalence of multiple sclerosis suggests need for an updated prevalence scale', *Mult Scler Int*, 2014: 124578.
- Wallis, K. F., S. B. Melnyk, and I. R. Miousse. 2020. 'Sex-Specific Effects of Dietary Methionine Restriction on the Intestinal Microbiome', *Nutrients*, 12.
- Wanders, D., S. Ghosh, K. P. Stone, N. T. Van, and T. W. Gettys. 2014. 'Transcriptional impact of dietary methionine restriction on systemic inflammation: relevance to biomarkers of metabolic disease during aging', *Biofactors*, 40: 13-26.
- Wang, J., Y. Qi, X. Niu, H. Tang, S. N. Meydani, and D. Wu. 2018. 'Dietary naringenin supplementation attenuates experimental autoimmune encephalomyelitis by modulating autoimmune inflammatory responses in mice', *J Nutr Biochem*, 54: 130-39.

- Wilck, N., M. G. Matus, S. M. Kearney, S. W. Olesen, K. Forslund, H. Bartolomaeus, S. Haase, A. Mahler, A. Balogh, L. Marko, O. Vvedenskaya, F. H. Kleiner, D. Tsvetkov, L. Klug, P. I. Costea, S. Sunagawa, L. Maier, N. Rakova, V. Schatz, P. Neubert, C. Fratzer, A. Krannich, M. Gollasch, D. A. Grohme, B. F. Corte-Real, R. G. Gerlach, M. Basic, A. Typas, C. Wu, J. M. Titze, J. Jantsch, M. Boschmann, R. Dechend, M. Kleinewietfeld, S. Kempa, P. Bork, R. A. Linker, E. J. Alm, and D. N. Muller. 2017. 'Salt-responsive gut commensal modulates TH17 axis and disease', *Nature*, 551: 585-89.
- Willis, M. A., and J. A. Cohen. 2013. 'Fingolimod therapy for multiple sclerosis', *Semin Neurol*, 33: 37-44.
- Wu, C., N. Yosef, T. Thalhamer, C. Zhu, S. Xiao, Y. Kishi, A. Regev, and V. K. Kuchroo. 2013. 'Induction of pathogenic TH17 cells by inducible salt-sensing kinase SGK1', *Nature*, 496: 513-7.
- Xie, Z. X., H. L. Zhang, X. J. Wu, J. Zhu, D. H. Ma, and T. Jin. 2015. 'Role of the immunogenic and tolerogenic subsets of dendritic cells in multiple sclerosis', *Mediators Inflamm*, 2015: 513295.
- Yang, Y., Y. Zhang, Y. Xu, T. Luo, Y. Ge, Y. Jiang, Y. Shi, J. Sun, and G. Le. 2019. 'Dietary methionine restriction improves the gut microbiota and reduces intestinal permeability and inflammation in high-fat-fed mice', *Food Funct*, 10: 5952-68.
- Yatsunenکو, T., F. E. Rey, M. J. Manary, I. Trehan, M. G. Dominguez-Bello, M. Contreras, M. Magris, G. Hidalgo, R. N. Baldassano, A. P. Anokhin, A. C. Heath, B. Warner, J. Reeder, J. Kuczynski, J. G. Caporaso, C. A. Lozupone, C. Lauber, J. C. Clemente, D. Knights, R. Knight, and J. I. Gordon. 2012. 'Human gut microbiome viewed across age and geography', *Nature*, 486: 222-7.
- Yednock, T. A., C. Cannon, L. C. Fritz, F. Sanchez-Madrid, L. Steinman, and N. Karin. 1992. 'Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis by antibodies against alpha 4 beta 1 integrin', *Nature*, 356: 63-6.
- Yu, D., S. E. Yang, B. R. Miller, J. A. Wisinski, D. S. Sherman, J. A. Brinkman, J. L. Tomasiewicz, N. E. Cummings, M. E. Kimple, V. L. Cryns, and D. W. Lamming. 2018. 'Short-term methionine deprivation improves metabolic health via sexually dimorphic, mTORC1-independent mechanisms', *FASEB J*, 32: 3471-82.
- Zhu, Y., Z. Y. He, and H. N. Liu. 2011. 'Meta-analysis of the relationship between homocysteine, vitamin B(1)(2), folate, and multiple sclerosis', *J Clin Neurosci*, 18: 933-8.